



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO  
DI INGEGNERIA  
DELL'INFORMA  
ZIONE**

**DIPARTIMENTO DI INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**CORSO DI LAUREA IN  
INGEGNERIA DELL'INFORMAZIONE**

**MODELLI MATEMATICI PER LA VALUTAZIONE  
PRECLINICA DEL RISCHIO DI ARITMIA  
CARDIACA INDOTTA DA FARMACI**

**Relatore: Prof. Visentin Roberto**

**Laureando: Avellini Riccardo  
Matricola: 1195831**

**ANNO ACCADEMICO 2021/2022  
DATA DI LAUREA 17/03/2022**





## INDICE

<b>SOMMARIO</b> .....	5
<b>CAPITOLO 1: INTRODUZIONE</b> .....	7
1.1. Scopo della tesi.....	8
<b>CAPITOLO 2: ELETTROFISIOLOGIA DEL CUORE</b> .....	10
2.1. Fondamenti di fisiologia cardiaca.....	10
2.1.1. Il ciclo cardiaco.....	11
2.1.2. Il sistema di conduzione.....	13
2.2. Potenziali a riposo e d'azione.....	15
2.2.1. Il potenziale d'azione.....	16
2.2.2. Il comportamento nel tessuto atriale e ventricolare.....	17
2.2.3. Il comportamento delle cellule pacemaker.....	20
2.3. Proprietà dei potenziali cardiaci.....	21
2.3.1. Il valore di soglia.....	21
2.3.2. L'eccitabilità.....	21
2.3.3. Le depolarizzazioni successive.....	22
2.3.4. Il rientro.....	24
2.4. Principali forme di disturbi cardiaci.....	24
2.4.1. Irregolarità ritmiche del cuore.....	25
2.4.2. Cardiotossicità.....	26
<b>CAPITOLO 3: MODELLIZZAZIONE E SIMULAZIONE DELL'</b> <b>ELETTROFISIOLOGIA</b> .....	27
3.1. Cenni storici sulla modellistica matematica del cuore e dei potenziali d'azione.....	27
3.2. Modelli matematici del potenziali d'azione cardiaco.....	31
3.2.1. Modello di Noble.....	32
3.2.2. Modello O'Hara-Rudy di un cardiomiocita ventricolare.....	34
3.2.3. Modello di una cellula staminale pluripotente indotta a cardiomiocita (hiPSC-CM) ventricolare.....	37
3.2.3.1. Le cellule staminali pluripotenti indotte.....	37
3.2.3.2. Modello Paci di una hiPSC-CM ventricolare.....	38
3.2.4. Dinamica non lineare dei potenziali d'azione.....	42
3.2.4.1. APD alternans e curva di restituzione.....	42
3.2.4.2. Early after depolarizations (EAD).....	44
3.2.4.3. Propagazione dei potenziali d'azione.....	45
3.3. Propagazione dell'onda elettrica dei Potenziali d'Azione.....	46
3.3.1. Modello del bidominio .....	46

3.3.2.	Modello del monodominio.....	48
<b>CAPITOLO 4: SIMULAZIONE E VALUTAZIONE DEI RISCHI PROARITMICI DEL CUORE.....</b>		<b>49</b>
4.1.	Test di sicurezza dei farmaci e linee guida.....	49
4.2.	Modelli matematici di analisi per l'impatto farmacologico sui canali ionici.....	51
4.2.1.	Modello Pore-block.....	52
4.2.2.	Legami dipendenti dal voltaggio o dallo stato.....	53
4.3.	Valutazione del rischio torsadogenico dei farmaci.....	55
4.3.1.	La iniziativa CiPA.....	56
4.3.2.	La simulazione cardiaca 3D.....	61
<b>CAPITOLO 5: CONCLUSIONI.....</b>		<b>67</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>		<b>70</b>

# SOMMARIO

Come effetto collaterale potenzialmente pericoloso per la vita, i composti farmaceutici possono scatenare aritmie cardiache ostacolando la funzione elettrica e meccanica del cuore. Per questo motivo, prima della messa sul mercato di un qualsiasi farmaco occorre valutarne il rischio proaritmico mediante una serie di test sia in fase preclinica che clinica del processo di sviluppo del farmaco. I test preclinici *in vitro* con cellule non cardiache e i test *in vivo* su animali sono attualmente oggetto di dibattito a causa della loro scarsa estrapolazione alla cardiotossicità farmacologica nell'uomo. D'altro canto, il monitoraggio intensivo dell'attività cardiaca durante i test clinici con volontari umani costituisce un importante fattore di costo. Dunque le agenzie regolatorie e il mondo della ricerca industriale, ospedaliera e accademica stanno lavorando a una revisione del processo di valutazione della sicurezza cardiaca dei farmaci, combinando lo studio *in vitro* di cellule del muscolo cardiaco umano, disponibili a partire da cellule staminali del donatore evitando controversie etiche (cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotte, hiPSC-CM), e modelli computazionali di elettrofisiologia cardiaca umana sia a livello cellulare che di organo. Il loro uso combinato durante la fase preclinica favorirebbe un potenziale miglioramento della specificità dei test di proaritmia, riducendone il tasso di falsi positivi. Ciò permetterebbe da un lato di ridurre o addirittura sostituire gli esperimenti sugli animali, e dall'altro fornirebbe informazioni più affidabili per un monitoraggio cardiaco in fase clinica.

In tale contesto, questa tesi ha lo scopo di fornire una descrizione dei principali approcci modellistici alla valutazione preclinica del rischio di aritmia indotta da farmaco. Nello specifico, viene fornita dapprima una descrizione delle caratteristiche principali dell'elettrofisiologia cardiaca, mettendo in evidenza la correlazione tra il potenziale d'azione della cellula cardiaca e fenomeni innescanti aritmie, quali l'impiego di farmaci. Per analizzare la morfologia del potenziale d'azione e studiare quali siano i fattori che ne causano delle variazioni vengono illustrati alcuni modelli matematici, basati su cardiomiociti umani o cellule staminali pluripotenti, che rientrano nelle pipeline di protocolli innovativi per la valutazione preclinica degli effetti aritmici indotti da farmaci, permettendo una migliore comprensione dei meccanismi determinanti l'insorgenza di fenomeni aritmici e contemporaneamente una migliore gestione del processo di classificazione dei farmaci.



# CAPITOLO 1

## INTRODUZIONE

Le cellule cardiache muscolari (miocardiche) possiedono la capacità di generare e condurre segnali elettrici, noti come potenziali d'azione, attraverso il tessuto cardiaco. La produzione e la propagazione concertate dei potenziali d'azione in tutto il cuore costituiscono la base del suo ciclo ritmico di contrazione e rilassamento. L'attività ritmica può essere però influenzata negativamente da una serie di fattori "genetici" o di natura estranea al corpo, come per esempio l'effetto di composti farmaceutici, che riducono notevolmente le funzioni meccaniche del cuore e fanno sì che si verifichino situazioni clinicamente rischiose per la vita. Le aritmie cardiache indotte rientrano tra gli effetti collaterali più gravi di un trattamento farmacologico e sono una delle ragioni principali dell'interruzione del processo di sviluppo di composti candidati o perfino del ritiro dal mercato di farmaci. Di conseguenza, la valutazione del rischio proaritmico è parte integrante e obbligatoria dei test di sicurezza sia preclinici che clinici di nuovi composti farmaceutici. A questo proposito, uno dei principali problemi per l'industria è che ormai i test preclinici basati su modelli animali mostrano un significativo tasso di falsi positivi e quindi possono portare all'arresto dello sviluppo di composti, altrimenti promettenti, poiché vengono analizzati con marcatori di proaritmia piuttosto non specifici. Un simile decorso stanno avendo alcune linee guida (S7B per l'ambito non clinico, e E14 per l'ambito clinico) stilate nel 2005 da parte della *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH), che si stanno dimostrando sempre più obsolete.

La modellazione matematica dell'elettrofisiologia cardiaca ripercorre oltre 50 anni di storia ed è diventata un ottimo esempio di biologia dei sistemi computazionali. I sistemi non lineari di equazioni differenziali ordinarie (ODE) costituiscono lo strumento principale per descrivere i potenziali d'azione di singole cellule miocardiche, mentre i sistemi complessi di equazioni differenziali parziali (PDE) del tipo diffusione-reazione modellano la propagazione dell'onda di eccitazione elettrica attraverso cellule cardiache interconnesse, tessuto cardiaco o l'intero cuore. Recentemente, il campo ha acquisito ulteriore slancio per superare il problema di non-specificità dei test preclinici di cardiotossicità dei farmaci: i dati ottenuti dall'analisi in vitro sugli effetti dei farmaci sulle correnti ioniche transmembrana vengono integrati in un modello di potenziale

d'azione meccanicistico di una cellula miocardica umana. Questo modello servirà quindi come base per la previsione del rischio proaritmico. Infine, queste previsioni saranno esaminate da esperimenti in vitro con cellule muscolari cardiache derivate da cellule staminali umane (hiPSC-CMs), che mantengono le caratteristiche genetiche del loro donatore umano e forniscono, senza vincoli etici, un'abbondante scorta di materiale per test di sicurezza dei farmaci.

## 1.1 Scopo della tesi

L'obiettivo principale di questo elaborato riguarda la descrizione dei modelli e dei metodi che permettono l'analisi degli eventi di aritmia indotta da farmaci, e di come lo sviluppo tecnologico stia incidendo su di essi, soprattutto per quanto riguarda i protocolli di classificazione dei rischi in ambito preclinico che, con l'approdo sulla scena medica delle tecnologie di automatizzazione ed ottimizzazione dei modelli matematici, di simulatori cardiaci 3D e delle cellule staminali, dimostrano un approccio decisamente più specifico e sensibile ad aritmie come la torsione di punta, rispetto a vecchie linee guida.

Nel capitolo 1 vengono presentate le generali caratteristiche del cuore e delle cellule miocardiche. Con un'attenzione particolare agli eventi di natura elettrica che avvengono all'interno dei tessuti cardiaci, si descrivono i potenziali d'azione, le loro proprietà e i principali disturbi cardiaci, come le irregolarità ritmiche e la cardiotossicità.

Il capitolo 2 tratta brevemente la storia dello sviluppo dei modelli matematici (sviluppati in silico) utilizzati per lo studio elettrofisiologico delle cellule cardiache, citando i principali studi di Hodgkin-Huxley e di Markov. Dopodichè si concentra sui modelli più all'avanguardia per lo studio dei potenziali d'azione cardiaci e della loro propagazione attraverso i tessuti:

- il modello O'Hara-Rudy, che attraverso un sistema di 41 equazioni (differenziali ordinarie) descrive le caratteristiche elettriche di un cardiomiocita ventricolare umano;
- il modello Paci, che analizza il potenziale transmembrana delle cellule staminali pluripotenti indotte a cardiomiociti (hiPSC-CM);
- i modelli del mono- e bidominio, che, poiché impiegati nella simulazione organica 3D, utilizzano un sistema di equazioni differenziali parziali per spiegare, con notevole precisione numerica, la propagazione nei tessuti del potenziale d'azione.

Inoltre il capitolo affronta il ricco repertorio dinamico (e non lineare) di questi modelli, che corrisponde a diversi tipi di comportamento aritmico sia a livello cellulare che tissutale (post-depolarizzazioni precoci, prolungamento o accorciamento della durata dei potenziali d'azione in modo irregolare).

Il capitolo 3 descrive protocolli e linee guida che regolano la classificazione degli effetti dei farmaci sui ritmi cardiaci. Principalmente se ne approfondiscono due, entrambe nate per ricercare un metodo di classificazione dei farmaci più specifico e coerente rispetto alle linee guida presentate all'inizio degli anni 2000 (basate su metriche di valutazione sensibili ma poco specifiche):

- L'iniziativa de “*Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay*” (CiPA), che è guidata dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense e lavora sulla definizione di un nuovo paradigma per la valutazione della sicurezza cardiaca dei farmaci, dove le conoscenze del modello O'Hara-Rudy sono combinate con analisi di cardiotossicità sugli hiPSC-CM;
- Lo sviluppo di un simulatore cardiaco 3D (UT-Heart) che permette di valutare i rischi aritmogeni dei farmaci basandosi su un modello completo del cuore, che conferisce maggior precisione e specificità nella classificazione dei farmaci nelle categorie di rischio torsadogenico.

Infine nelle conclusioni vengono espressi i vantaggi e i problemi da affrontare dei metodi descritti nell'elaborato, mettendo in risalto quali possano essere le future sfide tecnologiche e mediche in questo ambito.

# CAPITOLO 2

## ELETTROFISIOLOGIA DEL CUORE

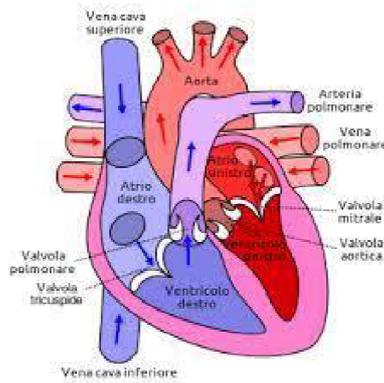
L'elettrofisiologia è, per definizione, lo studio delle manifestazioni elettriche dei tessuti viventi. Queste manifestazioni hanno alcuni caratteri comuni a tutte le cellule e fibre dei tessuti eccitabili. L'elettrofisiologia generale studia l'attività elettrica della fibra nervosa in relazione con la fibra muscolare dei muscoli scheletrici e del miocardio (principale tessuto muscolare cardiaco).

Il tessuto muscolare cardiaco è una struttura elettricamente attiva ed eccitabile; ciò dipende dallo stato di polarizzazione delle cellule. La membrana cellulare del tessuto miocardico presenta una differenza di potenziale elettrico tra la sua superficie esterna e interna, dovuta alla differenza di concentrazione degli ioni intracellulari ed extracellulari. Questo genera un gradiente chimico ed elettrico transmembrana. Il comportamento elettrico che la membrana presenta può essere paragonato a quello di un condensatore.

Quando le viene applicato uno stimolo elettrico, si genera un potenziale d'azione. Attraverso l'analisi di quest'ultimo con la registrazione elettrocardiografica è possibile rilevare l'attività cardiaca ed il suo ritmo e diagnosticare possibili comportamenti anomali e potenzialmente pericolosi dell'organo cardiaco, quali ad esempio aritmie, spasmi, scompensi.

### 2.1 Fondamenti di fisiologia cardiaca

Il cuore è un organo cavo suddiviso internamente in due metà indipendenti e fisicamente separate, destra e sinistra, dette anche cuore destro e cuore sinistro. Come riportato dalla Figura 2, ciascuna metà è formata da una cavità superiore, l'atrio, e da una cavità inferiore, il ventricolo. Ogni atrio comunica con il ventricolo sottostante per mezzo di un ostio atrioventricolare corredato di valvola atrioventricolare (valvola cuspidale), la quale permette il passaggio del sangue dalla cavità atriale a quella ventricolare e si oppone al passaggio inverso (reflusso). Ai due atri fanno capo le vene, mentre, da ciascun ventricolo, attraverso un orifizio arterioso che è fornito di valvole semilunari, si diparte un grosso vaso arterioso.

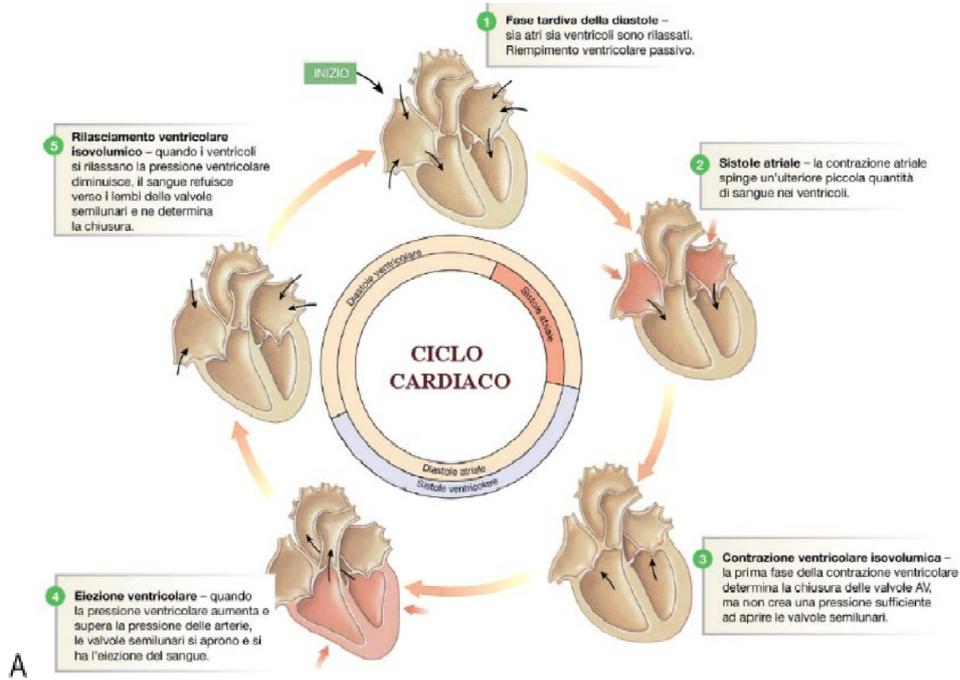


**Figura 2.1:** Rappresentazione anatomica delle principali componenti cardiache, in particolare vengono sottolineati atri, ventricoli e le principali vene e arterie addette allo scorrimento del sangue

Dal punto di vista meccanico, l'attività del cuore può essere assimilata a quella di una doppia pompa volumetrica alternata, costituita complessivamente da quattro cavità. Infatti le parti del cuore battono normalmente in sequenza ordinata e ritmica: prima avviene la contrazione dell'atrio (sistole atriale) che è seguita dalla contrazione del ventricolo (sistole ventricolare) e durante la diastole tutte le quattro camere sono rilasciate, decontratte.

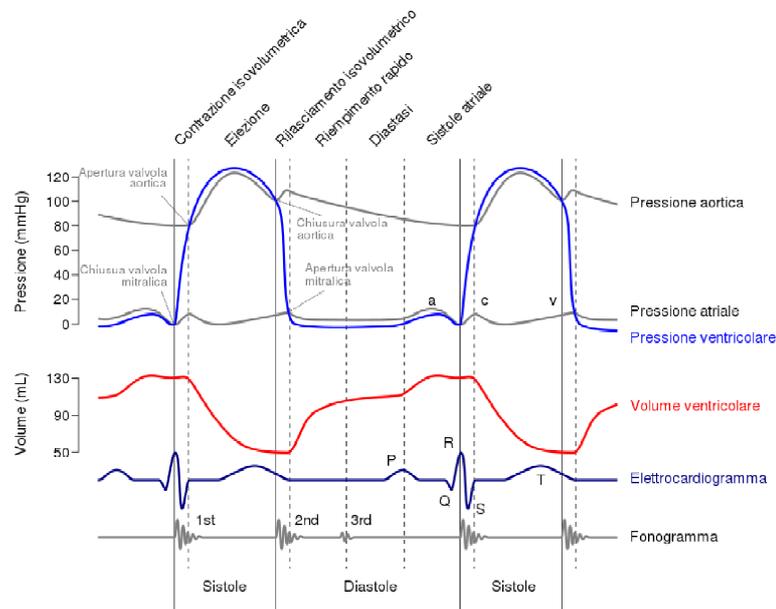
### 2.1.1 Ciclo cardiaco

Atri e ventricoli alternano fasi di rilassamento, nelle quali si riempiono di sangue, e fasi di contrazione durante le quali si svuotano, spingendo il sangue nei due circuiti (Fig. 2.2A). Queste fasi interessano contemporaneamente i due lati del cuore e si alternano in modo che il flusso del sangue sia sempre unidirezionale: gli atri ricevono il sangue che proviene dalle grandi vene e lo spingono nei ventricoli; questi a loro volta si contraggono e pompano il sangue nelle arterie principali. L'intera sequenza costituisce il ciclo cardiaco, che ha una durata di circa 0,8 secondi e comprende fasi di sistole, cioè di contrazione, e fasi di diastole, cioè di rilassamento. Solitamente viene preso come esempio il cuore sinistro (il comportamento del cuore destro è praticamente identico, con leggere differenze in termini di pressione esercitata dal flusso sanguigno durante il ciclo cardiaco).



A

**Figura 2.2; (A):** Il ciclo cardiaco mette in funzione tutte le cellule muscolari cardiache per permettere il flusso continuo di sangue e non vi è mai un vero e proprio momento di stasi.



B

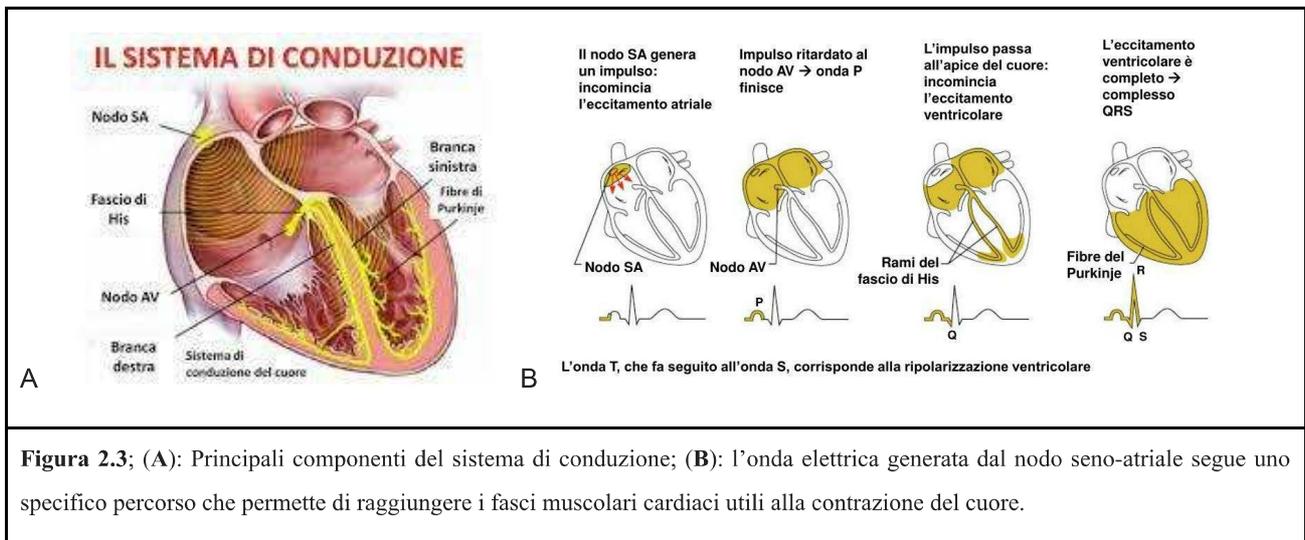
**Figura 2.2 (B):** L'andamento del segnale elettrocardiografico, visualizzabile attraverso una riproduzione grafica dell'attività elettrica cardiaca detta elettrocardiogramma (ECG), è strettamente collegato alla pressione ventricolare, la quale, se valutata in un sistema cartesiano di "pressione (mmHg) vs. tempo (ms)" può essere vista come un susseguirsi di stadi in cui il muscolo cardiaco si contrae e si rilassa. Il ciclo cardiaco è l'insieme di queste fasi, in particolare: contrazione isovolumetrica (del ventricolo), eiezione sanguigna dal ventricolo, rilasciamento isovolumetrico, riempimento rapido, diastasi, sistole atriale.

Nello specifico si può immaginare che il cuore sia inizialmente in una situazione di rilassamento nella quale il sangue fluisce negli atri e, successivamente, nei ventricoli grazie alla valvola mitrale, nel cuore sinistro, e alla valvola tricuspide, nel cuore destro, che si trovano leggermente aperte a causa della pressione sanguigna che proviene dagli atri. Durante questa fase di diastole e riempimento ventricolare, la valvola aortica si mantiene chiusa. Così facendo il ventricolo inizia a riempirsi in modo passivo, raggiungendo una capienza di circa il 70%. Dopodiché, durante la sistole atriale, i fasci miocardici dell'atrio si contraggono spremendo ulteriormente altro sangue nel ventricolo. Una volta che il ventricolo si riempie, la valvola mitrale si chiude, poiché sottoposta alla pressione dei fasci muscolari miocardici del ventricolo, che spingono le estremità della valvola. La contrazione delle fibre muscolari del ventricolo avviene in modo graduale fino a raggiungere, e poi superare leggermente, come si può notare dalla Figura 2.2B, una pressione sanguigna pari ad 80 mmHg, corrispondente alla pressione presente sul lato aortico della valvola aortica. Una volta superata tale pressione, la valvola aortica si apre e permette il flusso sanguigno attraverso l'aorta (la quale a sua volta spingerà il sangue nel resto dell'organismo). Il volume di sangue ventricolare telediastolico è circa 130 ml. Quindi, circa 50 ml di sangue restano in ciascun ventricolo alla fine della sistole (volume ventricolare telesistolico), e la frazione di eiezione, ovvero la percentuale del volume ventricolare telediastolico che viene spinto fuori ad ogni sistole, è di circa il 65%. Una volta che il miocardio ventricolare ha raggiunto il massimo della contrazione, la pressione intraventricolare, già in discesa, scende più rapidamente. Dopo la chiusura della valvola aortica, la pressione ventricolare continua a scendere e si ha il periodo di rilasciamento ventricolare isovolumetrico (Fig. 2.2A), che termina non appena la pressione intraventricolare cade sotto quella atriale e la valvola atrioventricolare si apre, permettendo al ventricolo di riempirsi. La pressione atriale continua a salire, dopo la fine della sistole ventricolare, fino all'apertura della valvola atrioventricolare, quindi cade per poi lentamente risalire fino alla successiva sistole atriale.

### **2.1.2 Sistema di conduzione**

Le contrazioni, più o meno rapide, delle quattro cavità cardiache avvengono grazie alla diffusione di un impulso elettrico attraverso fasci muscolari specifici del miocardio.

Possiamo distinguere due tipologie di tessuto miocardico: comune e specifico. Il miocardio comune si dispone in fasci che costituiscono le pareti del cuore. Nella compagine del miocardio comune si trovano fibre muscolari specializzate, il miocardio specifico, che si organizzano nel sistema di conduzione del cuore.



**Figura 2.3;** (A): Principali componenti del sistema di conduzione; (B): l'onda elettrica generata dal nodo seno-atriale segue uno specifico percorso che permette di raggiungere i fasci muscolari cardiaci utili alla contrazione del cuore.

Quest'ultimo permette l'autoregolazione del ritmo cardiaco.

Diversamente dagli altri muscoli del corpo, la cui attività dipende dal cervello e dal midollo spinale (che è chiamata anche muscolatura "volontaria" perché è controllabile dalla nostra volontà), il cuore è autosufficiente in quanto possiede un proprio stimolatore (il nodo seno atriale) che genera l'impulso elettrico che determina la contrazione cardiaca.

Lo stimolo che attiva il nodo seno atriale si origina involontariamente dai centri di controllo posti nel sistema nervoso centrale nell'encefalo e nel midollo spinale e viene trasportato dal sistema nervoso centrale al cuore attraverso le vie efferenti parasimpatiche e simpatiche.

All'interno del cuore, il nodo senoatriale, situato nella parte anteriore della giunzione dell'atrio destro con la vena cava superiore (Fig. 2.3A), dà origine all'impulso che, come una scossa elettrica, determina la contrazione degli atri e dei ventricoli alla frequenza che esso impone. Tale caratteristica regola la frequenza cardiaca (*ritmo sinusale*) come un vero e proprio 'segnapassi' (pacemaker) del cuore. Il nodo senoatriale emette ritmicamente un impulso che depolarizza il muscolo cardiaco adiacente, le onde che ne derivano si propagano attraverso gli atri fino a raggiungere la seconda struttura di conduzione specifica chiamata nodo atrioventricolare, che si trova nel pavimento dell'atrio destro a sinistra dell'orifizio del seno coronario.

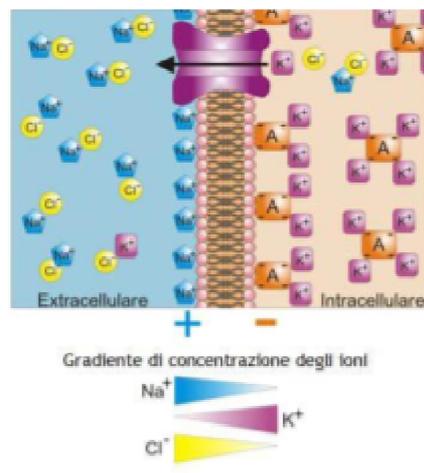
Lo stimolo, condotto da fibre internodali, giunge fino al nodo atrioventricolare che rallenta la conduzione in modo che la depolarizzazione dei due atri possa essere completata; successivamente, si diffonde (Fig 2.3B) attraverso il resto del tessuto specializzato nella conduzione: fascio di His situato nella porzione membranosa e prossimale del setto interventricolare.

Esso si suddivide nelle branche destra e sinistra che decorrono sotto l'endocardio e formano la rete subendocardica delle fibre di Purkinje, che si estendono nelle pareti ventricolari in rapporto diretto con le fibre della muscolatura ventricolare.

Non appena l'impulso elettrico partito dal nodo senoatriale arriva ai ventricoli, essi si contraggono ed il sangue scorre a raggiungere tutte le parti del corpo.

## 2.2 Potenziali a riposo e d'azione

Ogni attività meccanica, cioè ogni contrazione del cuore, è preceduta da un'attività elettrica: tale attività genera il cosiddetto segnale elettrocardiografico o elettrocardiogramma (ECG). Le cellule miocardiche (o cardiomiociti) a riposo sono normalmente polarizzate, hanno cioè un potenziale transmembrana determinato dai gradienti di concentrazione degli ioni  $K^+$  (potassio) e  $Na^+$  (sodio) intracellulari ed extracellulari, e dall'attività delle pompe ioniche della membrana stessa.



**Figura 2.4:** Il potenziale di membrana è determinato da un flusso di ioni che, uscendo ed entrando attraverso specifici canali, provocano variazioni nel voltaggio della cellula

La Figura 2.4 mostra la polarizzazione della membrana dovuta alla concentrazione più elevata di cationi  $K^+$  all'interno e alla concentrazione di cationi  $Na^+$  più elevata all'esterno della cellula. Gli ioni  $K^+$  tendono a diffondersi verso l'esterno della membrana per effetto del gradiente chimico. I corrispondenti anioni proteici  $A^-$  non riescono però a seguire i cationi  $K^+$  e quindi si crea uno squilibrio di cariche: più positive all'esterno e più negative all'interno. Gli ioni  $Na^+$  tendono infatti a diffondere verso l'interno con minor facilità degli ioni  $K^+$  perché la permeabilità della membrana a questo catione è minore. Quindi sui versanti della membrana si crea un gradiente elettrico che impedisce la fuoriuscita di ulteriori cationi  $K^+$ .

Per compensare la diffusione osmotica degli ioni transmembrana esistono specifici canali dette pompe selettive per il  $Na^+$  o per il  $K^+$  che, con dispendio di energia generata dal gradiente elettrico presente sulla membrana, trasportano nuovamente all'interno  $K^+$  e all'esterno  $Na^+$  per mantenere costante (-90 mV) il potenziale di riposo della membrana cellulare. Ogni ione presenta un gradiente

elettrochimico, composto da due parti: il gradiente elettrico, che rappresenta la differenza di cariche transmembrana, ed il gradiente chimico, che riporta la differenza di concentrazione tra interno ed esterno della membrana. Questi due gradienti sono il motore dei principali spostamenti degli ioni dentro e fuori la membrana cellulare. Vi è però un gradiente elettrochimico di equilibrio, in cui i due gradienti presentano uguale forza e si bilanciano. Tale valore di equilibrio è legato ad un potenziale elettrochimico specifico dello ione (chiamato potenziale di equilibrio), e viene determinato attraverso l'equazione di Nernst:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{[K_e]}{[K_i]} . \quad (2.1)$$

Dove  $[K_e]$  e  $[K_i]$  sono le concentrazioni del catione  $K^+$  all'esterno e all'interno della cellula,  $R$  è la costante universale dei gas,  $T$  la temperatura assoluta e  $F$  la costante di Faraday.

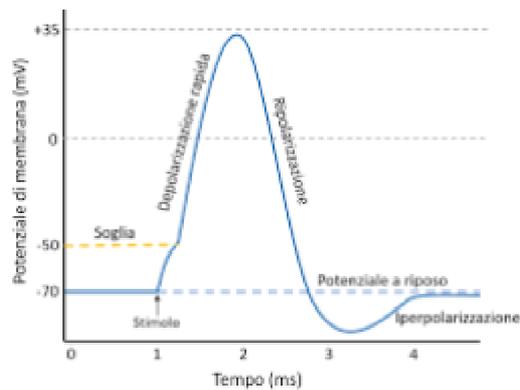
L'equilibrio di Nernst esplicita la condizione di equilibrio di uno ione fra due fasi. Ciascun ione in soluzione ha il proprio potenziale di Nernst, dato dall'equazione di Nernst. In generale, si osserva che il potenziale di Nernst di un dato ione può essere diverso dal potenziale di membrana. Solo quegli ioni per i quali il potenziale di Nernst eguaglia il potenziale di membrana sono all'equilibrio. Nel caso delle cellule del miocardio la polarizzazione di riposo della membrana si avvicina al potenziale di equilibrio del potassio (-90 mV).

Dato che i potenziali di equilibrio degli ioni impegnati nel processo di polarizzazione della membrana, in particolare di  $K$  ed  $Na$ , sono profondamente diversi (-90 mV e +55 mV), si è desunta l'esistenza di pompe ioniche che, sfruttando l'energia elettrica immagazzinata dalla cellula durante il riposo, permettono, variando la permeabilità della membrana, ad ioni  $K^+$  di entrare e ioni  $Na^+$  di uscire, affinché i gradienti chimici elevati di questi due ioni si mantenessero costanti.

La cellula miocardica a riposo è eccitabile, può cioè variare il suo potenziale di riposo e trasmettere lo stimolo eccitatorio alle cellule vicine: tale fenomeno è definito potenziale d'azione.

### **2.2.1 Il potenziale d'azione**

In fisiologia, un potenziale d'azione è un segnale elettrico ampio, di valore costante e di breve durata, che si propaga a velocità costante senza subire alcun decremento. Esso deriva da una rapida inversione della polarizzazione della membrana cellulare dovuta all'aumento selettivo della permeabilità della membrana per gli ioni  $Na^+$ . Tale ingresso potrebbe teoricamente continuare fino a che viene raggiunto il potenziale d'equilibrio per il  $Na^+$ , ma questi valori non vengono mai raggiunti.



**Figura 2.5:** Fasi del potenziale d'azione di una cellula nervosa o muscolare umana

Il potenziale d'azione è influenzato dai gradienti elettrochimici e di concentrazione di  $K^+$  e  $Na^+$ . Può essere suddiviso in fasi in base alle variazioni della conduttanza della membrana cellulare ad essi.

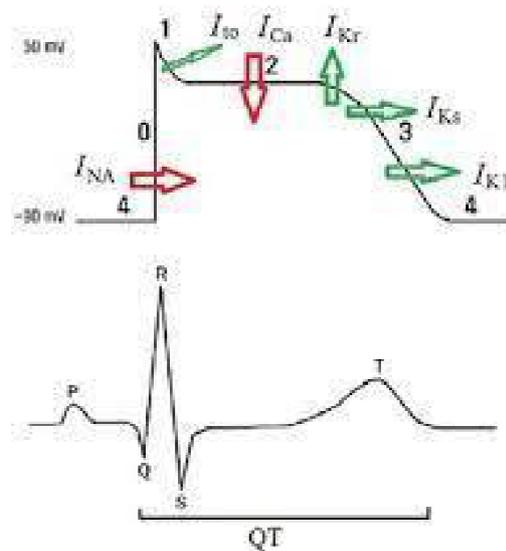
Lo stimolo elettrico proveniente da cellule adiacenti o dall'esterno determina dapprima un aumento della permeabilità non selettiva della membrana agli ioni  $Na^+$  e  $K^+$  che determina la graduale diminuzione della polarizzazione della membrana fino ad annullarla e avvia la parziale depolarizzazione, premessa alla comparsa del potenziale d'azione. Quando tale depolarizzazione raggiunge il valore soglia ("threshold"), (Fig. 2.5) compare un selettivo aumento di permeabilità per gli ioni  $Na^+$ , che attiva il potenziale d'azione. Una volta raggiunto un valore di polarizzazione della membrana vicino al potenziale di equilibrio dello ione sodio, si innesta il processo d'inattivazione (o di ripolarizzazione), il quale riduce gradualmente la permeabilità della membrana agli ioni  $Na^+$  e attiva la permeabilità dei  $K^+$  che escono attraverso la membrana sotto l'azione dei gradienti elettrici e chimici. Di conseguenza la polarizzazione della membrana ritorna ai livelli di partenza (circa -90 mV) dopo un tempo nell'ordine del millisecondo. Dopo circa 5 ms tutto è tornato normale dal punto di vista elettrico e la cellula potrebbe produrre un altro impulso nervoso ma ha perso  $K^+$  ed ha all'interno  $Na^+$ . Se non intervenisse la pompa metabolica a ristabilire la normalità dei gradienti chimici dei cationi la cellula finirebbe per deteriorarsi. Durante questo tempo la cellula entra in un periodo chiamato "refrattario" in cui non è più eccitabile, impedendo il diffondersi di ulteriori potenziali d'azione che potrebbero sovrapporsi a quello appena creato.

## 2.2.2 Il comportamento nel tessuto atriale e ventricolare

Il sistema di generazione e di conduzione del potenziale d'azione nel cuore avviene ad opera di specifiche fibre muscolari (miocardio specifico) che originano dal nodo senoatriale (cellule pacemaker) e si diffondono a tutto il miocardio. Esse trasmettono lo stimolo elettrico alle restanti fibre miocardiche atriali e ventricolari (miocardio comune) nelle quali avviene un brusco aumento

di ioni calcio che determina la contrazione miocardica. Queste ultime fibre costituiscono il 99% delle cellule muscolari cardiache ed assicurano, con il movimento di contrazione e rilasciamento, un alto rendimento della pompa cardiaca.

Il comportamento delle fibre muscolari striate atriali e ventricolari è simile a quello di ogni altra cellula per quello che riguarda il potenziale di riposo, mentre si differenzia nello sviluppo del potenziale d'azione. Dovendo essere in grado di far rendere al massimo la pompa cardiaca, le fibre di conduzione atriali e ventricolari presentano delle risposte, allo stimolo elettrico, di tipo *rapido*; con un'ampiezza del potenziale d'azione di circa 105 mV e quindi un picco (spike) del potenziale di circa 20 mV, che risulta maggiore rispetto alla maggioranza delle cellule muscolari.



**Figura 2.6:** Il potenziale d'azione di una cellula del miocardio appartenente ad atri e ventricoli varia da -90mV a 30mV circa. Vengono riportati i flussi degli ioni ed il voltaggio che la membrana cellulare assume durante l'evento

Le fasi principali (Fig. 2.6) del potenziale d'azione delle cellule del miocardio comune (atriali e ventricolari) sono 5: depolarizzazione rapida, ripolarizzazione precoce, fase del "plateau", ripolarizzazione, fase di ripristino (o redistribuzione).

Qualsiasi avvenimento che causi un innalzamento del potenziale di riposo della membrana portandolo ad un valore critico, definito soglia, provocherà un potenziale d'azione. La depolarizzazione rapida che ha luogo durante la fase 0 è dovuta quasi esclusivamente all'ingresso rapido di  $\text{Na}^+$ , in seguito ad un veloce aumento della conduttanza della membrana allo ione stesso dovuta all'apertura di canali specifici. Normalmente, quando la membrana è a potenziale di riposo, il passaggio di sodio all'interno della membrana è pressoché nullo; ma, anche se minimo, esso porta il potenziale di membrana fino ad un valore pari a circa -65mV, definito "di soglia", dove i canali si

aprono completamente e lasciano fluire gli ioni  $\text{Na}^+$  dentro la membrana. Il continuo fluire di correnti di  $\text{Na}^+$  dirette verso l'interno della cellula fanno sì che l'interno stesso diventi carico positivamente rispetto all'esterno, realizzando una inversione della polarità di membrana che costituisce il cosiddetto overshoot del potenziale d'azione cardiaco e che tende ad opporsi all'ingresso di ioni  $\text{Na}^+$ , facendo poi chiudere i canali dello ione e concludendo la fase 0.

Una volta raggiunto il picco positivo (overshoot), si ha un breve periodo di parziale ripolarizzazione (fase 1) dovuta ad una corrente transitoria in uscita di ioni potassio  $\text{K}^+$  (detta  $I_{to}$ ) e ad un aumento della permeabilità al cloro, entrambi eventi causati dalla natura dei gradienti di concentrazione degli ioni, che altro non fanno se non cercare di riequilibrare, a livello chimico, le quantità di ioni tra i due lati della membrana.

Successivamente si entra nella fase 2, detta anche "di plateau". Durante il plateau del potenziale d'azione, il  $\text{Ca}^{2+}$  entra nella cellula attraverso suoi specifici canali, dipendenti dal voltaggio della membrana, che lavorano più lentamente di quelli del sodio. Nella fase di plateau le quantità di ioni  $\text{Ca}^{2+}$  che entrano nella membrana sono bilanciate da ioni  $\text{K}^+$  che escono dalla cellula con maggiore difficoltà rispetto alle fasi precedenti, dato che a causa della positività del potenziale di membrana, essa è meno permeabile al potassio. L'ingresso del  $\text{Ca}^{2+}$  nella cellula è responsabile del prolungarsi del potenziale di azione, infatti il plateau del potenziale persiste fino a quando l'efflusso di cariche tra potassio e calcio è bilanciato. Inoltre il  $\text{Ca}^{2+}$ , legandosi alle miofibrille intracellulari, determina la contrazione muscolare.

Il processo della ripolarizzazione finale (fase 3) ha inizio al termine della fase 2, quando la fuoriuscita di potassio dalla cellula cardiaca supera l'ingresso di  $\text{Ca}^{2+}$  e comincia a ripristinare il potenziale di riposo della cellula cardiaca, infatti con l'efflusso netto di cationi, il potenziale di membrana tende a diventare più negativo, permettendo a ioni potassio di fluire maggiormente.

Nell'ultima fase (fase 4) si ha il ripristino delle concentrazioni ioniche ai valori di riposo, mediante trasportatori attivi, quali: una pompa metabolica sodio-potassio (detta anche Na/K-ATPasi), uno scambiatore Na/Ca ed una Ca-ATPasi.

Mentre il potenziale ritorna al suo valore a riposo e i canali ionici inattivati tornano allo stato di riposo diventando di nuovo disponibili per l'attivazione, la membrana del cardiomiocita non è disponibile per un nuovo potenziale d'azione, almeno fino a quando essa non si sia ripolarizzata. Nello specifico vi sono due periodi, l'uno successivo all'altro, dove la membrana non è eccitabile: il primo, definito *Periodo Refrattario Assoluto* (tra la fase 0 e la fase 3), e il *Periodo Refrattario Relativo* (tra le fasi 3 e 4), successivo al PRA. Quest'ultimo periodo è indispensabile per il corretto funzionamento del cuore, poiché permette un alto rendimento della funzione di pompa del cuore, in

quanto il ventricolo può riempirsi completamente di sangue prima di eseguire un'altra contrazione; inoltre permette di avere una netta distinzione tra sistole (contrazione) e diastole (fase di riposo).

### 2.2.3 Il comportamento delle cellule “pacemaker”

Il comportamento elettrico delle cellule pacemaker è differente rispetto al resto dei tessuti eccitabili (muscolari e nervosi). Le "cellule segnapassi" non hanno un vero e proprio potenziale di riposo e generano potenziali d'azione spontaneamente in assenza di uno stimolo dal sistema nervoso.

Il loro potenziale di membrana è instabile, parte da circa -60 mV e lentamente sale verso il valore soglia, per poi innescare un potenziale d'azione una volta superato tale valore di soglia.

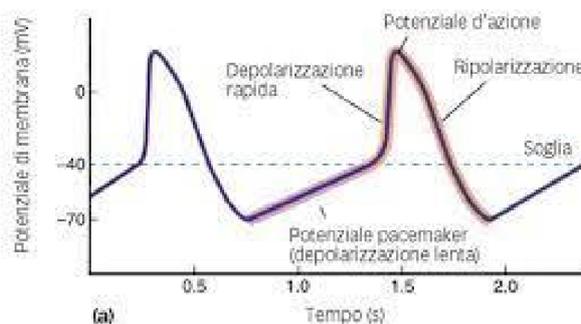


Figura 2.7: Potenziale d'azione di una cellula pacemaker

Questo primo stadio di depolarizzazione viene anche chiamato “depolarizzazione diastolica”, poiché avviene durante la diastole elettrica e durante tale fase sono aperti dei canali permeabili al  $\text{Na}^+$  e al  $\text{K}^+$ ; in particolare l'ingresso di  $\text{Na}^+$  supera l'uscita di  $\text{K}^+$  (il  $\text{Na}^+$  ha un gradiente elettrochimico maggiore rispetto al  $\text{K}^+$ ), il che provoca la lenta depolarizzazione della membrana.

Man mano che aumenta la depolarizzazione si verifica la chiusura dei canali di  $\text{K}^+$  e l'apertura di alcuni canali per il  $\text{Ca}^{2+}$ . Il successivo ingresso di calcio continua la depolarizzazione cellulare e il potenziale di membrana si muove gradualmente verso il valore soglia.

Raggiunta la soglia si aprono numerosi canali per il calcio voltaggio dipendenti, determinando la fase di rapida ascesa del potenziale d'azione. Quando i canali del calcio al picco del potenziale d'azione si chiudono, vengono aperti i canali lenti del  $\text{K}^+$  responsabili della fase di ripolarizzazione (fuoriuscita di  $\text{K}^+$ ). Infine c'è la fase di iperpolarizzazione (nella Fig. 2.7 è la parte di grafico sotto la linea della soglia) durante la quale c'è la redistribuzione delle concentrazioni di K, Na e Ca ai valori di riposo.

Attraverso cicli ripetuti di depolarizzazione e scarica, queste cellule autoritmiche iniziano ciclicamente potenziali d'azione che si propagano in tutto il cuore per indurre il battito cardiaco

senza stimolazione nervosa. Quindi le cellule pacemaker si distinguono per questi motivi: generazione spontanea dell'impulso, mancanza di potenziale di riposo, alto valore del potenziale di membrana e maggior frequenza nell'insorgenza dei potenziali d'azione.

## **2.3 Proprietà dei potenziali d'azione cardiaci**

### **2.3.1 Il valore di soglia**

La propagazione del potenziale d'azione è di tipo autorigenerativo. Se una cellula del cuore è depolarizzata, essa è capace di scatenare un potenziale d'azione nelle vicine cellule a riposo. Affinché uno stimolo sia però in grado di innescare una risposta rigenerativa, la depolarizzazione deve raggiungere una certa soglia. Infatti, piccole depolarizzazioni sotto soglia causano soltanto risposte locali sulla membrana cellulare, in quanto consentono l'apertura di una modesta quantità di canali voltaggio dipendenti, non sufficiente a generare correnti abbastanza ampie da attivare le cellule vicine. Una volta raggiunta la soglia, la seguente depolarizzazione non dipende più dall'entità dello stimolo depolarizzante iniziale ma è dovuto ad un intervento attivo della membrana che modifica le sue caratteristiche chimico-fisiche ed aumenta ulteriormente la conduttanza al sodio. Nasce in tal modo un fenomeno che si accresce a valanga del tutto indipendente dallo stimolo elettrico che lo ha generato. Le piccole depolarizzazioni sotto soglia possono avere importanti effetti sull'eccitabilità, in quanto una parziale depolarizzazione rallenta l'impulso di conduzione inattivando i canali del sodio.

### **2.3.2 L'eccitabilità**

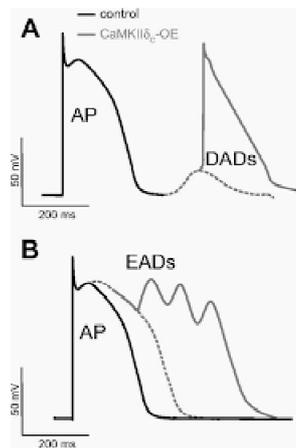
Il potenziale d'azione (PA) può essere registrato sperimentalmente eccitando la membrana con un impulso di corrente e misurando le conseguenti variazioni di potenziale; se lo stimolo applicato causa una depolarizzazione che supera il valore di soglia si ha la generazione del PA. Una volta che questo 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  $\text{Na}^+$  si riattivano. A questo intervallo segue il periodo refrattario relativo, in cui, nel caso delle fibre a risposta rapida (facenti parte del miocardio comune nei tessuti atriali e ventricolari), 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  $\text{Na}^+$ , ritornando nella norma.

Il periodo refrattario relativo delle fibre a risposta lenta (miocardio specifico, cellule autoritmiche) invece, si protrae frequentemente oltre la fase 3, ed anche dopo che la cellula si è completamente ripolarizzata è difficile per un certo periodo di tempo evocare una risposta propagata: questa caratteristica è detta refrattarietà post-ripolarizzazione. I potenziali d'azione indotti nelle fibre a risposta lenta in una fase precoce del loro periodo refrattario relativo sono più piccoli ed hanno una fase di ascesa meno ripida, e l'ampiezza e la pendenza della fase ascendente incrementano progressivamente se i potenziali d'azione sono evocati più tardivamente. Inoltre nelle fibre a risposta lenta il recupero della piena eccitabilità è più lento che nelle fibre a risposta rapida, ed i potenziali indotti in una fase più precoce del periodo refrattario relativo sono condotti ad una velocità inferiore a quella con cui sono condotti i potenziali evocati in una fase più tardiva.

### **2.3.3 Le depolarizzazioni successive**

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



**Figura 2.8:** Le post-depolarizzazioni tardive e precoci risultano uno dei principali motivi dell'insorgere di aritmie cardiache. (A) presenta quelle tardive, le DAD; mentre (B) quelle precoci, le EAD

Le post-depolarizzazioni si distinguono in due branche (Fig. 2.8):

- 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  $\text{Ca}^{2+}$  nel miocita, generalmente dovuto al precedente PA, che genera correnti anomale depolarizzanti. Le DAD possono dar luogo ad extrasistoli, un battito prematuro o una scarica di impulsi; possono essere causate da catecolamine e digitalici (farmaci cardiotonici) e vengono favorite dalla tachicardia.
- Post-depolarizzazioni precoci (*Early After-Depolarizations*, **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  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{CaL}$ ) e/o dal rilascio spontaneo di  $\text{Ca}^{2+}$  da parte del reticolo sarcoplasmatico (nella fase 2 di plateau) o indotte dalla diminuzione della conduttanza del  $\text{K}^+$ , con conseguente riduzione dell'intensità della corrente  $I_{K1}$  (nella fase 3 di ripolarizzazione). L'ipokaliemia, ovvero la carenza di  $\text{K}^+$  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  $I_{CaL}$ ; tale aritmia può condurre alla fibrillazione ventricolare, che senza un adeguato intervento medico causa il decesso.

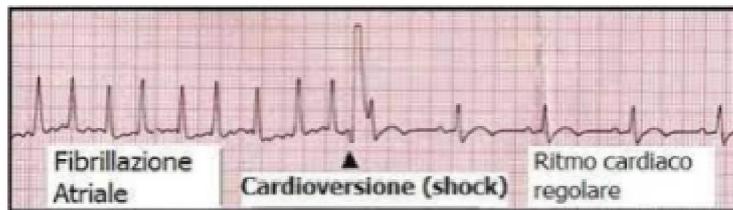
### **2.3.4 Il rientro**

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

## **2.4 Principali forme di disturbi cardiaci**

Il cuore è un organo che funziona, grazie al suo particolare tipo di tessuto muscolare, in modo automatico. Tuttavia anche questo automatismo può essere influenzato e dare vita a disturbi di vario genere: l'attività cardiaca elettrica induce l'attività meccanica, quindi i pattern elettrici anormali, che possono essere individuati attraverso lo studio dell'elettrocardiogramma (ECG), sono tipicamente accompagnati da attività contrattile anormale. Le principali forme di disturbo, a livello cardiaco, possono riguardare l'anormalità del ritmo e della frequenza cardiaca, malattie del miocardio e l'inibizione di meccanismi proteici (o la lesione di tessuti cardiaci) dovuta alla cardiotossicità di alcuni composti biologici compresi nei farmaci.

## 2.4.1 Irregolarità ritmiche del cuore



**Figura 2.9:** L'elettrocardiogramma (ECG) varia la sua forma a seconda degli eventi elettrici che insorgono nel cuore. Il ritmo cardiaco regolare avrà quindi una rappresentazione grafica differente da quella di un evento aritmico come la fibrillazione atriale, che è caratterizzata da attività elettrica irregolare che porta a perdere la funzione meccanica di contrazione degli atri.

La frequenza cardiaca può essere determinata in base alla distanza tra due complessi QRS consecutivi sulla carta millimetrata usata per registrare un ECG. Mentre con il termine ritmo cardiaco si designano la regolarità o gli intervalli delle onde elettrocardiografiche. Una frequenza cardiaca può essere riconosciuta come anomala in due casi: se essa è elevata, superiore a 100 battiti/min, è detta tachicardia, mentre una frequenza inferiore a 60 battiti/min è detta bradicardia. Ogni anomalia rispetto al ritmo e alla sequenza di eccitazione normali del cuore è detta aritmia. Per aritmia si intende una condizione clinica nella quale viene a mancare la normale frequenza o la regolarità del ritmo cardiaco (Fig. 2.9), ovvero è alterata la fisiologica sequenza di attivazione atrio-ventricolare. Un ritmo è regolare quando la distanza fra i battiti consecutivi non supera i 160 ms e si parla di una conduzione normale quando all'ECG l'onda P è  $<120$  ms, l'intervallo PR non supera i 200 ms e il complesso QRS è di durata  $<100$  ms. L'aritmia può essere causata da foci ectopici, alterazioni dell'attività pacemaker del nodo SA o da interferenza con la conduzione (circuiti di rientro dell'impulso non mantenuti, focus trigger che lancia un prematuro fronte di eccitazione). In particolare, se l'aritmia deriva da alterazioni nella formazione dell'impulso vi possono essere due principali motivazioni: automatismo anomalo del nodo SA, che genera da sé PA "fuori ritmo", oppure attività triggered di un focus differente dal nodo SA, che accade quando il focus ha frequenza maggiore del nodo SA, per aumentata attività del primo o ridotta attività del secondo. Le extrasistole (o PVC) che hanno origine da un focus ectopico, sono deviazioni comuni dal ritmo normale. Altre anomalie del ritmo facilmente identificabili su un elettrocardiogramma comprendono: il flutter atriale (un'aritmia con contrazione degli atri molto rapida e sincronizzata, dove la frequenza atriale può arrivare a 250-350 impulsi al minuto), la fibrillazione atriale, la fibrillazione ventricolare e il blocco cardiaco.

## 2.4.2 Cardiotossicità

A seguito della loro diagnosi spesso questi disturbi vengono trattati con farmaci particolari, detti aritmici, classificati in base al meccanismo d'azione, ossia in base a quali canali ionici siano inclini a bloccare, i quali sono legati a loro volta con i vari effetti avversi che si vogliono inibire. La selezione di tali farmaci è lunga e precisa poiché vengono applicati su uno degli organi vitali più importanti del corpo umano. Tra i vari test, quello riguardante la cardiotossicità è generalmente fra quelli di maggior spessore. La cardiotossicità è infatti un'azione lesiva sul tessuto cardiaco, spesso irreversibile, talvolta letale, indotta a seguito della somministrazione acuta o cronica di particolari farmaci, detti appunto cardiotossici per il loro effetto tossico sia diretto (per es., miocardiopatia iatrogena) sia indiretto. Diversi composti farmaceutici, non solo prettamente medicinali indicati per uso cardiaco, potrebbero interferire con le funzioni cardiache e produrre aritmie particolarmente rischiose per la vita del paziente. Negli Anni '90 per esempio, una sequenza di report, che riportava la dimostrazione di come alcuni medicinali inducessero l'apparizione di tachicardia ventricolare caratterizzata da complessi QRS che variano progressivamente in ampiezza e morfologia (Torsione di Punta) concomitata con l'elongazione della durata dell'intervallo QT, permise di ritirare 14 medicinali dal mercato. Attraverso una serie di successivi studi è stato determinato che la durata del PA e il prolungamento dell'intervallo QT possono non solo facilitare la creazione di EADs (early after-depolarization), ma possono anche promuovere l'eterogeneità della ripolarizzazione lungo il tessuto cardiaco, ponendo il tessuto stesso sotto un possibile costante stress aritmico (negli studi moderni è stato in realtà notato come l'intervallo QT prolungato non sia marcatore abbastanza preciso per valutare la responsabilità pro-aritmica di un farmaco). A partire da questi studi, nel 2005, sono state delineate delle linee guida per la verifica di nuovi farmaci, in ambito preclinico e clinico, rispetto alla sicurezza cardiaca, e quindi rispetto alla capacità cardiotossica e di generare focus aritmici di tali nuovi farmaci.

# CAPITOLO 3

## MODELLIZZAZIONE E SIMULAZIONE DELL' ELETTRFISIOLOGIA

Un modello è la rappresentazione di un oggetto o di un fenomeno, atta a riprodurre alcune caratteristiche o comportamenti fondamentali quando l'oggetto modellato non sia direttamente accessibile o non completamente noto. L'elettrofisiologia cardiaca utilizza i modelli per riprodurre i meccanismi alla base della generazione del potenziale d'azione, in quanto sperimentazioni ed indagini dirette sul cuore umano o animale risultano particolarmente complesse, invasive, ed eticamente discutibili. Negli ultimi anni, la disponibilità di dati sperimentali ha portato allo sviluppo di modelli matematici sempre più complessi e correlabili biologicamente. Attualmente sono stati creati modelli di diversi tipi di cellule cardiache: atriali, ventricolari, seno-atriali, fibre del Purkinje. In particolare, si è cercato di riprodurre i meccanismi dei canali ionici transmembrana, di compartimentalizzare la cellula e di studiare la distribuzione delle proteine in diverse regioni del citoplasma. Grazie allo sviluppo dei modelli matematici cardiaci ora è possibile prevedere l'evoluzione di un sistema biologico in funzione di stimoli diversi anche in situazioni non verificabili sperimentalmente, formulare e validare quantitativamente ipotesi biologiche, e ricostruire interi segnali (potenziali di azione, segnali pseudo-elettrocardiografici).

### 3.1 Cenni storici sulla modellistica matematica del cuore e dei potenziali d'azione

I primi modelli di potenziale d'azione (PA) cardiaco risalgono al 1960, anno in cui Denis Noble, incentivato dalla scoperta delle componenti entrante e rettificante ritardata del flusso attraverso la membrana cellulare di ioni potassio  $I_K$ , pubblicò il primo modello matematico di PA di fibre del Purkinje [13] adattando le equazioni formulate da Hodgkin-Huxley (1952) per riprodurre le caratteristiche di durata del PA cardiaco. L'evoluzione storica ha consentito la distinzione tra modelli di PA di prima e seconda generazione. I primi, sviluppati tra il 1960 ed il 1985, concepiti a

partire da cellule animali, sono caratterizzati da una maggior semplicità computazionale (dovuta alle ridotte capacità di calcolo) nell'elaborazione delle concentrazioni ioniche intracellulari fisse. Il modello di Di Francesco-Noble (1985) è il primo a chiarire l'esistenza di meccanismi di pacemaking e di pompe e scambiatori ionici (Fig. 3.1) per spiegare le concentrazioni ioniche durante l'attività elettrica delle fibre del Purkinje.

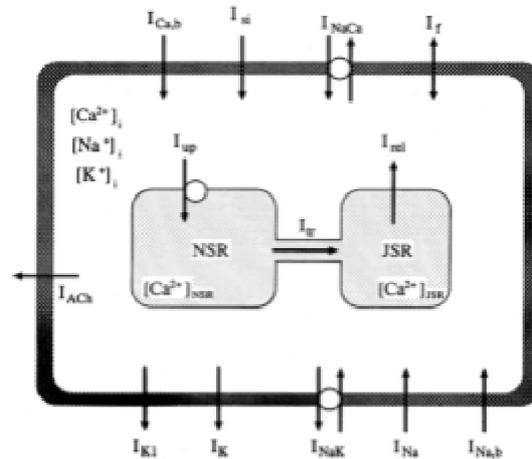
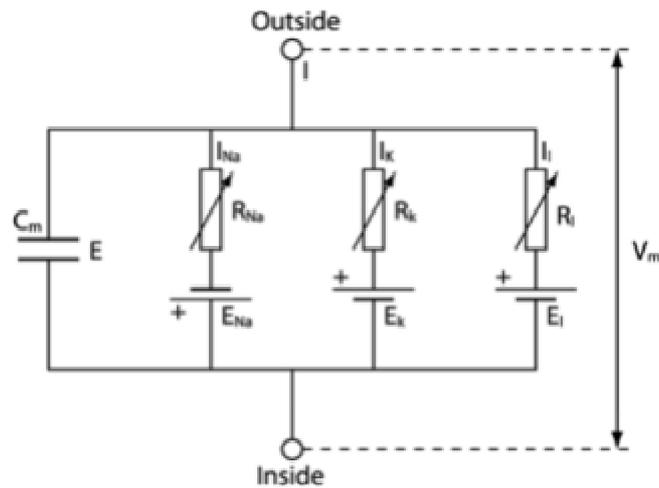


Figura 3.1: Il modello di Di Francesco-Noble (1985).

Esso rappresenta il punto di partenza per i modelli della seconda generazione. In quest'ultimi le concentrazioni ioniche sono rappresentate come variabili di stato; la disponibilità di dati sperimentali più accurati e specifici ed il parallelo sviluppo dei sistemi informatici rende possibile dettagliare meglio la fisiologia del miocardiocita definendo altri processi endocellulari (transiente di  $[Ca^{2+}]_i$  ad esempio).

Il modello di Priebe-Beuckelmann (1998) è il primo a rappresentare il potenziale d'azione ventricolare umano. A partire da questo, i modelli cardiaci umani hanno acquistato sempre più dettagli e caratteristiche fino a giungere ai modelli oggetto di studio di questo elaborato. La 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 il loro utilizzo nell'ambito della sperimentazione farmacologica.

Matematicamente, i modelli del PA e della propagazione della loro onda elettrica che vengono analizzati in questa tesi, sono rappresentati da equazioni differenziali che descrivono le variabili di stato che caratterizzano il sistema, ad esempio le concentrazioni di  $Ca^{2+}$  intracellulari, i flussi ionici, le correnti di membrana, i ratei di transizione dei canali ionici. L'apertura e la chiusura dei canali è governata da variabili di gating espresse secondo la concezione di Hodgkin e Huxley o attraverso i modelli markoviani.



**Figura 3.2:** Corrispettivo elettrico della membrana cellulare

Il modello di Hodgkin-Huxley si basa su di una serie di esperimenti effettuati su assoni giganti di calamaro che hanno fornito una completa descrizione quantitativa delle variazioni di permeabilità della membrana a  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , permettendo di descrivere matematicamente la depolarizzazione della membrana cellulare. Secondo Hodgkin e Huxley (HeH), in termini di analogo elettrico (Fig. 3.2) 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. La tecnica di modellazione di HeH supponeva che il passaggio degli ioni attraverso la membrana permeabile fosse governato da meccanismi dipendenti dal voltaggio della membrana, regolanti i flussi di  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  come dei “cancelli”. La regolazione dei flussi, e quindi della permeabilità della membrana ai vari ioni (conduttanza), viene studiata mediante una serie di esperimenti in voltage-clamp: attraverso uno strumento che genera impulsi ad onda quadra, il potenziale viene mantenuto costante e vengono analizzate le correnti ioniche che permettono il mantenimento di tale potenziale. Dai risultati ottenuti, i due scienziati hanno dedotto le equazioni delle correnti ioniche ( $I_x$ ) e della conduttanza ( $g_x$ ):

$$I_x = g_x * (V - E_x) \quad (3.1)$$

$$g_x = g_{x-ax} * \prod_x p_x \quad (3.2)$$

La corrente ionica deriva dal prodotto tra la conduttanza e la driving force, ovvero la differenza tra il potenziale di membrana ( $V_m$ ) e quello dell'equilibrio di Nernst dello ione  $x$  ( $E_x$ ); mentre la conduttanza è espressa come prodotto tra il massimo valore raggiungibile dalla conduttanza per uno

specifico ione ( $g_{x-max}$ ) ed una combinazione di termini legati alla permeabilità di membrana allo ione ( $p_x$ ), che risultano essere adimensionali e che assumono valori compresi tra [0,1]. Di questi ultimi, Hodgkin e Huxley ne definiscono tre:  $m$ ,  $n$ ,  $h$ , che rappresentano le capacità di attivazione/inattivazione dei canali in cui fluiscono gli ioni. Le variabili  $m$ ,  $n$ ,  $h$  vengono definite come variabili di gating, ossia variabili che esprimono la probabilità dei gate interni ai canali di essere aperti, oppure che rappresentano la frazione di gate aperti in un dato istante sul totale dei gate. Inoltre vengono assunte indipendenti tra loro (un canale può trovarsi in uno stato indipendentemente da quello precedente).

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

$$C_m \frac{dV_m}{dt} + g_K(V_m - E_K) + g_{Na}(V_m - E_{Na}) + g_L(V_m - E_L) = I_{ext} \quad (3.3)$$

Dove  $g_i$  rappresenta le conduttanze dei singoli ioni,  $E_i$  rappresenta i potenziali di equilibrio degli ioni (derivati dall'equazione di Nernst),  $C_m$  è la capacità della membrana (descritta come condensatore) e  $V_m$  è il potenziale di membrana. Particolari sono  $g_L$  ed  $E_L$ , che rappresentano rispettivamente la conduttanza di leakage (perdita) e il corrispondente potenziale di inversione.

Oltre al modello di HeH vennero creati altri modelli che esprimessero direttamente gli stati dei canali, e la loro interdipendenza. I modelli markoviani studiano la dipendenza delle transizioni di stato del canale, in funzione del suo stato attuale. In ambito elettrofisiologico vengono utilizzati anche diagrammi che descrivono gli stati del canale e le transizioni che avvengono tra di loro (Fig. 3.3).

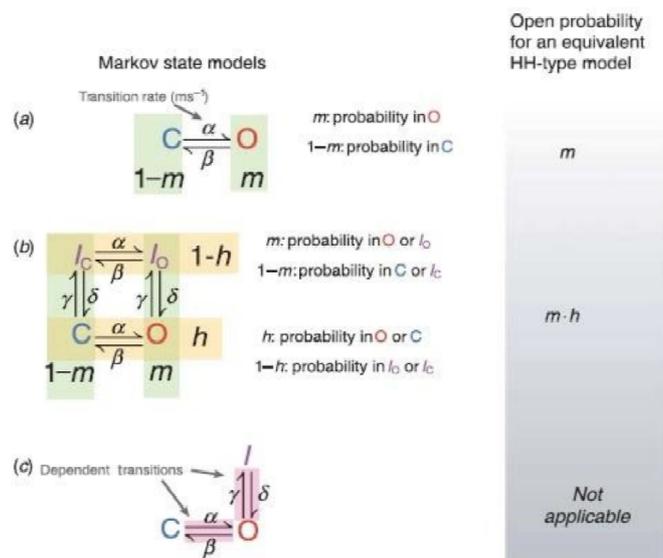


Figura 3.3: I modelli markoviani descrivono gli stati dei canali e le transizioni tra loro. Vi sono modelli con due stati (a), tre stati (c), quattro stati (b)

Un modello markoviano che rappresenta un ipotetico canale con solo due stati, aperto o chiuso, può essere descritto dalle equazioni differenziali del primo ordine:

$$\frac{dC}{dt} = -\alpha C + \beta O \quad \frac{dO}{dt} = \alpha C - \beta O \quad (3.4)$$

dove  $O$  e  $C$  sono la probabilità che ha il canale di essere rispettivamente nello stato aperto e chiuso;  $\alpha$  e  $\beta$  sono invece i ratei cinetici di transizione voltaggio dipendenti da uno stato all'altro. I modelli markoviani pertanto permettono una rappresentazione più simile alla realtà dei canali e descrivono transizioni dipendenti fra loro. Ciò si ricava dalle equazioni differenziali descritte precedentemente che mostrano i legami tra stati adiacenti legati proporzionalmente ai propri ratei di transizione.

Su queste basi si fondano i modelli successivi sempre più specifici e precisi nella rappresentazione dei potenziali d'azione. Negli ultimi 50 anni sono stati sviluppati centinaia di modelli di PA cardiaci negli animali, in particolare nell'uomo. I vari modelli si differenziano in base al modello della cellula cardiaca che si vuole analizzare: nodo seno-atriale [55 Kugler], fibre di Purkinje [24], cellule atriali [18], [19], e ventricolari umane [20], [22], [25], ed anche cellule staminali pluripotenti indotte (hiPSC-CMs) [21], [23]. Il livello di complessità matematica varia da semplici descrizioni fenomenologiche con un numero limitato di variabili di stato e parametri, a modelli molto più dettagli e meccanicistici basati su un enorme quantità di variabili e parametri.

## 3.2 Modelli matematici del potenziale d'azione cardiaco

I modelli matematici di potenziali d'azione di una singola cellula si basano sui modelli HeH e markoviani sopra riportati. Essi sono sistemi non lineari composti da equazioni differenziali ordinarie (EDO) che descrivono la membrana della cellula come se fosse un condensatore con capacità  $C_m$ . In questo modo è possibile modellare il voltaggio transmembrana  $V_m$  e le dinamiche delle correnti ioniche attraverso la membrana:

$$I_{ion}(V, t) = N_{ion} \cdot O_{ion}(V, t) \cdot i_{ion}(V) \quad (3.5)$$

con  $i_{ion}(V)$  che rappresenta la relazione voltaggio-corrente di un singolo canale,  $N_{ion}$  che è il numero totale di canali specifici per lo ione ed  $O_{ion}$  descrive la probabilità che un canale sia aperto con valore tra  $[0,1]$ . Simulando il canale ionico come un resistore ohmico, la relazione voltaggio-corrente si può scrivere in modo lineare:

$$i_{ion}(V) = g_{ion}(V_m - V_{ion}). \quad (3.6)$$

Dove  $g_{ion}$  è la conduttanza riferita ad un singolo canale adoperato da uno specifico ione, e la massima conduttanza della membrana per la corrente ionica  $I_{ion}$  è quindi  $G_{ion} = g_{ion} N_{ion}$ .

Altri tre modelli del PA delle cellule/fibre muscolari cardiache sono il modello di Noble che riguarda l'analisi e la modellizzazione di potenziali cardiaci appartenenti alle fibre di Purkinje di un cuore umano, il modello O'Hara-Rudy che illustra la risposta di un potenziale d'azione in un cardiomiocita ventricolare, ed infine il modello Paci dove viene presentato un modello di potenziale d'azione in un hiPSC-CMs (cellule staminali umane pluripotenti indotte a cardiomiociti). Questo modello analizza effetti e conseguenze di eventi chimici (tra cui anche la somministrazione di farmaci) su cardiomiociti derivati in vitro da cellule staminali pluripotenti.

### 3.2.1 Il modello di Noble

Nel 1960 Denis Noble sviluppa un modello capace di descrivere matematicamente l'attività elettrica delle cellule delle fibre del Purkinje sulla base del modello di assone gigante di calamaro di Hodgkin-Huxley. È il primo modello riferito a potenziali d'azione cardiaci e non nervosi.

Il modello di Noble mantiene la visione sviluppata da HeH della membrana cellulare come un circuito elettrico, infatti il sistema matematico che descrive l'eccitabilità delle fibre del Purkinje è composto da 4 equazioni differenziali:

$$\begin{aligned}
 C \frac{dV}{dt} &= - (I_{Na} + I_K + I_L); \\
 \frac{dm}{dt} &= \alpha_m(V)(1 - m) - \beta_m(V)m; \\
 \frac{dh}{dt} &= \alpha_h(V)(1 - h) - \beta_h(V)h; \\
 \frac{dn}{dt} &= \alpha_n(V)(1 - n) - \beta_n(V)n.
 \end{aligned} \tag{3.7}$$

Dove la prima equazione riprende l'equazione caratteristica del condensatore, in linea con l'assunzione che la membrana sia modellabile come un circuito elettrico (figura 2), e rappresenta come il sistema si evolve nel tempo. Le altre 3 equazioni descrivono l'andamento temporale della variabile di gating:  $n$  è riferita all'attivazione del canale di potassio, mentre  $m$  e  $h$  riguardano l'attivazione e l'inattivazione, rispettivamente, del canale del sodio. Con  $\alpha$  e  $\beta$ , funzioni del potenziale di membrana  $V$ , si indicano rispettivamente i rapporti cinetici di transizione dallo stato chiuso a quello aperto e viceversa. Tali rapporti (misurati in [1/ms]) hanno differenti valori, dipendenti dal voltaggio di membrana ( $V$ ) e dalla variabile di gating a cui fanno riferimento:

$$\begin{aligned}
\alpha_n(V) &= \frac{0.0001(-V - 50)}{e^{\frac{-V-50}{10}} - 1}, & \beta_n(V) &= 0.002e^{\frac{-V-90}{80}}, \\
\alpha_m(V) &= \frac{0.1(-V - 48)}{e^{\frac{-V-48}{15}} - 1}, & \beta_m(V) &= \frac{0.12(V + 8)}{e^{\frac{V+8}{5}} - 1}, \\
\alpha_h(V) &= 0.17e^{\frac{-V-90}{20}}, & \beta_h(V) &= \frac{1}{e^{\frac{-V-42}{10}} + 1}
\end{aligned} \tag{3.8}$$

A partire dalle equazioni differenziali delle variabili di gating è possibile ricavare, per ognuna di esse, l'espressione per il valore a regime  $p_{i\infty}(V)$ , ossia il valore che verrebbe raggiunto dopo un tempo proporzionale alla costante di tempo mantenendo condizioni costanti nel sistema, e per la costante di tempo  $\tau_i(V)$ :

$$p_{i\infty}(V) = \alpha_i \frac{V}{\alpha_i(V) + \beta_i(V)}; \quad \tau_i(V) = \frac{1}{\alpha_i(V) + \beta_i(V)}; \tag{3.9}$$

Riscrivendo quindi le equazioni delle variabili di gating sfruttando il loro valore a regime e la costante di tempo, si ottiene la seguente equazione:

$$\frac{dp_i}{dt} = \frac{p_{i\infty}(V, t) - p_i(t)}{\tau_i(V)} \tag{3.10}$$

che ha come soluzione

$$p_i(t) = p_{i\infty}(V, t) - [p_{i\infty}(V, t) - p_0] * e^{-t/\tau_i} \tag{3.11}$$

dove  $p_0$  è il valore della variabile di gating all'istante  $t=0$ .

Noble applica delle modifiche sulla corrente di  $\text{Na}^+$ , riuscendo a replicare il plateau caratteristico del potenziale d'azione delle cellule cardiache. In questo modello sono considerate solo tre correnti: una corrente entrante di  $\text{Na}^+$  ( $I_{Na}$ ), una uscente di  $\text{K}^+$  ( $I_K$ ) e una corrente di leakage ( $I_{leak}$ ), attribuita ad un flusso generico di anioni. Ognuna con la sua formulazione ohmica:

$$\begin{aligned}
I_{Na} &= (g_{Na} m^3 h + 0.14)(V - V_{Na}); \\
I_K &= \left(1.2e^{\frac{-V-90}{50}} + 0.015e^{\frac{V+90}{60}} + g_{K_2} n^4\right)(V - V_K); \\
I_{leak} &= g_L(V - V_L).
\end{aligned} \tag{3.12}$$

Tali modifiche hanno dimostrato che i canali del sodio sono più numerosi nelle cellule cardiache rispetto alle cellule nervose e che esistono altri canali veicolanti una corrente entrante.

### 3.2.2 Modello O'Hara-Rudy di un cardiomiocita ventricolare

Il modello O'Hara-Rudy (OR dynamic, abbreviato ORd, 2011) è il modello ventricolare umano più recente. L'obiettivo degli autori è stato quello di riprodurre un'estesa gamma di comportamenti fisiologici, quali la dipendenza della durata del potenziale d'azione (APD) dalla frequenza, la curva di restituzione dell'APD e l'azione della Calmodulina (proteina legata al  $\text{Ca}^{2+}$ ) e della sua protein-chinasi *CaMK* (ossia della sua capacità di accoppiamento con altre proteine) sulle correnti ioniche e sul  $\text{Ca}^{2+}$ . Il modello è stato formulato sulla base di nuove misure per la corrente  $I_{\text{CaL}}$  (flusso di ioni calcio entrante attraverso canali di tipo *L-type*, caratterizzati da una velocità di attivazione/inattivazione molto lenta), per le correnti del  $\text{K}^+$  e per la corrente dello scambiatore  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , ottenute da cellule ventricolari umane sane (più di 100 cuori).

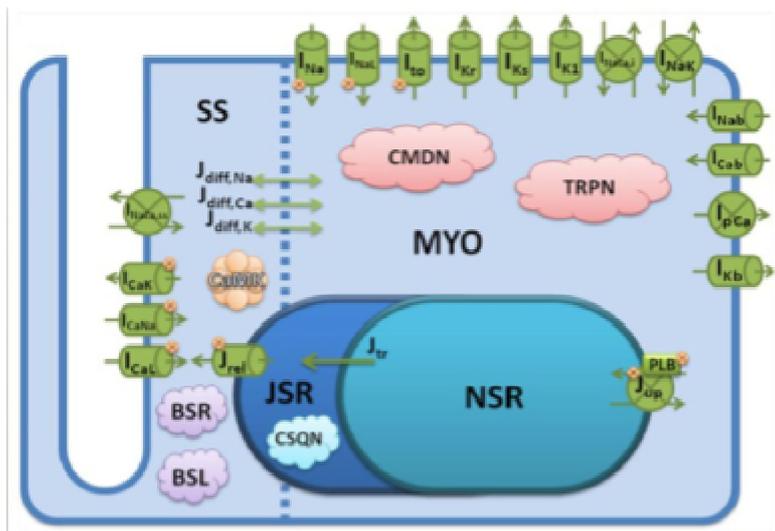


Figura 3.4: Rappresentazione del modello ORd

La rilevazione di una diversa concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  attorno alla membrana sarcoplasmatica endocellulare ha suggerito l'esistenza del *subspace* (o sub-sarcolemma, SS), ovvero una piccola regione interna alla cellula che divide i canali *L-type* del  $\text{Ca}^{2+}$  dalle cisterne terminali del reticolo sarcoplasmatico (SR) (Fig. 3.4). Il reticolo sarcoplasmatico (SR) funge da riserva per  $\text{Ca}^{2+}$  ed è suddiviso in due sub-compartimenti, il *Network Sarcoplasmic Reticulum* (NSR) ovvero un sistema di tubuli longitudinali di connessione tra una regione e l'altra, e il *Junctional Sarcoplasmic Reticulum* (JSR), corrispondente alle cisterne terminali del SR: zone dove sono più concentrati canali deputati al rilascio di  $\text{Ca}^{2+}$  necessario alla contrazione muscolare. Il *bulk cytosol* (MYO) è il citoplasma cellulare.

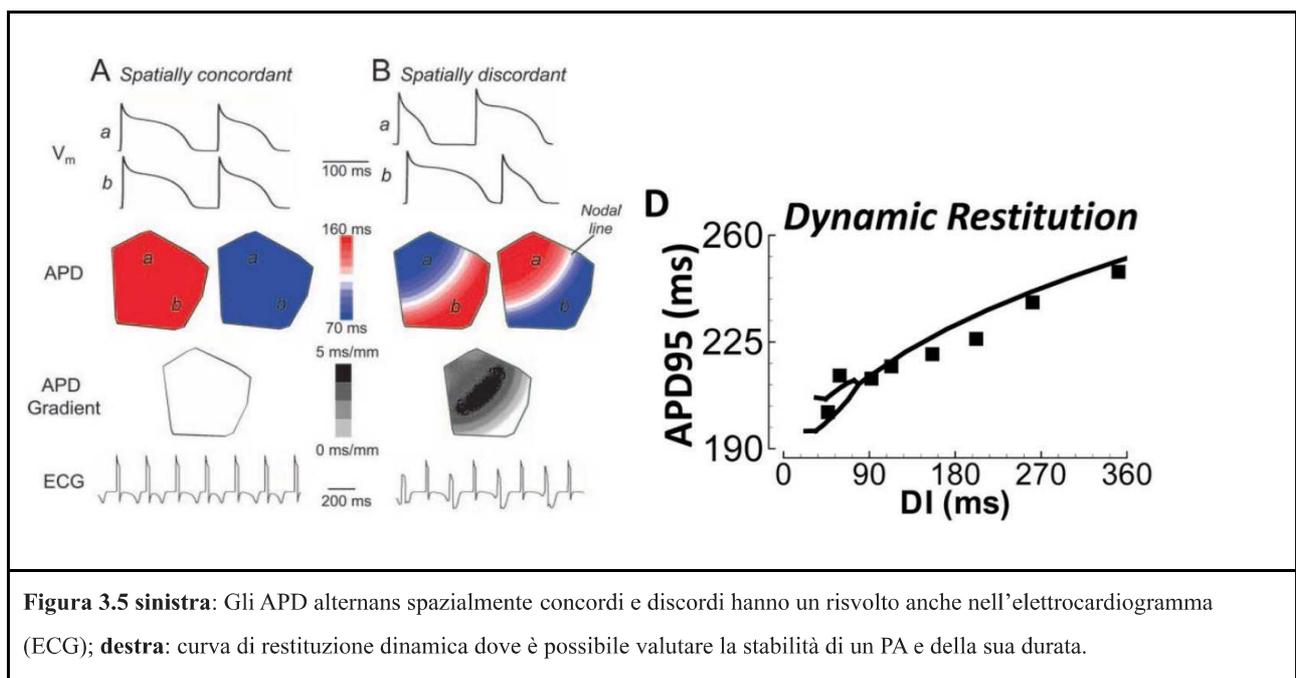
Dal punto di vista computazionale il modello ORd è descritto da 41 equazioni differenziali ordinarie di cui 10 sono necessarie per riprodurre gli effetti della protein-chinasi calmodulina dipendente

(CaMK). Pur derivando dal modello di Decker [27], le equazioni delle correnti presenti in ORd sono state ampiamente riadattate (corrente entrante di sodio  $I_{Na}$  rapida, corrente di uscita dei  $K^+$   $I_{to}$ , correnti rettificanti del potassio  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{K1}$ , correnti legate alle pompe metaboliche della membrana  $I_{NaCa}$ ,  $I_{NaK}$ ), ad eccezione dei buffer per  $Ca^{2+}$  e le correnti di background, che utilizzano le formulazioni di Decker con l'aggiustamento delle conduttanze.

Un'altra importante caratteristica del modello riguarda la descrizione delle dinamiche del  $Ca^{2+}$ .

Il flusso di  $Ca^{2+}$  in uscita dal SR è regolato dai canali ionici del calcio, descritti con un modello markoviano a 4 stati (Riposo (R), Aperto (O), a Riposo Inattivo (RI), Inattivo (I)). Il passaggio da una configurazione all'altra è mediato dalla concentrazione di  $Ca^{2+}$  nel SR. All'aumentare della frequenza di stimolazione si ha un incremento del flusso di  $Ca^{2+}$  transitorio in uscita dal reticolo: 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 (durata del PA fino al 90% della sua ripolarizzazione).

La CaMK, introdotta da O'Hara e Rudy, influenza il ciclo del  $Ca^{2+}$  in relazione alla frequenza cardiaca (inversamente proporzionale alla lunghezza del ciclo, data dalla somma tra le durate del PA della cellula e dell'intervallo diastolico). All'attivazione della CaMK possono seguire oscillazioni nella durata del potenziale d'azione (APD alternans) che a livello clinico si manifestano come alternans concordanti o discordanti (Fig. 3.5, sinistra).

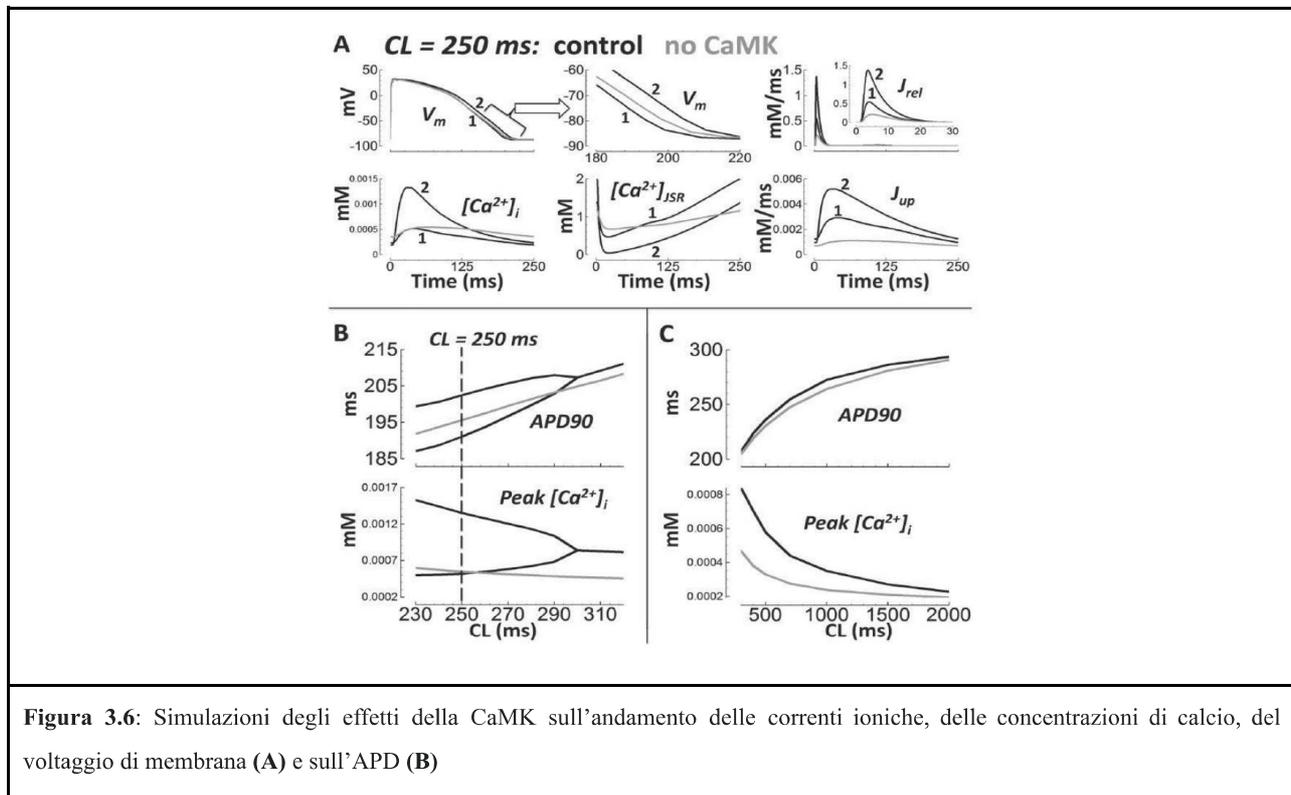


**Figura 3.5 sinistra:** Gli APD alternans spazialmente concordi e discordi hanno un risvolto anche nell'elettrocardiogramma (ECG); **destra:** curva di restituzione dinamica dove è possibile valutare la stabilità di un PA e della sua durata.

Nel primo caso tutte le regioni del tessuto hanno lo stesso pattern di alternans lungo-corto-lungo o corto-lungo-corto a livello di APD o di transiente di  $Ca^{2+}$ , mentre nel secondo alcune regioni seguono un pattern sfasato rispetto ad altre creando una linea di demarcazione (nodal line) in cui non è presente alcun tipo di alternans, dove può insorgere un blocco di conduzione dello stimolo.

In Figura 3.5 (destra) è riportato il grafico di dynamic restitution per DI (Intervalli Diastolici) corti ( $<360$  ms) ottenuto dalle simulazioni con il modello ORd, in cui è ben visibile la biforcazione per  $DI < 90$  ms (APD alternans), evento che ha un fortissimo legame con l'instabilità e la irregolarità dell'impulso elettrico che attraversa i tessuti miocardici.

Non sono tanto le instabilità nel potenziale di membrana a scatenare le alternans quanto gli squilibri nel ciclo del  $Ca^{2+}$ , che si ripercuotono sul potenziale e sull'APD attraverso tutte le correnti ioniche sensibili proprio a questo ione. Un elemento fondamentale per il controllo della *rate dependence* del ciclo del  $Ca^{2+}$  intracellulare nel modello ORd è la CaMK.



Si nota infatti (Fig.3.6B) come una soppressione della sua azione porti all'eliminazione dei punti di biforcazione, delle alternans ed alla riduzione dell'ampiezza dei transienti di  $Ca^{2+}$ , così come per l'intensità dei flussi di riassorbimento ( $J_{up}$ ) e di rilascio ( $J_{rel}$ ) di  $Ca^{2+}$  (Fig. 3.6A).

Però il silenziamento di questa proteina porta anche ad un incremento della concentrazione diastolica di  $Ca^{2+}$  all'interno del cardiomiocita. In questa situazione il muscolo non riesce a rilassarsi

in maniera corretta. Inoltre, si possono innescare una serie di meccanismi che causano squilibri nel ciclo metabolico e possono portare alla morte della cellula.

Un'ulteriore innovazione di questo modello è la sua capacità di riproduzione di post-depolarizzazioni precoci (*early after-depolarization*, EADs, vd. sezione 3.2.4.2), che sono importanti meccanismi aritmogeni. La loro comparsa è collegata al blocco di alcune correnti ioniche principali, alla velocità di ripolarizzazione e ai suoi effetti sulla  $I_{CaL}$ .

Il modello ORd è stato ampiamente 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. Infatti (Fig. 2.7) ha un'ottima capacità di adattamento durante la fase di rapida crescita del potenziale d'azione e, anche se non rispetta perfettamente la morfologia fisiologica della fase di ripolarizzazione, è possibile dimostrare che il modello mantiene gli equilibri elettrochimici di un normale PA (derivante da tessuto cardiaco umano sano).

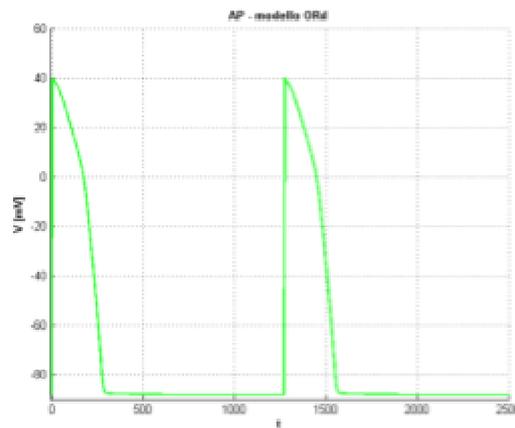


Figura 3.7: Simulazione grafica di un PA basata sul modello ORd, dove il potenziale V [mV] viene valutato in funzione del tempo t [ms]

### 3.2.3 Modello di una cellula staminale pluripotente indotta a cardiomiocita ventricolare

#### 3.2.3.1 Le cellule staminali pluripotenti indotte

Le cellule staminali sono cellule primitive, non specializzate, dotate della capacità di trasformarsi in diversi altri tipi di cellule del corpo attraverso un processo denominato differenziamento cellulare. Esse possono essere prelevate da diverse sorgenti: il cordone ombelicale, il sacco amniotico, il sangue, il midollo osseo, la placenta, i tessuti adiposi, la polpa dentale. Una cellula staminale deve soddisfare due proprietà: l'autorinnovamento, cioè la capacità di compiere un numero illimitato di

cicli replicativi, e la pluripotenza, ossia la capacità di dare origine a una o più linee o tipi cellulari tramite il differenziamento in uno dei qualsiasi tre foglietti embrionali (endoderma, mesoderma, ectoderma).

La cellula staminale pluripotente indotta (conosciuta anche come iPS o iPSC dall'inglese *Induced Pluripotent Stem Cell*) è generata artificialmente a partire da una cellula somatica adulta completamente differenziata nella quale vengono inseriti quattro geni codificanti fattori di trascrizione che ne inducono la conversione. L'utilizzo di questo tipo di cellule ha portato notevoli vantaggi permettendo di superare il problema etico dell'uso delle cellule staminali umane embrionali.

Le cellule iPSC vengono utilizzate per studiare la sindrome dell'intervallo QT allungato (LQTS, Long QT Syndrome in inglese). Il prolungamento anormale della fase di ripolarizzazione durante il PA di un ventricolo, dà luogo a un battito cardiaco aritmico che può sfociare in sincopi ed eventualmente in fibrillazione ventricolare.

### 3.2.3.2 Modello Paci di una hiPSC-CM ventricolare

I cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti non presentano un comportamento simile a quello di un cardiomiocita maturo: si comportano come se fossero cellule pacemaker del cuore in quanto hanno attività elettrica spontanea e la durata del PA risulta ridotta. I modelli matematici utilizzati finora per i PA di un cardiomiocita adulto risultano inadeguati per descrivere l'elettrofisiologia delle hiPSC-CM.

Il modello hiPSC-CM di Paci [11] è stato utilizzato nello studio di Paci M, Hyttinen J, Aalto-Setaa, pubblicato poi nel 2013: “*Computational Models of Ventricular and Atrial-Like Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes*”, per riprodurre il PA spontaneo di tipo ventricolare.

Poiché il modello è basato sul formalismo HeH, il potenziale di membrana è formulato come:

$$C \frac{dV}{dt} = - \left( I_{Na} + I_{CaL} + I_f + I_{K1} + I_{Kr} + I_{Ks} + I_{to} + I_{NaCa} + I_{NaK} + I_{pCa} + I_{bNa} + I_{bCa} + I_{NaL} - I_{stim} \right) \quad (3.13)$$

dove C è la capacità di membrana e V è il potenziale di membrana.  $I_{stim}$  è la corrente di stimolo, che è stata utilizzata per replicare specifici protocolli sperimentali di test farmacologici nella pubblicazione originale.

La concentrazione intracellulare di  $K^+$  è mantenuta costante, per una legittima approssimazione, poiché la quantità di  $K^+$  trasferita tra i compartimenti intracellulari ed extracellulari è molto bassa

rispetto alla concentrazione intracellulare di  $K^+$ . Le altre concentrazioni di ioni sono descritte come segue:

$$\begin{aligned} \frac{dNa_i}{dt} &= \frac{I_{Na} + I_{bNa} + 3I_{NaK} + 3I_{NaCa}}{FV_c} \\ \frac{dCa_{i,total}}{dt} &= I_{leak} - I_{up} + I_{rel} - \frac{I_{CaL} + I_{bCa} + I_{pCa} - 2I_{NaCa}}{FV_c} \\ \frac{dCa_{SR,total}}{dt} &= \frac{V_c}{V_{SR}}(I_{up} - I_{rel} - I_{leak}) \end{aligned} \quad (3.14)$$

dove  $F$  rappresenta la costante di Faraday,  $V_c$  e  $V_{SR}$  sono rispettivamente il volume citosolico e sarcoplasmatico,  $Ca_{i,total}$  e  $Ca_{SR,total}$  sono rispettivamente la concentrazione intracellulare e sarcoplasmatica di  $Ca^{2+}$ .

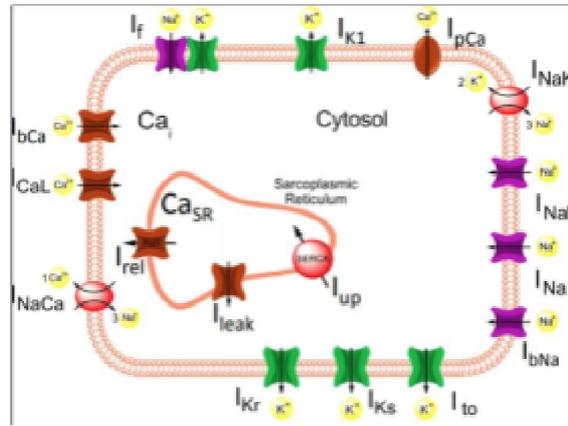


Figura 3.8: Rappresentazione grafica del modello Paci per hiPSC-CMs

Con riferimento alla Figura 3.8, il modello presenta:

- Correnti ioniche: corrente  $I_{CaL}$  dei canali L-type, corrente  $I_{Kr}$  di rettifica rapida ritardata, corrente  $I_{Ks}$  di rettifica lenta ritardata, corrente transitoria in uscita di  $K^+$   $I_{to}$ , corrente rettificata in ingresso  $I_{k1}$ , corrente delle cellule pacemaker o di iperpolarizzazione  $I_f$ , corrente di ioni  $Na^+$   $I_{Na}$  e  $I_{NaL}$  (lenta), correnti di background  $I_{bCa}$  ( $Ca^{2+}$ ) e  $I_{bNa}$  ( $Na^+$ ) (le correnti di background sono prive di fondamenti sperimentali, e spesso vengono utilizzate per bilanciare il comportamento generale della cellula);
- Scambiatori di ioni  $Na^+/Ca^{2+}$ , con rispettivo flusso di corrente  $I_{NaCa}$ ;
- Pompe ioniche e metaboliche per ioni  $Na^+/K^+$  ( $I_{NaK}$ ) e pompa sarcolemmale del  $Ca^{2+}$  ( $I_{pCa}$ );

- Flussi da/verso il SR: corrente di rilascio del  $\text{Ca}^{2+}$  nel SR  $I_{rel}$  (che deriva dal ciclo calcio dipendente CICR), pompa Serca ( reticolo sarco-endoplasmatico  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasi) e corrente di leak  $I_{leak}$ ;

$I_{Na}$ ,  $I_{CaL}$ ,  $I_f$ ,  $I_{to}$ ,  $I_{K1}$ ,  $I_{Kr}$  e  $I_{Ks}$  sono state testate sui dati sperimentali o sono state adattate a modelli precedenti di hESC-CM.

Ogni corrente è espressa nel modello attraverso equazioni lineari che seguono lo schema generale dettato da HeH:  $I = G_{i,max} * x^a * y^b * \Delta V$ ; dove  $G$  è la massima conduttanza di un canale per uno specifico ione,  $x$  e  $y$  rappresentano le variabili di gate per il canale ionico e  $\Delta V$  è la “driving force” che permette il flusso di corrente.

Per mostrare la capacità del modello di riprodurre comportamenti elettrofisiologici di una coltura di hiPSC-CMs, sono stati eseguiti esperimenti [28] su alcuni biomarcatori morfologici dei PA: lunghezza di ciclo (*Cycle Length*), tasso di battito spontaneo espresso in bpm; *MDP*: massimo potenziale diastolico; *peak*: tensione massima raggiunta dal PA; *APA*: ampiezza del potenziale d'azione, calcolata da MDP al picco;  $V_{max}$ : il valore massimo della pendenza durante la salita del PA; *APD10*, *APD30* e *APD90*: durata del potenziale d'azione calcolata rispettivamente al 10%, 30% e 90% della ripolarizzazione;  $Rapp_{APD}$ : è un fattore di forma calcolato come

$$\frac{APD_{30} - APD_{40}}{APD_{70} - APD_{80}}$$

Nella Tabella 3.1 sono state messe a confronto le misure sperimentali con i risultati ottenuti dalle simulazioni del modello.

AP Features	Unit	EXP	SIM
Cycle Length	s	1.7 ± 0.1	1.6
Rate of spontaneous beating	bpm	35.3 ± 2.2	37.4
MDP	mV	-75.6 ± 1.2	-76.7
Peak	mV	28.3 ± 1.0	28.1
APA	mV	104 ± 1.1	104.8
$\frac{dV}{dt}_{max}$	$\frac{V}{s}$	27.8 ± 4.8	24.4
APD <sub>10</sub>	ms	74.1 ± 4.8	63.4
APD <sub>30</sub>	ms	180 ± 10.7	238.9
APD <sub>90</sub>	ms	414.7 ± 21.8	417.5
Rapp <sub>APD</sub>	-	2.5 ± 0.2	3.17

Tabella 3.1: Confronto tra i dati ottenuti tramite esperimenti e simulazioni sul PA ventricolare. I dati sperimentali sono presentati come *media* +/- *errore standard medio*

In Tab. 3.1 si nota che il modello segue in modo abbastanza preciso le misure ottenute dagli esperimenti. Questo modello però presenta anche delle limitazioni: risulta fin troppo semplificata la formulazione del sistema di manipolazione e controllo dello ione  $\text{Ca}^{2+}$ .

Il  $\text{Ca}^{2+}$  ha una valenza importante nell'accoppiamento tra eccitazione e contrazione, infatti una cellula muscolare, per potersi contrarre, ha bisogno di una grande quantità di ioni calcio che fluiscano dentro la cellula. Durante la fase 1 del PA ventricolare la corrente  $I_{CaL}$ , dovuta ai canali L-type del calcio, inizia a far fluire  $\text{Ca}^{2+}$  all'interno della cellula; questo flusso attiva il meccanismo di CICR (Calcium Induce Calcium Release) che nasce all'interno del reticolo sarcoplasmatico (SR), dove ci sono dei recettori sensibili alla concentrazione del  $\text{Ca}^{2+}$  (ryanodine sensitive, RyR-sensitive, receptors) che permettono il rilascio di ulteriori ioni calcio da parte del SR, che presenta al suo interno delle "scorte" di ioni calcio nei tubuli. A questo punto si stabilisce un flusso di ioni calcio in continua crescita, dato che all'aumentare della corrente  $I_{CaL}$ , aumenta anche la corrente  $I_{rel}$  (corrente riferita al ciclo CICR), e quindi viene raggiunta la concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  adatta per permette la contrazione. Il modello di Paci replica questo meccanismo, ma con una modalità semplificata che deriva dal modello formulato da Ten-Tusscher (ten Tusscher et al., 2004). Infatti nonostante la corrente  $I_{rel}$  sia legata solamente alla concentrazione di ioni calcio e alla sensibilità dei recettori RyR, nel modello la sua formulazione è direttamente dipendente dalla variabile ( $d$ ), voltaggio-dipendente, di attivazione dei gate L-type per il  $\text{Ca}^{2+}$  e quindi per la corrente  $I_{CaL}$ :

$$I_{rel} = K_{rel} \cdot \left( c_{rel} + \frac{a_{rel} \cdot Ca_{SR}^2}{b_{rel}^2 + Ca_{SR}^2} \right) \cdot d \cdot g \quad (3.15)$$

dove  $K_{rel}$ ,  $a_{rel}$ ,  $b_{rel}$  e  $c_{rel}$  sono costanti,  $Ca_{SR}$  è la concentrazione di  $\text{Ca}^{2+}$  nel reticolo sarcoplasmatico (SR) e  $g$  è la variabile di gate legata all'inattivazione di  $I_{rel}$ .

I risultati e le parametrizzazioni di questo modello sono in costante aggiornamento e sottoposti spesso a ottimizzazioni, ma la struttura generale di esso è solida. In particolare il modello di Paci viene utilizzato per studi computazionali come la previsione degli effetti derivanti da farmaci sull'elettrofisiologia cardiaca [23] e la valutazione della variabilità elettrofisiologica di hiPSC-CM nelle cellule di controllo e mutanti, mediante popolazioni di hiPSC-CM in silico.

### **3.2.4 Dinamica non lineare dei potenziali d'azione**

I sistemi non lineari sono composti da equazioni, di cui almeno una non è esprimibile come combinazione lineare (proporzionalità diretta) tra variabili di input e output. Inoltre, i sistemi complessi (costruiti basandosi sulle relazioni che intercorrono tra i componenti) spesso mostrano proprietà che non sono facilmente prevedibili dalle caratteristiche delle singole parti. Pertanto, per analizzare la dinamica di un sistema complesso e prevedere gli effetti di una perturbazione (ad esempio l'applicazione di un farmaco), è spesso necessario utilizzare modelli matematici per simulare il comportamento risultante. Modelli matematici della dinamica elettrofisiologica nei miociti cardiaci, costituiti da equazioni differenziali accoppiate e non lineari, sono stati sviluppati con specificità crescenti per quasi 50 anni. Questi modelli hanno indiscutibilmente contribuito ad aumentare la nostra comprensione dell'elettrofisiologia cellulare e delle aritmie cardiache.

Un classico esempio di non-linearità nella dinamica del PA è il comportamento che un cardiomiocita presenta quando, per far nascere un potenziale d'azione, viene sottoposto a stimoli esterni che portano il potenziale elettrico di membrana attorno al valore soglia: se lo stimolo elettrico non permette al potenziale di membrana di raggiungere il suo valore di soglia, il potenziale d'azione non nasce; mentre se tale stimolo fa raggiungere alla membrana il potenziale di soglia, si ottiene un potenziale d'azione “completo” (risposta tutto-o-niente della membrana).

#### **3.2.4.1 APD alternans e curve di restituzione**

Altri esempi di non linearità sono osservabili nei meccanismi di controllo della durata del potenziale d'azione (APD). Recentemente, è stato mostrato che vi è una relazione non lineare tra la corrente di membrana e la durata del potenziale d'azione nei miociti ventricolari canini: l'APD dimostra una dipendenza inversa dalla velocità di stimolazione, cioè che a velocità più elevate, il potenziale d'azione è di durata più breve. L'accorciamento del potenziale d'azione durante la stimolazione rapida consente un corretto riempimento delle camere del cuore tra le contrazioni.

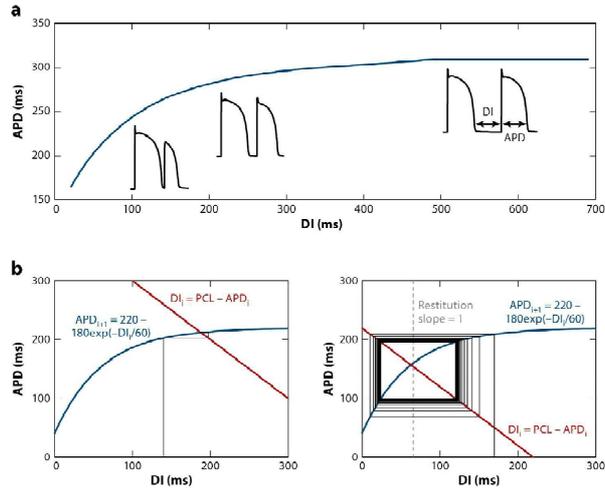


Figura 3.9: Curva di restituzione del PA ventricolare, dove vengono evidenziati l'andamento delle APD (a) e la relazione tra APD e DI (b)

L'APD di un cardiomiocita (Fig. 3.9a) è descritto abbastanza precisamente attraverso una mappa (funzione), iterativa, non lineare dell'intervallo “di riposo” precedente, detto anche intervallo diastolico (DI):

$$APD_{n+1} = \phi(APD_n) \quad (3.16)$$

Tale relazione è detta curva di restituzione, con

$$\phi(APD_n) = r(CL - APD_n) \quad (3.17)$$

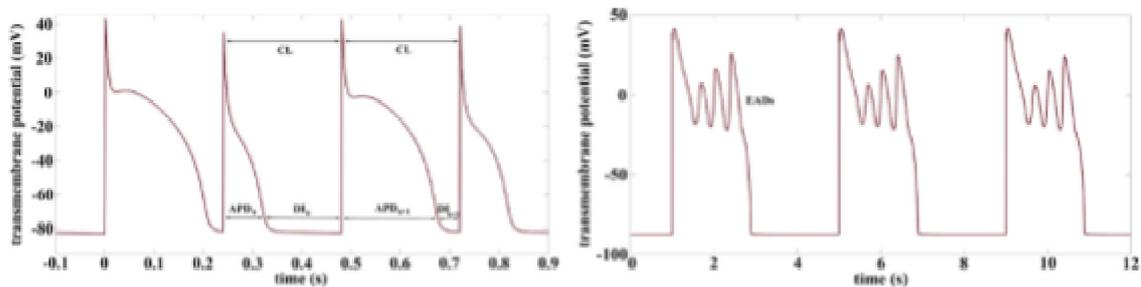
e la lunghezza di ciclo  $CL = DI_n + APD_n$  che è rappresentata da una retta con pendenza -1 che interseca la curva in un punto di equilibrio.

Con una stimolazione lenta (o un ciclo di lunga durata), il punto operativo  $APD_*$  cade sulla parte piatta della curva di restituzione (durata del potenziale d'azione cambia poco al variare dell'intervallo diastolico) (Fig 3.9b). Aumentando la frequenza di stimolazione il punto operativo si sposta lungo la curva e la stabilità locale può essere valutata perturbando il DI con una quantità infinitesima  $\delta$  ottenendo:

$$DI_{n+1} = DI_n + \delta \quad (3.18)$$

Graficamente, per un valore negativo di  $\delta$  (accorciamento DI),  $DI_{n+1}$  si sposta in un punto a sinistra rispetto al punto di equilibrio. Il DI più corto sarà quindi seguito da un APD più corto il cui valore è determinato tracciando una linea verticale fino all'intersezione con il grafico di restituzione. Questo APD più corto a sua volta genererà un DI più lungo, che può essere determinato tracciando una linea orizzontale fino all'intersezione con la retta del CL. Questo DI più lungo a sua volta produrrà un APD più lungo, e così via. Quando la pendenza della curva di restituzione ( $r'(DI_*)$ ) supera 1

(che corrisponde ad  $\phi'(APD_*) < -1$ ), questa stabilità viene persa e il ritmo si alterna. Infatti se sottoposte a stimoli che rendono i cicli cardiaci sempre più brevi (o velocità sempre più elevate), le cellule cardiache possono andare incontro a modifiche del periodo dei potenziali d'azione (per esempio periodo dettato dalla funzione  $\phi$  può essere raddoppiato, ottenendo che  $APD_{n+2} = APD_n$ ) e quindi (Fig. 3.10) si crea un'alternanza fra battiti che può provocare l'insorgenza di aritmia cardiaca. Ovviamente, riducendo ulteriormente il CL si va incontro a modifiche più complesse del periodo (m:n, dove m stimoli evocano n potenziali d'azione) o addirittura a totali irregolarità nel pattern del APD.

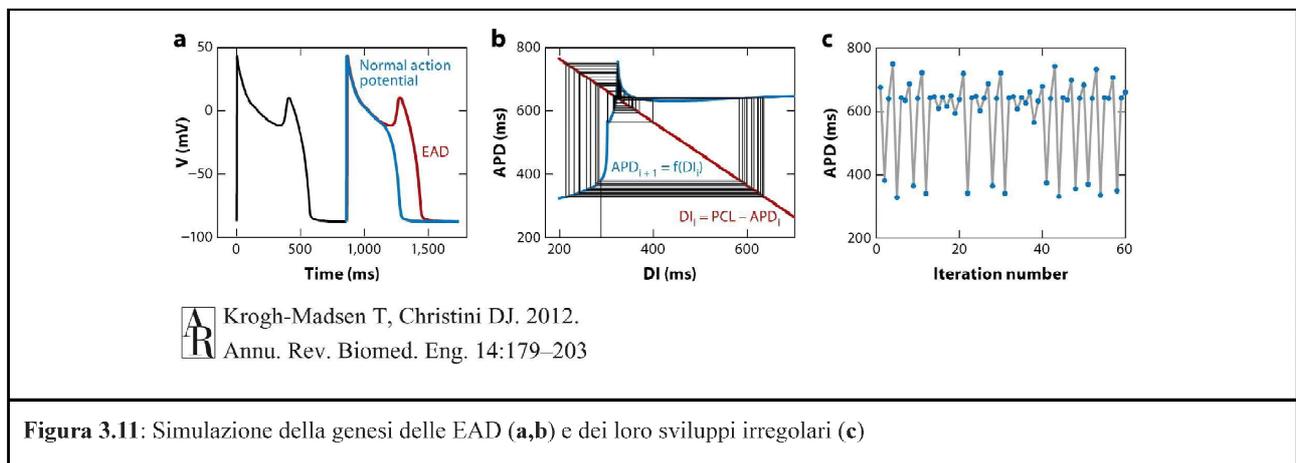


**Figura 3.10:** Rappresentazione grafica dell'alternanza di durate dei PA (sinistra) e dell'insorgere di non-linearità causate dalle EAD (destra)

Questo tipo di analisi delle APD alternans presenta dei limiti quando applicata allo studio del tessuto cardiaco perché i meccanismi cellulari e molecolari di APD restitution e APD alternans sono sensibili anche ad altri fattori quali la storia di stimolazione e la memoria cardiaca a breve termine (detta anche APD accommodation).

### 3.2.4.2 Early after-depolarizations (EAD)

I PA cardiaci con *early after depolarization* (EAD) sono un esempio di oscillazioni in modalità mista (MMO), cioè un'alternanza tra oscillazioni di ampiezza più o meno grande (figura 3.11a). Possono derivare da scale temporali multiple a cui operano le variabili di stato delle EDO.



**Figura 3.11:** Simulazione della genesi delle EAD (a,b) e dei loro sviluppi irregolari (c)

Le EAD si verificano tipicamente nelle fibre di Purkinje o nei miociti ventricolari quando le correnti di potassio ripolarizzanti sono ridotte e/o le correnti depolarizzanti come  $I_{CaL}$  e  $I_{NaCa}$  sono aumentate.

A causa dell'evento di depolarizzazione aggiunto, le EAD possono talvolta innescare aritmie cardiache, anche in modo irregolare e imprevedibile. Tale irregolarità può essere dovuta a rumore intrinseco (ad es. cinetica di apertura/chiusura del canale casuale).

L'analisi matematica della biforcazione di modelli matematici ha mostrato che le EAD oscillanti sono associate a una combinazione di biforcazioni (valori di parametri che portano a variazioni qualitative e/o topologiche del sistema, come ad esempio il cambio dei punti di equilibrio). Riducendo il modello cellulare a una mappa iterativa della durata del potenziale d'azione e della dinamica dell'intervallo diastolico, è stato dimostrato come una tale mappa non lineare, caratterizzata da parti ripide e transizioni nette, causi dinamiche EAD caotiche (Figura 3.11b,c).

### **3.2.4.3 Propagazione dei potenziali d'azione**

La dinamica delle onde di propagazione è di natura non lineare e può essere rappresentata tramite un grafico simile a quello della curva di restituzione della durata dei potenziali d'azione. Infatti la velocità di propagazione dipende dall'intervallo diastolico allo stesso modo della durata del potenziale d'azione: è una funzione non lineare che diminuisce drasticamente a brevi intervalli diastolici e si stabilizza a lunghi intervalli diastolici. La pendenza di questa curva di dispersione significa che durante le alternanze, i battiti alternati possono propagarsi con velocità di conduzione notevolmente diverse, e quindi formare un modello spazialmente eterogeneo in un tessuto completamente omogeneo.

La propagazione irregolare, lungo i fasci muscolari cardiaci, di un'onda elettrica, originata dal potenziale d'azione delle cellule pacemaker può favorire l'origine di aritmie cardiache: ad esempio, nella fibrillazione ventricolare i ventricoli vengono attivati da onde di scorrimento, in un modo così rapido, irregolare e disorganizzato tale da annullare la fase di pompaggio.

Per poter analizzare l'insorgere di eventi aritmici causati dalla propagazione irregolare delle onde elettriche, sono stati studiati e proposti dei modelli matematici che simulano la diffusione di queste onde ed i fenomeni che ne derivano.

Tali modelli vengono descritti in maggior dettaglio nel prossimo paragrafo.

### 3.3 Propagazione dell'onda elettrica dei potenziali d'azione

Durante i normali ritmi cardiaci, i potenziali d'azione si propagano attraverso il miocardio un'onda alla volta, attivando le cellule muscolari e provocando la contrazione. Le onde di propagazione si diffondono tra le cellule vicine, che sono accoppiate elettricamente da proteine attraverso le *gap junctions*. La dinamica di propagazione delle onde del PA presenta delle non-linearità.

Per descrivere la dinamica nonlineare della propagazione è stato studiato un modello che prende in considerazione non la singola cellula, ma un insieme di fibre muscolari cardiache, ponendo l'attenzione sulla relazione elettrofisiologica tra dominio intracellulare e dominio extracellulare (modello del bidominio). Successivamente è stata teorizzata una semplificazione di questo modello (modello monodominio) che, si basa sulle capacità anisotrope (proprietà per la quale un determinato ente fisico ha caratteristiche che dipendono dalla direzione lungo la quale vengono considerate) uguali sia all'interno che all'esterno della membrana cellulare.

I confronti numerici [31], [33], [34] tra il modello di monodominio e quello del bidominio indicano differenze nella propagazione delle onde, mentre un risultato teorico di [32] afferma che l'errore tra le soluzioni del mono- e bi- dominio è limitato all'errore tra i rispettivi operatori di conducibilità.

#### 3.3.1 Modello del bidominio

La propagazione di un'onda di eccitazione elettrica attraverso il tessuto cardiaco o l'organo cardiaco (o parte di esso come le camere ventricolari) è comunemente descritta nel modello del bidominio formulato matematicamente attorno agli anni '70.

In questo modello

1. Solo i flussi di correnti ioniche tra le regioni intracellulari ed extracellulari si verificano;
2. Il cuore è isolato, quindi la corrente che lascia una regione deve fluire nell'altra.

Il modello del bidominio è definito attraverso tre equazioni differenziali alle derivate parziali:

$$\begin{aligned}\nabla \cdot (\Sigma_i \nabla v) + \nabla \cdot (\Sigma_e \nabla v_e) &= \chi (C_m \frac{\partial v}{\partial t} + I_{ion}) - I_{s1}; \\ \nabla \cdot ((\Sigma_i + \Sigma_e) \nabla v_e) &= - \nabla \cdot (\Sigma_i \nabla v) + I_{s2}; \\ \frac{\partial s}{\partial t} &= f(s, v, t); \end{aligned} \tag{3.19}$$

La prima equazione descrive la variazione del potenziale transmembrana tenendo conto dei processi di gating e delle reazioni elettrochimiche interne alle cellule; la seconda calcola il potenziale extracellulare a partire da una data distribuzione del potenziale transmembrana, la terza definisce come le variabili di stato del sistema, raccolte nel vettore  $s$ , si modificano nel tempo.

Nei materiali ohmici, come le fibre miocardiche, in prima approssimazione la densità di corrente è proporzionale al campo elettrico applicato  $E$ , come evidenzia la forma locale della legge di Ohm:  $J = \sigma E$ , dove  $\sigma$  è la conducibilità del materiale. Presupponendo poi quasi statico il campo elettrico, il gradiente di un potenziale scalare  $\varphi$  può descriverlo:  $E = -\nabla\varphi$ . Quindi se  $J$  rappresenta la densità di corrente del campo elettrico  $E$ , è possibile ottenere due formulazioni per lo spazio intracellulare ed extracellulare:  $J_i = -\Sigma_i \nabla v_i$  ed  $J_e = -\Sigma_e \nabla v_e$ . Secondo le considerazioni preliminari del modello la densità di corrente in ciascuno dei domini intracellulare ed extracellulare deve essere uguale in grandezza ma opposta nel segno ( $-\nabla J_i = \nabla J_e = \chi I_m$ ); dunque si può ottenere la seguente equazione, che afferma che tutta la corrente che esce da un dominio deve entrare nell'altro:

$$\nabla \cdot (\Sigma_i \nabla v_i) = -\nabla \cdot (\Sigma_e \nabla v_e). \quad (3.20)$$

A questo punto, ricondursi alle equazioni del modello risulta essere un semplice problema algebrico di addizione e sottrazione ai membri destro e sinistro delle equazioni.

Le principali incognite del sistema di equazione sono: i potenziali intracellulare ( $v_i$ ) ed extracellulare ( $v_e$ ) e il potenziale transmembrana  $v = v_i - v_e$ , a cui si aggiungono le matrici di conducibilità intracellulare ( $\Sigma_i$ ) ed extracellulare ( $\Sigma_e$ ) e la corrente transmembrana ( $I_m$ ), descritta in parte dalla somma tra  $C_m \frac{\partial v}{\partial t}$  (ossia il prodotto tra la capacità della membrana per unità di superficie e la variazione di potenziale transmembrana nel tempo) e la corrispondente corrente ionica (descritta da Hodgkin e Huxley nel loro modello cardiaco) sulla membrana per unità di area  $I_{ion}$ , e in parte dalle correnti di stimolo applicate esternamente ( $I_{s1}$  ed  $I_{s2}$ ). Inoltre, per poter derivare la formulazione standard del modello del bidominio, è necessario prendere in considerazione anche il rapporto superficie-volume della membrana cellulare  $\chi$ .

### 3.3.2 Modello del monodominio

È possibile ridurre il sistema del modello del bidominio di un'equazione: assumendo rapporti di uguale anisotropia per i domini intra ed extracellulare, ossia ponendo  $\Sigma_i = \lambda \Sigma_e$  per qualche  $\lambda$ , il modello viene descritto da un'equazione di stato generica, con  $s$  vettore delle variabili di stato del sistema, e da un'equazione dove l'unica variabile è il potenziale di transmembrana

$$\begin{aligned} \frac{\partial s}{\partial t} &= f(s, v, t) \\ \frac{\lambda}{1+\lambda} \nabla \cdot (\Sigma_i \nabla v) &= \chi (C_m \frac{\partial v}{\partial t} + I_{ion}) - I_s. \end{aligned} \quad (3.21)$$

Le equazioni del mono e bidominio descrivono modelli di reazione-diffusione del tessuto cardiaco eccitabile e possono mostrare una varietà di modelli spazio-temporali, che vanno da onde normalmente propaganti, con un andamento a spirale, al caos spazio-temporale. I pattern nei quali si verificano collisioni di onde in movimento con mutuo annientamento dovuto alla refrattarietà, si possono ritenere correlati alle aritmie cardiache. Alcuni esempi di pattern di eventi proaritmici a partire da simulazioni basate sul modello del monodominio sono: gli APD alternans discordi, le EAD e la rottura delle onde spirali di propagazione.

# CAPITOLO 4

## SIMULAZIONE E VALUTAZIONE DEI RISCHI PROARITMICI DEL CUORE

La cardiologia computazionale è cresciuta significativamente negli ultimi 50 anni. Essa studia, attraverso specifici modelli matematici, i meccanismi legati alle aritmie cardiache, con un'elevata risoluzione spazio-temporale, a partire dal singolo canale ionico della membrana cellulare fino all'intero organo. Di rilievo risulta l'impiego di questi modelli, che simulano l'elettrofisiologia del tessuto cardiaco, per la rilevazione e analisi di eventi correlati alle aritmie. L'irregolarità ondulatoria derivante da post-depolarizzazioni precoci (EAD), i focus che producono onde a ritmo differente da quello del nodo seno-atriale e le *APD alternans* nascono da predisposizioni genetiche del tessuto nervoso intrinseco al miocardio, oppure derivano da fattori esterni, come gli stimoli elettrici o la somministrazione di farmaci, che mutano le caratteristiche della membrana cellulare, influenzando sul potenziale d'azione della cellula. Dunque la capacità computazionale di questi modelli e metodi risulta essere un importante strumento per studiare i meccanismi dei cambiamenti indotti da farmaci sull'attività cardiaca e il loro potenziale proaritmico. In questo capitolo viene trattata specificatamente la correlazione tra aritmie e impatto farmacologico, partendo dalle linee guida e mettendo in risalto quali sono i possibili risultati derivanti dalla loro interazione.

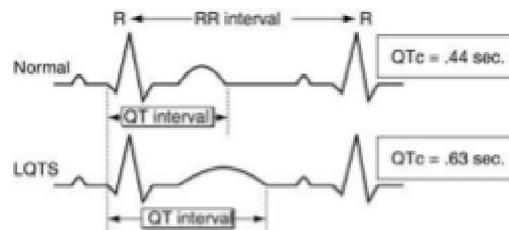
### 4.1 Test di sicurezza dei farmaci e linee guida

Gli effetti negativi dei farmaci sull'elettrofisiologia cardiaca rappresentano una preoccupazione crescente sia per le agenzie di regolamentazione dell'uso clinico di essi che per le aziende farmaceutiche che investono importanti risorse economiche. A partire dagli anni '60, si è posta molta attenzione su particolari fenomeni di aritmia associati ad una forma distintiva di tachicardia ventricolare polimorfa, definita torsione di punta (TdP) per il tipico aspetto di torsione dei complessi QRS dell'elettrocardiogramma (ECG). Da allora, si è scoperto che un'ampia gamma di farmaci (cardiovascolari, chemioterapici, antipsicotici, antibiotici) possono innescare aritmie cardiache pericolose per la vita come la TdP. I farmaci torsadogenici causano, comunemente, il

blocco del canale potassio codificato dal *human Ether-à-go-go-Related Gene* (gene hERG) con conseguente ripolarizzazione ventricolare ritardata e a un intervallo QT prolungato all'ECG. Tra gli anni '90 e l'inizio degli anni 2000 si sono verificati ritiri dal commercio di vari farmaci e sono state redatte due linee guida regolatorie da parte del *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) nel 2005 per valutare il potenziale pro-aritmogeno di un farmaco: la linea guida non clinica *S7B* e la linea guida clinica *E14*.

La linea guida *S7B* prende in considerazione l'impatto del blocco della corrente  $I_{Kr}$  attraverso il canale ionico del potassio: essa considera un farmaco come torsadogenico (quindi incline a produrre aritmie) se  $\frac{IC50_{hERG}}{EFTPC} < 30$ ; dove  $IC50_{hERG}$  indica quanto farmaco è necessario per inibire della metà la capacità del canale in cui fluiscono gli ioni  $K^+$ , e  $EFTPC$  (effective free therapeutic plasma concentration) che rappresenta la concentrazione ematica, calcolata come media, della componente libera del farmaco ad una dosazione terapeutica dello stesso.

La linea guida *E14* analizza invece l'intervallo  $QT_c$  (intervallo QT, misurato in millisecondi, corretto per la frequenza cardiaca:  $QT_c = \frac{QT}{\sqrt{RR}}$ , dove RR è l'intervallo del ciclo cardiaco, misurato in secondi, dall'inizio di un complesso QRS al seguente, come si può vedere in Fig. 4.1).



**Figura 4.1:** L'intervallo QT comprende il tempo (in ms) trascorso tra l'inizio del complesso QRS e la fine dell'onda T. Il prolungamento di tale intervallo, rispetto ai normali valori, viene ritenuto una possibile causa di aritmia. Anche l'intervallo QT corretto (QTc) è misurato in ms (0.44s=440ms; 0.63s=630ms).

Questa linea guida ha stabilito lo studio TQT (*thorough QT*), un test clinico atto a valutare il prolungamento del  $QT_c$  indotto dal farmaco a livelli di esposizione terapeutica e sovratrascuriva. In particolare, se l'intervallo  $QT_c$  aumenta di più di 10 ms, rispetto ai normali valori che l'intervallo raggiunge (0.30-0.45 s), l'effetto del farmaco in analisi viene ritenuto possibilmente torsadogeno; oppure può essere confrontato con la durata dell'intervallo RR: se  $QT \geq \frac{1}{2}RR$  allora la durata dell'intervallo QT può generare dei "pattern" aritmici, in alcuni casi anche particolarmente gravi. Tuttavia, la responsabilità pro-aritmica definita dalle linee guida *S7B* e *E14* è piuttosto imprecisa. Essa infatti si basa su una soglia arbitraria per il prolungamento dell'intervallo QT e sull'analisi

dell'inibizione di una sola corrente di ioni. Entrambi sono parametri connessi alla TdP ma da soli né sufficienti né determinanti. Ciò inoltre ha un impatto decisamente negativo sullo sviluppo di nuovi farmaci: diversi farmaci in via di sviluppo vengono bloccati, anche se non producono effettivamente eventi aritmici come la torsione di punta (TdP). Diversi studi hanno identificato gli EAD come il probabile evento scatenante per TdP [38,39], mentre il solo prolungamento del QT non porta necessariamente a TdP in assenza di EAD. Oppure, in casi di tachicardia ad esempio, la sola azione bloccante di alcuni farmaci rispetto al gene hERG può avere risvolti benefici ed anti-aritmici, riportando all'equilibrio il rapporto tra flussi di correnti ioniche entranti ed uscenti dalla membrana cellulare. Per queste ragioni, negli anni successivi al 2005, sono stati messi a punto metodi più precisi per valutare i rischi torsadogeni indotti da farmaci.

## **4.2 Modelli matematici di analisi per l'impatto farmacologico sui canali ionici**

Attualmente esistono modelli matematici che permettono di analizzare *in silico* l'elettrofisiologia di singole cellule cardiache ventricolari umane [67,68] ed esistono anche modelli anatomici multiscala di un singolo canale ionico ma anche un intero organo [69]. Quest'ultimi rappresentano uno dei migliori strumenti, data la complessa natura delle correnti ioniche che attraversano la membrana cardiaca, per analizzare e modellare i cambiamenti, indotti da farmaci, che avvengono nell'attività elettrofisiologica del cuore e come questi possano portare ad aritmie o ad improvvise morti cardiache.

Sono state dimostrate tre modalità di interazione del farmaco con il canale ionico:

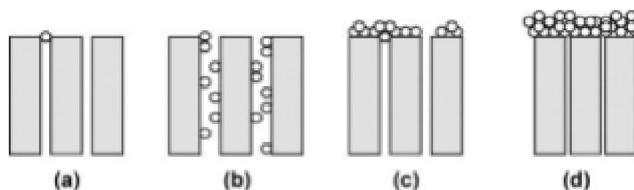
1. Un semplice blocco dei pori (*simple pore-block model*), per cui il flusso di ioni è limitato dal legame del farmaco con un recettore del canale ionico continuamente accessibile;
2. Il farmaco si lega al canale ionico in base allo stato ed al voltaggio: teoria dei recettori modulati ("*modulated receptor theory*") e protetti ("*guarded receptor theory*"), entrambe basate sui modelli markoviani;
3. Effetti allosterici che sono causati dal legame del farmaco con un recettore allosterico sulla proteina del canale.

Nella realtà, nell'interazione tra la molecola del farmaco e il canale ionico si verifica una combinazione di queste 3 modalità. Poiché gli effetti allosterici possono avvenire in modo

combinato ad entrambi gli altri due modelli, nei prossimi paragrafi descriveremo i primi due casi citati.

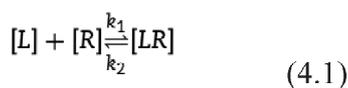
## 4.2.1 Modello pore-block

L'applicazione più semplice della teoria del blocco dei canali ionici è il semplice blocco dei pori (*pore-block*, mostrato in Figura 4.2), in cui si presume che la molecola del farmaco abbia accesso continuo al sito del recettore e che la sua affinità al recettore sia indipendente dal tempo e dalla tensione (quindi anche dallo stato).



**Figura 4.2:** Meccanismi di pore-blocking dei canali ionici della membrana. (a) blocco completo, (b) blocco standard, (c) blocco intermedio, (d) blocco "a torta"

Esistono due modi in cui le molecole di farmaco che si legano ai recettori del canale ionico possono inibire il flusso di ioni. In primo luogo, se il sito del recettore si trova all'interno o vicino al poro del canale, la molecola del farmaco legata limita fisicamente il flusso di ioni attraverso il poro del canale. In alternativa, il legame del farmaco con un recettore allosterico può causare un cambiamento conformazionale che limita il flusso di ioni. La cinetica del processo di legame tra il farmaco e i recettori del canale ionico può essere espressa secondo la legge dell'azione di massa come segue:



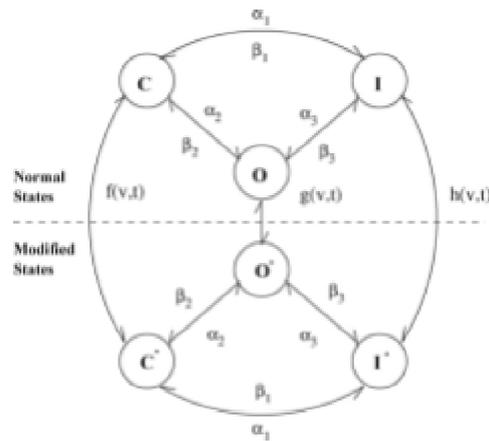
dove  $k_1$  è la costante di velocità di associazione,  $k_2$  è la costante di velocità di dissociazione,  $[L]$  è la concentrazione del farmaco,  $[R]$  è la concentrazione dei recettori e  $[LR]$  è la concentrazione dei complessi molecola-recettore legati. Il legame di una molecola a un sito di legame non dovrebbe influenzare l'affinità di un altro sito di legame. Tuttavia, in molti casi gli esperimenti mostrano cooperazione tra più siti: uno altera l'affinità di altri. L'equazione di Hill viene utilizzata per descrivere questa relazione e viene utilizzata in farmacologia cardiaca per descrivere la natura dell'affinità tra una particolare molecola di farmaco e i suoi siti di legame sui canali ionici (dipendenti dalla tensione). In particolare, per valutare l'influenza delle componenti attive dei farmaci sui canali ioni, l'equazione di Hill viene riportata come

$$B = \left[ 1 + \left( \frac{[C]}{IC50_{ion}} \right)^{h_{ion}} \right]^{-1} \quad (4.2)$$

Dove  $B$  è la frazione di corrente  $I$  bloccata da un composto,  $C$  è la concentrazione del composto e  $IC50$  e  $h$  sono rispettivamente il coefficiente  $IC50$  e di Hill del composto misurato rispetto a quella corrente. Il coefficiente di Hill rappresenta il rapporto che si instaura tra le molecole del farmaco e i recettori dei canali ionici: un coefficiente di Hill pari a uno indica che sia necessaria una sola molecola per bloccare il canale, indipendentemente dal fatto che altre molecole siano già legate o meno; mentre un coefficiente maggiore o minore di uno significa che una molecola che si lega a un recettore aumenterebbe o diminuirebbe, rispettivamente, l'affinità dei recettori non bloccati per le rimanenti molecole. Per simulare il blocco dei canali, il valore delle conduttanze, riferite alle singole correnti ioniche, viene scalato moltiplicandolo per la frazione di canali non bloccati, pari ad  $(1 - B)$ .

#### 4.2.2 Legami dipendenti dal voltaggio e dallo stato

A seguito di uno stimolo, con valore superiore a quello di soglia, i canali ionici cardiaci si attivano e/o si disattivano con meccanismi dipendenti dal voltaggio e dal tempo. Oltre ai processi di attivazione e disattivazione, i principali canali ionici cardiaci subiscono un processo di inattivazione, un cambiamento conformazionale che inibisce il flusso di ioni. L'inibizione farmacologica dei canali ionici è spesso determinata dalla posizione dei siti di legame del farmaco e delle proteine del canale ionico, e se l'accesso ai siti di legame è limitato a causa della conformazione del canale durante il potenziale d'azione. Quindi l'azione del farmaco sui canali ionici cardiaci è anch'essa dipendente dal voltaggio e dal tempo. Motivo in più per utilizzare come base di studio la struttura dei modelli markoviani, dove le variazioni allo stato dei canali (aperto, chiuso, inattivo) vengono valutate in base alla probabilità con cui gli stessi occupano uno stato piuttosto che un altro (vd. paragrafo 3.1).



**Figura 4.3:** Modello delle transizioni di stato (normale e modificato dalla presenza di un farmaco) dei canali ionici: i canali transitano da uno stato normale (Open, Close, Inactive) ad uno modificato ( $O^*$ ,  $C^*$ ,  $I^*$ ) in base alle funzioni  $f(v,t)$ ,  $g(v,t)$ ,  $h(v,t)$  che rappresentano l'affinità del farmaco con i siti di legame di ogni canale; inoltre un canale può passare da uno stato aperto ( $O$ ) ad un altro stato, non modificato, secondo i *transition rate*  $\alpha$  e  $\beta$ . La sua struttura riprende quella dei modelli markoviani di base.

Sono state proposte due ipotesi principali per descrivere il blocco stato-dipendente:

- **Teoria del recettore modulato:** l'affinità del farmaco con il sito di legame del canale ionico dipende dallo stato del canale ionico (quindi dipende anche dalla tensione e dal tempo). La Figura 4.3 illustra lo schema cinetico di base della teoria proposta da Hill, che prende ispirazione dal modello markoviano. In questo caso, il modello del canale ionico comprende tre stati, ovvero aperto ( $O$ ), chiuso ( $C$ ) e inattivato ( $I$ ). I tassi di transizione tra stati sono rappresentati dalle variabili,  $\alpha_n$  e  $\beta_n$ . L'affinità del farmaco con i siti di legame è diversa per ogni stato (caratterizzata dalle funzioni  $f(v,t)$ ,  $g(v,t)$  e  $h(v,t)$  in Fig. 3.3). Il legame che il farmaco crea con ogni stato fa sì che il canale entri in uno stato modificato ( $C^*$ ,  $O^*$  e  $I^*$ ), non conduttivo, che non permette il flusso normale di ioni. Il canale, da uno stato modificato, può passare a uno stato non modificato dal legame o a uno degli altri stati modificati fino a quando esso non si riprende dall'effetto del legame.
- **Teoria del recettore custodito:** l'accesso al sito di legame è limitato a causa dei cambiamenti conformazionali della proteina e la molecola del farmaco si lega con una singola conformazione con affinità fissa. Ad esempio, per un sito di legame dello stato aperto (o attivato),  $f(v,t)=0$  e  $h(v,t)=0$ , in modo tale che il legame avvenga solo durante lo stato aperto.

### 4.3 Valutazione del rischio torsadogeno dei farmaci

Per l'imprecisione delle linee guida stilate nel 2005 da parte del *ICH*, la *Food and Drug Administration (FDA)* nel 2013 ha sollecitato nuovi metodi per una miglior valutazione del livello di rischio aritmico indotto da farmaci in via di sviluppo o da presentare sul mercato.

La comprensione meccanicistica dell'insorgere della TdP fornisce la base per una valutazione preclinica più completa del rischio proaritmico. Le iniziative più celebri e con capacità valutativa molto precisa sono la *Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA)*, *Japan iPS Cardiac Safety Assesment (JiCSA)* ed i simulatori cardiaci 3D (UT-Heart) [40] che, nonostante il costo e la complessità computazionale, risultano essere particolarmente efficaci nell'analisi della risposta delle cellule miocardiche all'intervento di farmaci.

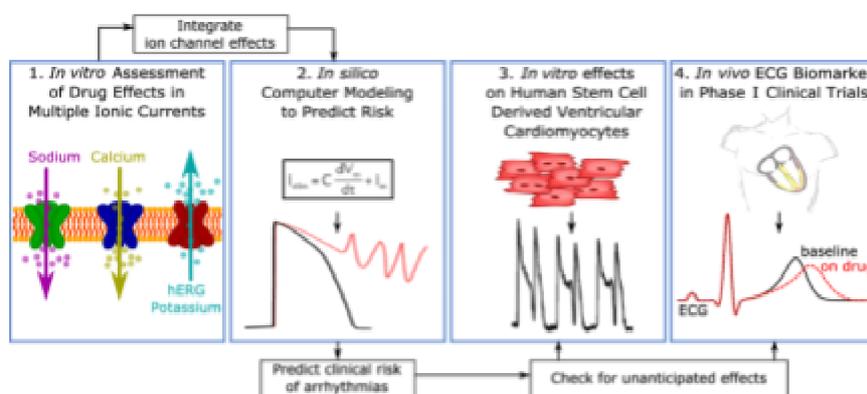
Di tali proposte, la prima e la terza rappresentano un approccio di tipo bioingegneristico (vengono utilizzati modelli matematici per simulazione completa dell'effetto pro-aritmogeno del farmaco), mentre la seconda si basa maggiormente sull'analisi biologica in vitro dell'effetto di farmaci con noti livelli di rischio di TdP, su una coltura di cellule staminali pluripotenti indotte (*iPSC*). I risultati di tutte e tre le iniziative sono coerenti, simili ed accettabili.

Oggetto di studi di notevole importanza è l'analisi degli effetti inibitori del farmaco su più di una singola corrente ionica per valutare il rischio torsadogeno [48].

Volendo classificare una serie di farmaci in base al loro livello di rischio torsadogeno, i modelli che si basavano sull'inibizione di una singola corrente compievano errori grossolani nel classificare farmaci relativamente rischiosi come farmaci ad medio-alto rischio; mentre i modelli che prendevano almeno in considerazione gli effetti inibitori sulle tre principali correnti ioniche  $I_{Kr}$ ,  $I_{CaL}$  e  $I_{Na}$  (riferite ai tre principali ioni che gestiscono la morfologia del potenziale d'azione) permettevano di classificare i farmaci in questione con un margine di errore decisamente minore, ben distinguendo quelli più ad alto rischio torsadogenico da quelli con un livello di rischio più basso.

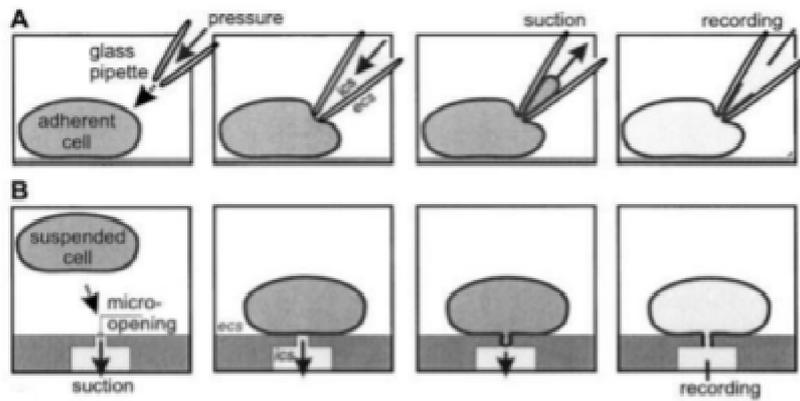
### 4.3.1 La iniziativa CiPA

L'approccio del "*Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay*" (CiPA), sviluppato a partire dal 2013 da una particolare branca dell'ICH per aggiornare le linee guida S7B e E14 del 2005, rappresenta un cambio di paradigma che coinvolge strategie che hanno migliorato la specificità nella diagnosi precoce di rischi proaritmici torsadogenici. Le 4 componenti dell'iniziativa (Figura 4.4) valutano l'effetto del farmaco su più correnti ioniche cardiache utilizzando modelli derivati dall'uomo con due nuove tecnologie (proposte per superare i limiti delle metodologie esistenti): esperimenti *in vitro* su cardiomiociti derivati da cellule staminali pluripotenti indotti dall'uomo (hiPSC-CMs) e simulazioni *in silico* su modelli di cardiomiociti ventricolari umani adulti (hAdultV-CM).



**Figura 4.4:** Le componenti dell'iniziativa CiPA permettono l'analisi del rischio torsadogeno di un farmaco da un punto di visto clinico e non clinico.

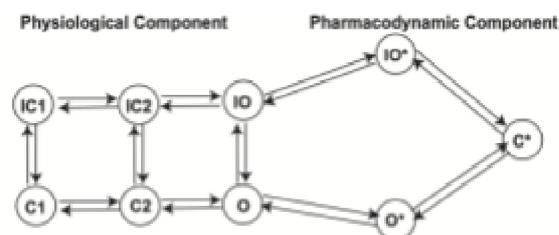
Il primo approccio dell'iniziativa CiPA è la valutazione *in vitro* degli effetti indotti da farmaci su correnti ioniche multiple, nella fase di ripolarizzazione ventricolare. Tali correnti sono  $I_{CaL}$ , le correnti di sodio, depolarizzanti entranti, di picco (*peak*) e lenta ( $I_{NaPeak}$  e  $I_{NaL}$ ), e le correnti di ripolarizzazione uscenti per il potassio (correnti raddrizzatrici ritardate)  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{to}$  e  $I_{K1}$ . Per misurare l'attività elettrica delle cellule vengono usate piattaforme *patch-clamp* automatizzate. Solitamente, per la valutazione *in vitro*, le cellule vengono sospese in un fluido e, nel caso di *patch-clamp* manuale, una sezione di una cellula viene mantenuta isolata ad un certo livello di tensione tramite l'utilizzo di una pipetta che crea un sigillo con la membrana e il comportamento elettrico di quella sezione viene poi studiato attraverso un microelettrodo che stimola i canali ionici di quella sezione. I comuni sistemi di automazione per le colture in sospensione utilizzano microchip con minuscoli fori (1-2 $\mu$ m) in un substrato planare anziché pipette per creare il sigillo e registrare da singole cellule.



**Figura 4.5:** Procedura di *patch-clamp* manuale (A) ed automatizzato tramite chip (B). La cellula, nel caso (B), viene a contatto con i fori presenti nel chip, creando il "giga seal". Ogni foro è in collegamento con un compartimento isolato, detto pozzetto, contenente la soluzione extracellulare in modo da poter effettuare la misura dell'attività elettrica (flussi di ioni che attraversano la membrana) sulla singola cellula.

Le registrazioni (Fig. 4.5) vengono effettuate analizzando il flusso di correnti ioniche attraverso i fori del chip a diverse tensioni. Questa strategia consentirà uno screening del canale ionico precoce e più completo su più correnti, cosa che non è realisticamente possibile utilizzando tecniche manuali di patch-clamp.

Il secondo approccio consiste nella modellazione *in silico* di cardiomiociti ventricolari umani adulti per prevedere il rischio di aritmie. Il modello utilizzato presenta una versione ottimizzata del modello O'Hara-Rudy (vd. paragrafo 3.2.2), impiegando un sottomodulo di Markov (Fig. 4.6) nella descrizione della dinamica del legame tra  $I_{Kr}$  e il farmaco [43]. Dati sui singoli canali ionici, ricavati dalle analisi *in vitro*, sono integrati con l'obiettivo di predire il rischio clinico di *TdP*.



**Figura 4.6:** Modello markoviano impiegato nella descrizione della dinamica del legame tra canali ionici (in particolare quelli del potassio) e farmaco.

Sono stati selezionati 28 composti con noto comportamento clinico rispetto a *TdP* (Tab. 4.1) e suddivisi in tre categorie di rischio *TdP* (alto, intermedio e basso) in base ai dati pubblicamente disponibili e all'opinione di esperti di consenso all'interno del gruppo.

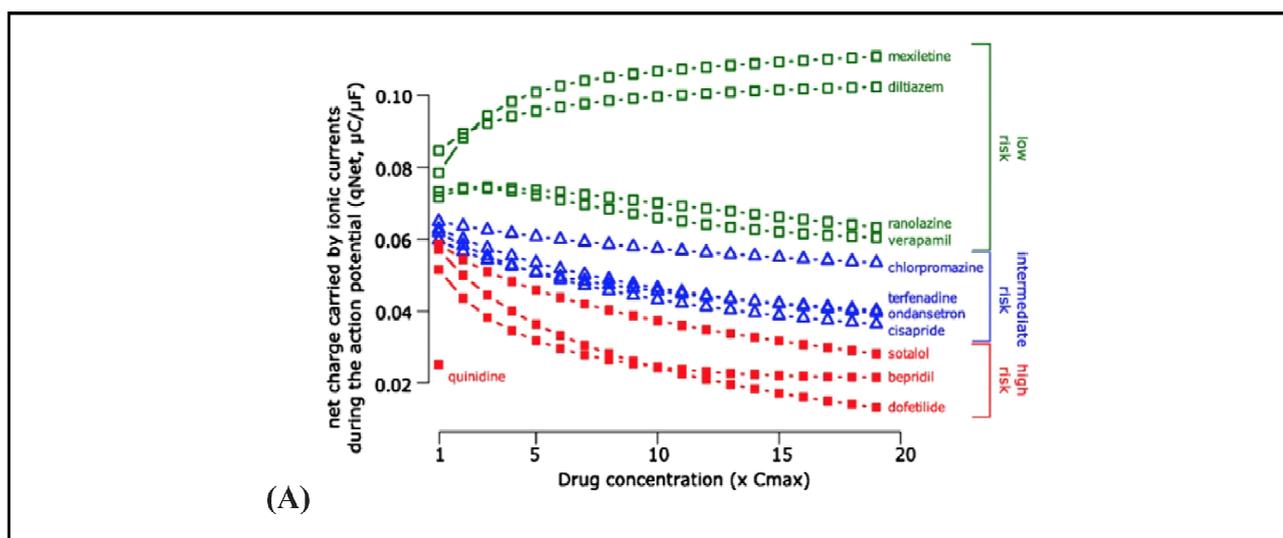
High risk	Intermediate risk	Low risk
Azimilide	Astemizole	Diltiazem <sup>a</sup>
Bepidil <sup>a</sup>	Chlorpromazine <sup>a</sup>	Loratadine
Dofetilide <sup>a,b</sup>	Cisapride <sup>a</sup>	Metoprolol
Ibutilide	Clarithromycin	Mexiletine <sup>a</sup>
Quinidine <sup>a</sup>	Clozapine	Nifedipine <sup>b</sup>
Vandetanib	Domperidone	Nitrendipine
Disopyramide	Droperidol	Ranolazine <sup>a</sup>
D,l Sotalol <sup>a</sup>	Terfenadine <sup>a</sup>	Tamoxifen
	Pimozide	Verapamil <sup>a</sup>
	Risperidone	
	Ondansetron <sup>a</sup>	

<sup>a</sup> 12 compound test set.

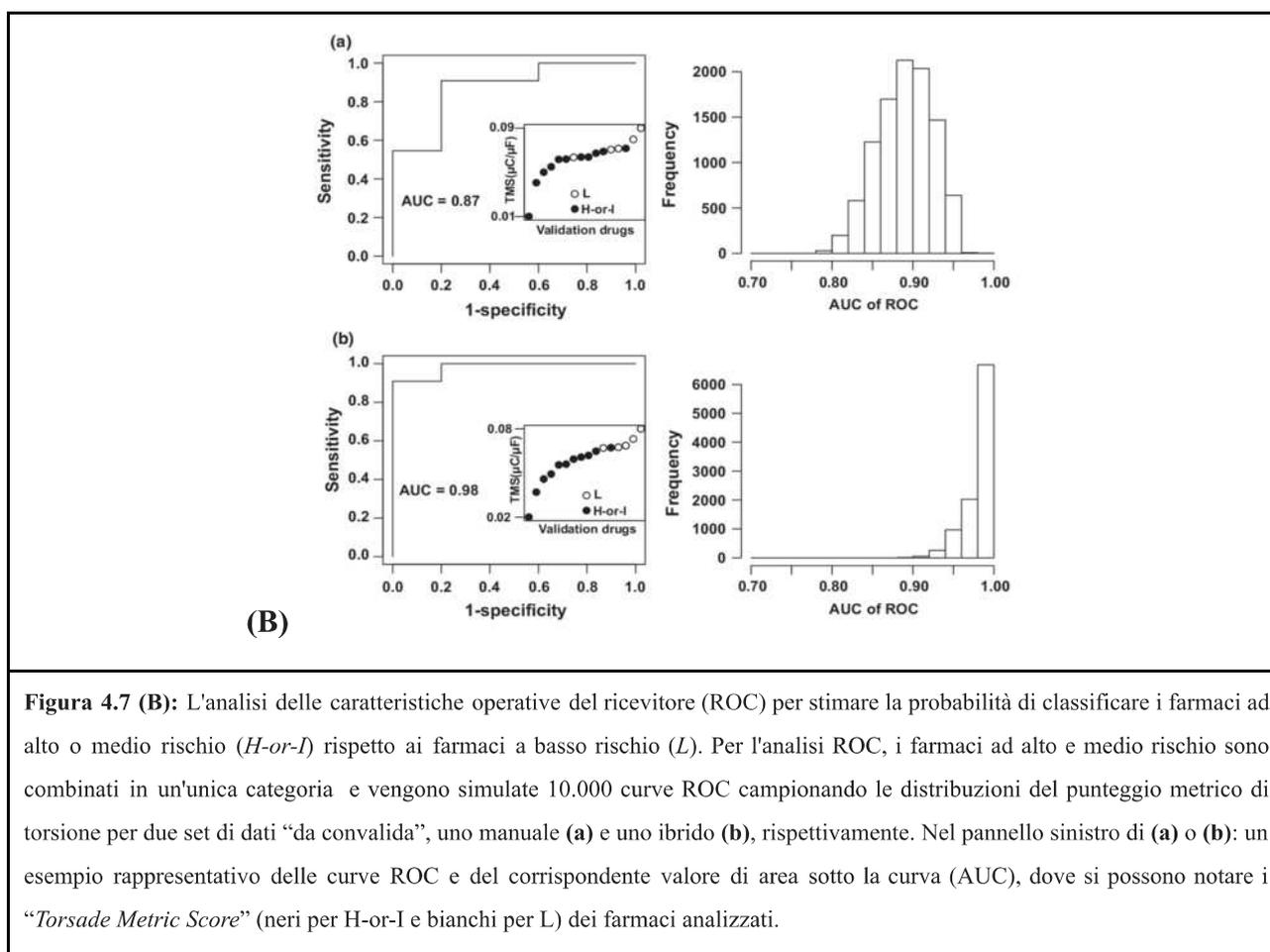
<sup>b</sup> Myocyte calibration compounds.

**Tabella 4.1:** Lista dei 28 composti farmaceutici impiegati nell'iniziativa CiPA

Questo elenco di farmaci, secondo il paradigma CiPA, è stato ulteriormente suddiviso in un *training* set (12 farmaci contrassegnati con “a” in Tab. 4.1) e un set di *validation* set (16 farmaci, “nascosti” durante la procedura di training). La modellazione, attraverso l’apporto dei 12 farmaci di training, produce un *Torsade Metric Score*, chiamato *qNET*, che rappresenta la carica passata dalla corrente ionica netta dall’inizio alla fine del potenziale d’azione (ricavata dalla differenza tra le correnti verso l’esterno e le correnti verso l’interno). Il *qNET* è stato selezionato come misura più affidabile del rischio proaritmico, rispetto a metriche alternative (Fig. 4.7A). Inoltre, è stato dimostrato che *qNet* è correlato inversamente alla robustezza del sistema contro le post-depolarizzazioni precoci (*EADs*), nel senso che bassi valori di *qNet* rendono la cellula più incline all’induzione di EAD mediante una riduzione di  $I_{Kr}$  oltre all’effetto di blocco del farmaco.



**Figura 4.7 (A):** La metrica di valutazione per rischio di TdP, *qNet*, in funzione della concentrazione del farmaco per i 12 composti di addestramento della Tabella 3.1. *qNet* è definita come l’area sotto la curva della corrente netta durante un PA simulato del modello ventricolare umano ORd e classifica coerentemente ciascuno dei composti nella corretta categoria di rischio di TdP in un’ampia gamma di concentrazioni.



**Figura 4.7 (B):** L'analisi delle caratteristiche operative del ricevitore (ROC) per stimare la probabilità di classificare i farmaci ad alto o medio rischio (*H-or-I*) rispetto ai farmaci a basso rischio (*L*). Per l'analisi ROC, i farmaci ad alto e medio rischio sono combinati in un'unica categoria e vengono simulate 10.000 curve ROC campionando le distribuzioni del punteggio metrico di torsione per due set di dati “da convalida”, uno manuale (**a**) e uno ibrido (**b**), rispettivamente. Nel pannello sinistro di (**a**) o (**b**): un esempio rappresentativo delle curve ROC e del corrispondente valore di area sotto la curva (AUC), dove si possono notare i “Torsade Metric Score” (neri per H-or-I e bianchi per L) dei farmaci analizzati.

Le prestazioni del Torsade Metric Score vengono valutate utilizzando curve caratteristiche operative del ricevitore (ROC), ossia curve di “sensibilità” del classificatore (frazione di valutazioni positive) tracciate rispetto a “[1 – specificità]” (frazione di valutazioni false). In questo contesto, l'area sotto la curva (AUC) di una curva ROC è la probabilità di classificare correttamente un farmaco a rischio più elevato rispetto a un farmaco a rischio inferiore (Fig. 4.7B). Sono state condotte due analisi: una per i farmaci a rischio basso rispetto a quelli ad alto o medio rischio e l'altra per i farmaci a basso o intermedio rispetto a quelli ad alto rischio. I risultati generalmente sono scesi in un intervallo con  $AUC \geq 0.9$ . Per valutare l'accuratezza della classificazione, si utilizzano i rapporti di verosimiglianza (LR, ossia  $sensibilità/[1 - specificità]$ ). La sensibilità e la specificità del Torsade Metric Score sono state calcolate sulla base di soglie di classificazione specifiche dal set di dati di training. Su due diversi set di dati, i risultati sono stati tutti al di sopra del livello accettabile predefinito, con l'80% che rientrava nell'intervallo di classificazione eccellente o buona.

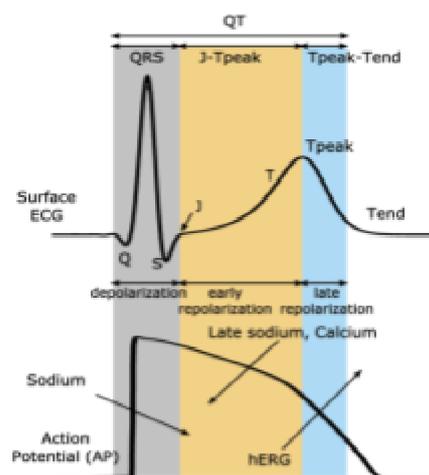
La terza strategia consiste nel verificare effetti pro-aritmogeni imprevisi, confrontando test *in vitro* su cardiomiociti ventricolari derivati da cellule staminali umane pluripotenti indotte (hiPSC-CMs)

con i dati derivati dai canali ionici, in ambito non clinico, e con le previsioni dei modelli *in silico*, anche se le differenze elettrofisiologiche tra hiPSC-CM e le cellule miocardiche ventricolari adulte umane (hAdultV-CM) possono comportare risposte differenti all'effetto dei farmaci da quelle premeditate. Gli hiPSC-CM vengono utilizzati nella valutazione precoce degli effetti elettrofisiologici dei farmaci, ma anche più avanti nello sviluppo, quando c'è discordanza di dati tra canale ionico/*in silico* e risultati clinici dell'ECG. La presenza di aritmie cellulari indotte dal farmaco (anomalie di ripolarizzazione) a qualsiasi concentrazione e la variazione massima della ripolarizzazione indotta dal farmaco (ms) osservata a qualsiasi concentrazione, in particolare a quella massima possibile in termini clinici sono due parametri utili alla classificazione del rischio aritmogeno dei farmaci.

La quarta strategia riguarda le valutazioni durante gli studi clinici di fase I<sup>1</sup>, infatti svolge un ruolo importante nel determinare se ci sono effetti inattesi sul canale ionico che si manifestano in un ECG precoce rispetto ai dati non clinici. Ciò può avvenire a causa di un metabolita specifico per l'uomo o di differenze nella proteina di legame o nella concentrazione tissutale del farmaco (portando a un inaspettato prolungamento dell'intervallo QTc). Combinato con l'intervallo QTc, il  $JT_{peak,c}$  (Fig. 4.8) rappresenta la ripolarizzazione precoce ed è di particolare interesse nel contesto attuale. I bloccanti hERG predominanti prolungano  $JT_{peak,c}$ , mentre i bloccanti dei canali ionici bilanciati non hanno alcun effetto, o un effetto di accorciamento, su  $JT_{peak,c}$ : per verapamil e lopinavir/ritonavir (bloccanti dei canali ionici bilanciati), i limiti superiori dei rispettivi intervalli di confidenza per  $JT_{peak,c}$  sono al di sotto della soglia di 10 ms, mentre per il bloccante hERG predominante (cloroquina) il limite superiore era superiore a 10 ms sia per QTc che per  $JT_{peak,c}$  come previsto. In base all'analisi di questa caratteristica è possibile confrontare i risultati ottenuti dalle componenti precedenti e prendere una decisione riguardo l'impiego e la monitorizzazione del farmaco in ambito clinico.

---

<sup>1</sup> Le fasi della ricerca clinica sono le fasi in cui gli scienziati conducono esperimenti a scopo sanitario per ottenere prove sufficienti per considerare efficace un trattamento medico. Vi sono 5 fasi: la fase 0 si concentra sullo studio della farmacocinetica; la fase I ha lo scopo di studiare la sicurezza e la tollerabilità del farmaco somministrando dosi crescenti, fino alla dose tossica rilevata dagli studi preclinici in vivo, a 60-80 volontari sani; la fase II comporta la valutazione dell'efficacia del farmaco, analizzando i cosiddetti "end-point" ovvero parametri clinici precedentemente identificati nel protocollo sperimentale; la fase III consiste nell'allargare il numero di ospedali e cliniche coinvolte, con l'obiettivo di affinare la formulazione terapeutica; la fase IV è riferita alla pratica di monitorare un farmaco una volta immesso nel mercato.



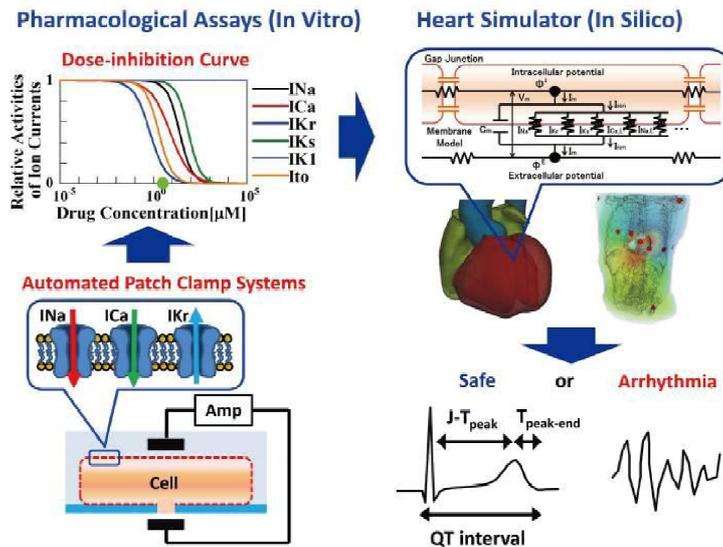
**Figura 4.8:** Intervallo J-Tpeak in formato ECG e nel corrispettivo potenziale d'azione (PA)

Nel complesso, da un punto di vista non clinico CiPA offre molte opportunità, in particolare un focus sull'aritmia piuttosto che su un biomarcatore indiretto (QTc), l'uso di reagenti umani e la disponibilità di test calibrati/standardizzati. L'introduzione di ulteriori proprietà farmacologiche (inibizione delle correnti di calcio di tipo lento e/o correnti di sodio verso l'interno) va supportata da dati ECG dei pazienti, ed in futuro la strategia di blocco, da parte dei farmaci, dei canali ionici multipli andrà perseguita al fine di ottenere una grande quantità di dati di maggior qualità. Lo scopo principale di queste metodiche è riconoscere con la massima sicurezza possibile i farmaci a basso rischio affinché le aziende farmaceutiche possano sperimentare i composti con elevata confidenza. Se gli studi clinici di fase I confermano la mancanza di effetti ECG negativi, il monitoraggio dell'ECG in fase III potrebbe essere ridimensionato o addirittura abolito.

### 4.3.2 La simulazione cardiaca 3D

Nell'ottobre 2013 è stato sviluppato un altro metodo (Fig. 4.9) di analisi dell'effetto farmacologico sulle cellule cardiache: l'Università di Tokyo, assieme al centro giapponese di ricerca scientifica RiKen, ha sviluppato un simulatore cardiaco 3D costituito da circa 170'000 tetraedri modellati secondo conoscenze di fisica e di fisiologia cardiaca attraverso il metodo agli elementi finiti (FEM) per comporre le cellule miocardiche e il sistema di conduzione. Il modello dello UT-Heart [45,46], basato su di un cuore adulto sano, è capace di riprodurre tutte le fondamentali attività cardiache tenendo conto non solo delle caratteristiche della superficie, ma anche della variazione dello

spessore del muscolo cardiaco durante il ciclo di contrazione-rilassamento e del flusso di sangue all'interno delle cavità.

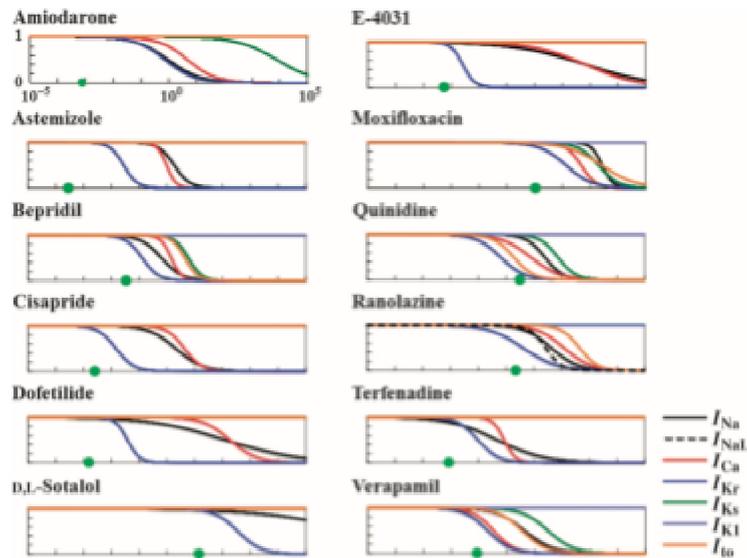


**Figura 4.9:** Sistema di screening per verificare il rischio aritmogeno di un farmaco. Nella fase di simulazione *in silico* viene adoperato un simulatore 3D cardiaco accoppiato ad un modello di torace umano su cui viene prelevato il segnale elettrocardiografico.

Per l'analisi dettagliata dell'ECG, il modello cardiaco è stato accoppiato con il modello FEM del torso umano e sono state messe in pratica le equazioni del bidominio. Per risparmiare tempo di calcolo, sono stati simulati solo i ventricoli e lo stimolo è stato applicato alla radice del sistema di conduzione a 1.2 Hz, 1 Hz (60 battiti per minuto, bpm) e 2/3 Hz (40 bpm) per imitare il ritmo sinusale regolare.

Come sostanze chimiche di riferimento sono stati selezionati 12 farmaci, riconosciuti per avere diversi gradi di rischio di TdP: chinidina, D,L-sotalolo, amiodarone, E-4031, cisapride, astemizolo, terfenadina, bepridil, moxifloxacina, verapamil, dofetilide e ranolazina. La caratterizzazione farmacologica di questi farmaci è stata effettuata misurando in vitro (Fig. 4.10) (attraverso la tecnica automatizzata di patch-clamp) i loro effetti inibitori sulle seguenti sei correnti ioniche:

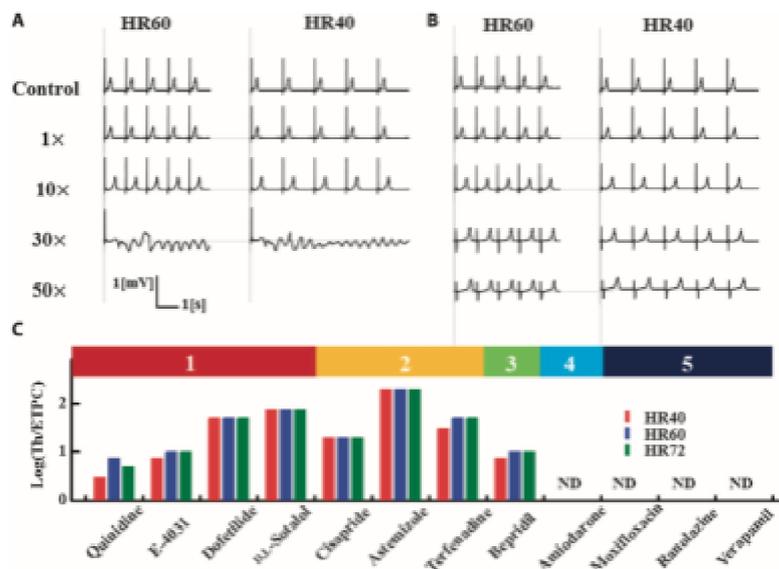
$$I_{Kr}, I_{Na}, I_{CaL}, I_{Ks}, I_{K1}, I_{to}.$$



**Figura 4.10:** Effetto inibitorio del farmaco in base alla dose. In ogni grafico le attività relative delle correnti ioniche sono tracciate in funzione della concentrazione del farmaco in scala logaritmica. Il cerchio verde rappresenta la concentrazione effettiva terapeutica nel plasma del farmaco ( $ETPC_{unbound}$ ).

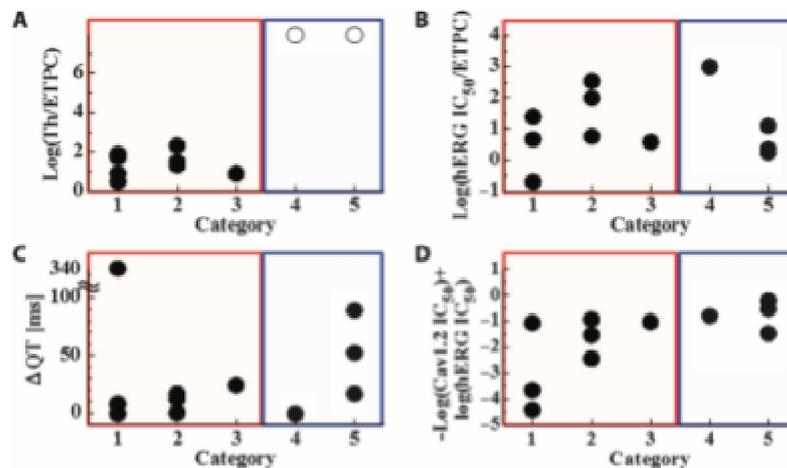
L'effetto dei farmaci è stato poi valutato anche attraverso test *in silico* dove viene simulata l'esposizione del cuore (composto da circa 22 milioni di cellule impiantate nel modello) a ciascun farmaco a concentrazioni pari a 0 (controllo), 1, 3, 5, 10, 30, 50, 100, 300, 500, e 1000 volte l' $ETPC_{unbound}$  (concentrazione plasmatica terapeutica efficace libera del farmaco). Inoltre, la simulazione dell'ECG è stata eseguita su modelli di tre tipi di miociti ventricolari (cellule endocardiche, miocardiche ed epicardiche), combinati fisiologicamente o singolarmente. L'aritmia è stata osservata solo nel modello fisiologico, suggerendo l'importanza della simulazione tridimensionale del cuore con una struttura tissutale realistica.

I valori di soglia (Fig. 4.11C), relativi ai livelli di  $ETPC_{unbound}$  di ciascun farmaco, non differiscono in modo apprezzabile tra i tre ritmi cardiaci (Heart Rate). Sebbene il numero di farmaci testati sia ristretto, tutti i farmaci delle categorie 1 e 2 hanno valori soglia relativamente bassi, quindi risultano altamente rischiosi. Invece la TdP non è stata osservata con farmaci nelle categorie 4 e 5, a cui appartengono farmaci a basso rischio. Pertanto, l'analisi non ha prodotto falsi positivi.



**Figura 4.11:** Valutazione del rischio in silico dell'aritmia indotta da farmaci. (A e B) ECG a due frequenze cardiache diverse, con dosi variabili di farmaci (controllo, 1x, 10x, 30x, 50x di ETPCunbound). Viene osservato un prolungamento dose-dipendente degli intervalli QT, sebbene la TdP sia stata osservata solo per il caso (A). (C) I valori di soglia relativi a ETPC<sub>unbound</sub> sono mostrati per ciascun farmaco.

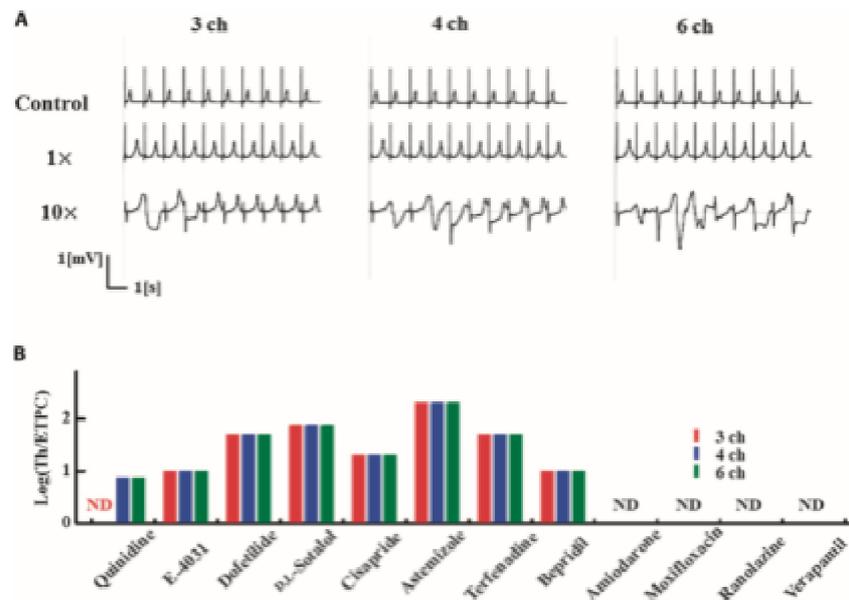
Poiché la simulazione multiscale fornisce contemporaneamente parametri sia a livello molecolare che a quello dell'organo, è stato possibile confrontare la capacità di previsione del presente metodo (Fig. 4.12A) con altri biomarcatori. In netto contrasto con il metodo attuale (la simulazione cardiaca 3D), i parametri definiti dai paradigmi E14 e S7B e il modello MICE (Multi ion-channel effects) [37,38,49] non riescono a discriminare i farmaci a basso rischio (categorie 4 e 5: rettangolo blu) dai farmaci ad alto rischio (categorie da 1 a 3: rettangolo rosso).



**Figura 4.12:** Confronto della prevedibilità dei biomarcatori attualmente proposti per il rischio aritmogeno per i farmaci in ciascuna categoria. (A) Soglia (Th) per TdP (metodo corrente). Per i farmaci che non inducono TdP, viene assegnato un valore  $\circ$  a HR = 60. (B) Inibizione di hERG quantificata da hERG IC<sub>50</sub>/ETPC<sub>unbound</sub>. (C) Prolungamento dell'intervallo QT al valore di ETPC. (D) Modello MICE valutato come  $-\log(\text{Cav1.2 IC}_{50}) + \log(\text{hERG IC}_{50})$ .

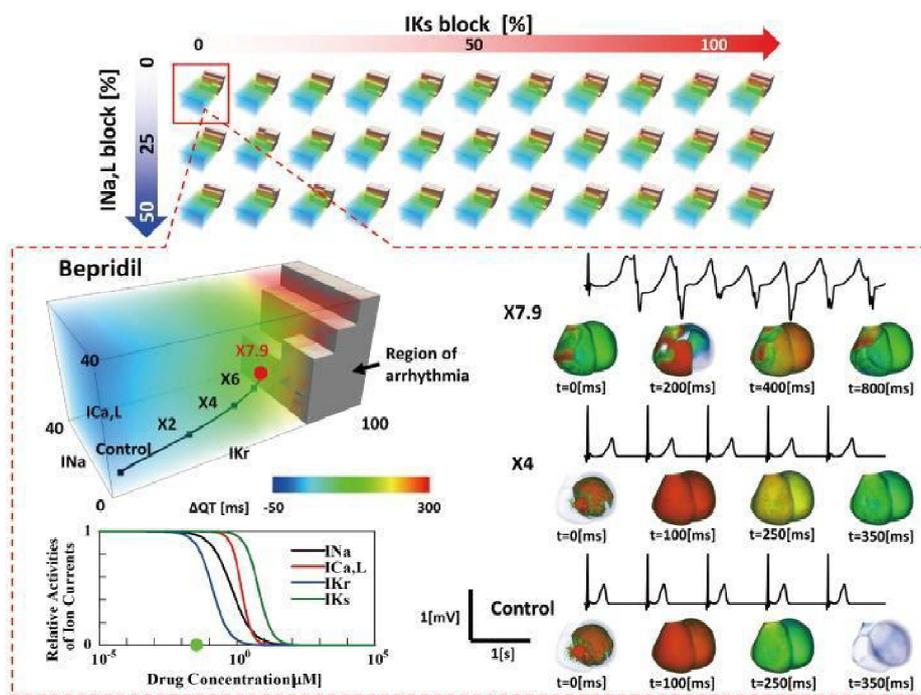
Pur essendo in grado di discriminare meglio i farmaci a basso rischio, il modello di simulazione dello UT-heart può essere dispendioso in termini di tempo e costo computazionale, perciò si è

voluto esaminare come la riduzione del numero di canali analizzati influisca sulla prevedibilità di rischio di TdP. In Figura 4.13B, i valori di soglia ottenuti sono stati confrontati con simulazioni dove veniva utilizzato un minor numero di canali. È stato riscontrato che una riduzione del numero di canali da sei a quattro (con annesse correnti  $I_{Kr}$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{CaL}$  e  $I_{Ks}$ ) non alterava la soglia TdP per nessuno dei farmaci testati. Un'ulteriore riduzione a tre canali ( $I_{Kr}$ ,  $I_{Na}$ ,  $I_{CaL}$ ) invece non permetteva il rilevamento di TdP per la chinidina (Fig. 4.13A). Naturalmente, l'inclusione di altre correnti ioniche mediate da pompe ioniche rafforzerebbe il potere di previsione.



**Figura 4.13:** Effetto del numero di canali analizzati sulla previsione del rischio. (A) Effetto farmacologico della chinidina sull'ECG simulato utilizzando i dati su sei (sinistra), quattro (medio) e tre (destra) canali (ch). Quando si utilizzano i dati solo su tre canali, l'aritmia non è stata riprodotta. (B) Valori di soglia relativi per TdP di ciascun farmaco esaminato utilizzando i dati su tre (rosso), quattro (blu) e sei (nero) canali.

Nel 2019 è stato presentato un progetto che permettesse di ridurre i costi computazionali di queste simulazioni attraverso l'impiego di una mappa dei rischi dell'aritmia indotta da farmaci [65, 66] basata su un database completo degli effetti dei farmaci su simulazioni *in silico* di ECG. Per ogni combinazione di blocco delle 6 correnti analizzate, viene simulata l'attività elettrofisiologica del cuore e l'ECG a 12 derivazioni associato per creare una mappa a cinque dimensioni del rischio di aritmia, in cui le coordinate della mappa rappresentano l'entità del blocco di ciascuna corrente. I risultati vengono visualizzati in una presentazione a cinque dimensioni contenente sottospazi tridimensionali, in cui le regioni di aritmia sono sovrapposte alla distribuzione dell'intervallo QT. Poiché la relazione concentrazione-blocco di ciascun farmaco è tracciabile lungo una traiettoria in questi spazi, si è in grado di valutare i cambiamenti dell'ECG e l'aritmia (Fig. 4.14).



**Figura 4.14:** Mappa dei rischi aritmici indotti da farmaci. Il sistema di coordinate del sottospazio consiste nell'estensione del blocco di IKr, INa e ICaL. In ogni sottospazio (in questo caso blocco IKs = 0% e blocco INaL = 0%), l'effetto dose-dipendente del farmaco (bepridil) può essere tracciato come una traiettoria, e i numeri su di esse rappresentano le concentrazioni di farmaco espresse come multipli della concentrazione plasmatica terapeutica libera effettiva. La regione dell'aritmia è indicata come blocchi grigi. Affianco sono mostrate le variazioni dell'elettrocardiogramma a varie concentrazioni con la corrispondente sequenza di attivazione nel cuore.

Attraverso l'utilizzo del database è possibile analizzare gli effetti di ogni canale ionico sulle caratteristiche dell'ECG (durate del complesso QRS e degli intervalli Tpeak-end, JT e QT) e le conseguenze di questi sul rischio proaritmico dei farmaci studiati. Data la specificità della mappa è anche possibile valutare il margine di sicurezza per ogni concentrazione dei farmaci, valutato in base alla distanza tra l'area di rischio e il punto della mappa riferito alla concentrazione libera del farmaco ( $ETCP_{unbound}$  e multipli) che si sta studiando.

Nell'impiego dell'UT-heart come modello di simulazione vi è però un altro problema da affrontare per un'accurata valutazione quantitativa del rischio, ossia il legame farmaco-canale dipendente dallo stato (o dalla tensione) e il corrispettivo distacco, che avvengono su scale temporali diverse. Infine va tenuto presente che il modello di simulazione è basato su meccanismi dettagliati dell'elettrofisiologia cardiaca, ma non può riprodurre l'effetto sui canali non valutati sperimentalmente. Pertanto, sono necessari ulteriori studi, in particolare se si considera la crescente diversità nei nuovi bersagli farmacologici.

# CAPITOLO 5

## CONCLUSIONI

Con questo elaborato si è voluto descrivere il ruolo della modellistica matematica in ambito cardiologico. Attraverso la revisione della letteratura, è stato possibile studiare quali, finora, siano state le “scoperte” di maggior spessore, a livello matematico-ingegneristico, e la loro applicazione nel mondo dell’analisi medica.

In primo luogo sono stati analizzati i modelli matematici atti a simulare il comportamento elettrico delle cellule cardiache (cardiomiociti) dovuto a flussi di correnti ioniche che attraversano la membrana cellulare e producono delle variazioni di potenziale transmembrana, dando vita al potenziale d’azione. I modelli analizzati riguardano il potenziale d’azione generato da singole cellule ventricolari adulte (modello O’Hara-Rudy dynamic) e da cellule staminali pluripotenti indotte a cardiomiociti (modello Paci).

Il modello ORd, grazie alla mole di dati analizzata e alla specifica attenzione ai flussi delle correnti di ioni  $\text{Ca}^{2+}$ , riproduce in modo preciso i PA delle cellule ventricolari adulte, anche riportando eventuali scenari in cui si verificano aritmie o eventi collegabili a queste ultime. Mentre il modello Paci, benché le analisi dei dati *in vitro* e la riproduzione *in silico* siano precise, presenta alcune imprecisioni dovute principalmente a limitazioni nella descrizione dei flussi di ioni calcio (la descrizione della corrente  $I_{CaL}$  risulta essere troppo semplificata), ma anche legate all’eterogeneità e alla “immaturità” delle cellule staminali. Ciò rende la modellazione di cellule hiPSC-CM un obiettivo particolarmente interessante per la ricerca e lo sviluppo tecnologico. Un altro tipo di modello analizzato è quello di reazione-diffusione, basato sulle equazioni del mono- e bidominio: Esso ha una grande specificità e precisione numerica, tant’è che la maggior parte dei simulatori 3D vi sono basati sopra, ma presenta anche un costo computazionale non indifferente. Strategie per mantenere buone le prestazioni ma abbassare il costo sono in via di sviluppo per questi modelli. Successivamente sono stati descritti alcuni metodi per la simulazione e valutazione di possibili eventi di aritmia indotti dall’impiego di farmaci, che essi siano già presenti nel mercato o che essi siano ancora in fase di sperimentazione. Due metodi in particolare risultano essere i più incisivi e innovativi nella classificazione dei farmaci in base al loro rischio torsadogenico, dimostrando che le

linee guida precedenti peccavano di specificità in tale valutazione: l'iniziativa CiPA e un simulatore cardiaco 3D (UT-Heart).

L'iniziativa CiPA, utilizzando una versione ottimizzata del modello O'Hara-Rudy, analizza e classifica tali rischi in base al parametro qNet, che rappresenta il flusso netto di corrente ionica che attraversa la membrana; e successivamente confronta i risultati con un'analisi in vitro su hiPSC-CM. Questo approccio permette una grande precisione ( $\geq 80\%$ ) nella classificazione dei farmaci in tre categorie di rischio (alto, intermedio, basso). Tuttavia se i parametri che descrivono i legami farmaco-canale e il blocco delle correnti ioniche presentano incertezza (errori di misura dovuti all'analisi in vitro ad esempio), la metrica qNet può perdere precisione nel classificare correttamente alcuni farmaci, soprattutto quelli che si presentano al limite tra le categorie di rischio alto ed intermedio. Perciò tutt'ora sono in corso dibattiti sulla precisione di metriche derivate da modelli di PA cellulari e su quali possano essere delle metriche di classificazione migliori, come l'effetto del blocco di canali ionici multipli [49] o la risposta delle cellule hiPSC-CM all'applicazione di farmaci.

Il simulatore cardiaco UT-Heart, che fa parte di un sistema di valutazione di rischi aritmici (composto da analisi *in vitro* utilizzando la tecnica di patch-clamp automatizzato e una simulazione *in silico* dell'elettrofisiologia cardiaca), può essere utilizzato senza restrizioni su diverse tipologie di farmaci, ma rimane necessaria un'espansione sui dati analizzati in vitro per quanto riguarda alcuni canali ionici. Ciò nonostante, il suo approccio rimane robusto ed uno dei più rivoluzionari nei processi di *drug discovery* e *decision-making* in ambito clinico, e potrà servire come ottimo strumento nello sviluppo di farmaci, rendendo superflui ulteriori studi clinici o su animali.



# BIBLIOGRAFIA

1. Balboni G. C., Bastianini A., Brizzi E., Comparini L., Filogamo G., Giordano-Lanza G., Grossi C. E., Manzoli F. A., Marinozzi G., Motta P., Orlandini G. E., Passaponti A., Reale E., Ruggeri A., Santoro A., Zacchero D. *Anatomia Umana*, Edi Ermes 1979, Volume 1, Cap. 3, pg. 493-522;
2. Moruzzi G. (1979). *Fisiologia della vita di relazione*, Edi. Utet (II edizione), parte 1, cap. 1, pg. 3-49;
3. Courtemanche, M. J. (1998). Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model.
4. Dawodu AA, M. F. (1996). The shape of human atrial action potential accounts for different frequency-related changes in vitro. *Int J Cardiol* 54: 237–249.
5. Johnson E. A. & Lieberman, M. (1971). Heart: excitation and contraction. *Annu. Rev. Physiol.* 33,479–532. (doi:10.1146/annurev.ph.33.030171.002403).
6. Mathias, W. H. (2013). Benchmarking electrophysiological models of human atrial myocytes.
7. Nattel, S. L. (1997). Properties of human atrial I-Ca at physiological temperatures and relevance to action potential.
8. Ringer, S. (1883). A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol. (Lond.)* 4, 29–42.
9. Ganong, Barret, Barman, Boitano, Brooks *FISIOLOGIA MEDICA* -cap.28 “Origine del battito cardiaco ed attività elettrica del cuore” -cap.29 “Il cuore come pompa” Laura Lee Sherwood
10. *FISIOLOGIA UMANA* Valli Guido, 1987 *BIOINGEGNERIA DEL SISTEMA CARDIOVASCOLARE*
11. Paci M, Hyttinen J, Aalto-Setaa. Computational Models of Ventricular and Atrial-Like Human Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes. *Annals of Biomedical Engineering*. 2013;
12. Paci M, Computational modelling of human stem cell-derived cardiomyocytes. *Alma Mater Studiorum University of Bologna. Doctoral thesis*. 2013;
13. Noble D., Rudy Y. (2001). Models of cardiac ventricular action potentials: iterative interaction between experiment and simulation. *Philos Trans R Soc A* 359:1127-1142
14. Hodgkin A.L., Huxley A.F., Katz B. (1952). Measurement of Current-Voltage relations in the Membrane of the Giant Axon of Loligo, *J Physiol* 116, 449–472.
15. Noble, D.: A modification of the Hodgkin—Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials. *J. Physiol.* 160(2), 317–352 (1962). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006849>
16. Hodgkin, A.L., Huxley, A.F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiol.* 117(4), 500–544 (1952). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1952.sp004764>
17. Fabbri, A., Fantini, M., Wilders, R., Severi, S.: Computational analysis of the human sinus node action potential: model development and effects of mutations. *J. Physiol.* 595(7), 2365–2396 (2017). <https://doi.org/10.1113/JP273259>

18. Courtemanche, M., Ramirez, R.J., Nattel, S.: Ionic mechanisms underlying human atrial action potential properties: insights from a mathematical model. *Am. J. Physiol., Heart Circ. Physiol.* 275(1), H301–H321 (1998). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1998.275.1.H301>. PMID: 29586616
19. Grandi, E., Pandit, S.V., Voigt, N., Workman, A.J., Dobrev, D., Jalife, J., Bers, D.M.: Human atrial action potential and Ca<sup>2+</sup> model. *Circ. Res.* 109(9), 1055–1066 (2011). <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.253955>
20. Grandi, E., Pasqualini, F.S., Bers, D.M.: A novel computational model of the human ventricular action potential and ca transient. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 48(1), 112–121 (2010). <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.09.019>. Special Issue: Ion Channels
21. Kernik, D.C., Morotti, S., Wu, H., Garg, P., Duff, H.J., Kurokawa, J., Jalife, J., Wu, J.C., Grandi, E., Clancy, C.E.: A computational model of induced pluripotent stem-cell derived cardiomyocytes incorporating experimental variability from multiple data sources. *J. Physiol.* 597(17), 4533–4564 (2019). <https://doi.org/10.1113/JP277724>
22. O’Hara, T., Virág, L., Varró, A., Rudy, Y.: Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation. *PLoS Comput. Biol.* 7(5), 1–29 (2011). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1002061>
23. Paci, M., Pölonen, R.P., Cori, D., Penttinen, K., Aalto-Setälä, K., Severi, S., Hyttinen, J.: Automatic optimization of an in silico model of human ipsc derived cardiomyocytes recapitulating calcium handling abnormalities. *Front. Physiol.* 9, 709 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00709>
24. Stewart, P., Aslanidi, O.V., Noble, D., Noble, P.J., Boyett, M.R., Zhang, H.: Mathematical models of the electrical action potential of Purkinje fibre cells. *Philos. Trans. R. Soc., Math. Phys. Eng. Sci.* 367(1896), 2225–2255 (2009). <https://doi.org/10.1098/rsta.2008.0283>
25. ten Tusscher, K.H.W.J., Panfilov, A.V.: Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model. *Am. J. Physiol., Heart Circ. Physiol.* 291(3), H1088–H1100 (2006). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00109.2006>. PMID: 16565318
26. Noble, D.: A modification of the Hodgkin—Huxley equations applicable to Purkinje fibre action and pacemaker potentials. *J. Physiol.* 160(2), 317–352 (1962). <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1962.sp006849>
27. 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.
28. Paci, M., Pölonen, R. P., Cori, D., Penttinen, K., Aalto-Setälä, K., Severi, S., & Hyttinen, J. (2018). Automatic Optimization of an *in Silico* Model of Human iPSC Derived Cardiomyocytes Recapitulating Calcium Handling Abnormalities. *Frontiers in physiology*, 9, 709. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00709>
29. Roderick, H. L., Berridge, M. J., & Bootman, M. D. (2003). Calcium-induced calcium release. *Current Biology*, 13(11), R425
30. Tung, L.: a bi-domain model for describing ischemic myocardial d-C potentials. Ph.D. thesis, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, Mass, USA (1978)
31. Potse, M., Dube, B., Richer, J., Vinet, A., Gulrajani, R.M.: A comparison of monodomain and bid-

- main reaction-diffusion models for action potential propagation in the human heart. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 53(12), 2425–2435 (2006). <https://doi.org/10.1109/TBME.2006.880875>
32. Coudière, Y., Bourgault, Y., Rioux, M.: Optimal monodomain approximations of the bidomain equations used in cardiac electrophysiology. *Math. Models Methods Appl. Sci.* 24(6), 1115–1140 (2014). <https://doi.org/10.1142/S0218202513500784>
  33. Franzone, P.C., Pavarino, L., Taccardi, B.: Simulating patterns of excitation, repolarization and action potential duration with cardiac bidomain and monodomain models. *Math. Biosci.* 197(1), 35–66 (2005). <https://doi.org/10.1016/j.mbs.2005.04.003>
  34. Bourgault, Y., Pierre, C.: Comparing the bidomain and monodomain models in electro-cardiology through convergence analysis (2010). <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-00545888>.
  35. Stoelzle-Feix, S., Juhasz, K., Ulrich, T., Linder, P., George, M., Gossmann, M.: Higher throughput in vitro cardiac contractility recordings under physiological mechanical conditions (2019). <https://www.nanion.de/en/products/flexcyte-white-paper-download.html>. Nanion Technologies Whitepaper
  36. Killeen, M.J.: *Cardiac Drug Safety*. World Scientific, Singapore (2012). <https://www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/7839>
  37. ICH S7B: Note for Guidance on the Nonclinical Evaluation of the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals; International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (2005). Reference CHMP/ICH/423/02
  38. ICH E14: Note for Guidance on the Clinical Evaluation of QT/QTc Interval Prolongation and Proarrhythmic Potential for Nonantiarrhythmic Drugs; U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER) (2005). Reference CHMP/ICH/2/04
  39. Vos, M. A., van Opstal, J. M., Leunissen, J. D. & Verduyn, S. C. Electrophysiologic parameters and predisposing factors in the generation of drug-induced torsade de pointes arrhythmias. *Pharmacol. Ther.* 92, 109-122 (2001).
  40. J. Okada, T. Yoshinaga, J. Kurokawa, T. Washio, T. Furukawa, K. Sawada, S. Sugiura, T. Hisada, Screening system for drug-induced arrhythmogenic risk combining a patch clamp and heart simulator. *Sci. Adv.* 1, e1400142 (2015).
  41. Roden, D. M. Early after-depolarizations and torsade de pointes: implications for the control of cardiac arrhythmias by prolonging repolarization. *Eur Heart J.* 14 (Suppl. H), 56-61 (1993).
  42. Gintant, G., Sager, P. & Stockbridge, N. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nat Rev Drug Discov* 15, 457–471 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrd.2015>
  43. Li, Z., Dutta, S., Sheng, J., Tran, P.N., Wu, W., Chang, K., Mdluli, T., Strauss, D.G., Colatsky, T.: Improving the in silico assessment of proarrhythmia risk by combining hERG (human ether-a-go-go-related gene) channel–drug binding kinetics and multichannel pharmacology. *Circ. Arrhythm. Electrophysiol.* 10, e004,628 (2017). <https://doi.org/10.1161/CIRCEP.116.004628>
  44. Koivumäki, J.T., Naumenko, N., Tuomainen, T., Takalo, J., Oksanen, M., Puttonen, K.A., Lehtonen, Å., Kuusisto, J., Laakso, M., Koistinaho, J., Tavi, P.: Structural immaturity of human ipsc-derived

- cardiomyocytes: in silico investigation of effects on function and disease modeling. *Front. Physiol.* 9, 80 (2018). <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00080>
45. J. Okada, T. Washio, A. Maehara, S. Momomura, S. Sugiura, T. Hisada, Transmural and apicobasal gradients in repolarization contribute to T-wave genesis in human surface ECG. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 301, H200–H208 (2011).
  46. T. Washio, J. Okada, T. Hisada, A parallel multilevel technique for solving the bidomain equation on a human heart with Purkinje fibers and a torso model. *SIAM Rev.* 52, 717–743(2010).
  47. Thomas Colatsky, Bernard Fermini, Gary Gintant, Jennifer B. Pierson, Philip Sager, Yuko Sekino, David G. Strauss, Norman Stockbridge, The Comprehensive in Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative — Update on progress, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, Volume 81,2016,Pages 15-20,ISSN 1056-8719,<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.06.002>.
  48. Vicente, J., Zusterzeel, R., Johannesen, L., Mason, J., Sager, P., Patel, V., Matta, M.K., Li, Z., Liu, J., Garnett, C., Stockbridge, N., Zineh, I., Strauss, D.G.: Mechanistic model-informed proarrhythmic risk assessment of drugs: review of the “CiPA” initiative and design of a prospective clinical validation study. *Clin. Pharmacol. Ther.* 103(1), 54–66 (2018). <https://doi.org/10.1002/cpt.896>
  49. Kramer, J. et al. MICE Models: Superior to the HERG Model in Predicting Torsade de Pointes. *Sci. Rep.* 3, 2100; DOI:10.1038/srep02100 (2013).
  50. Obejero-Paz, C. A. *et al.* Quantitative Profiling of the Effects of Vanoxerine on Human Cardiac Ion Channels and its Application to Cardiac Risk. *Sci. Rep.* 5, 17623; doi: 10.1038/ srep17623 (2015).
  51. Gintant, G., Sager, P. & Stockbridge, N. Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nat Rev Drug Discov* 15, 457–471 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.34>
  52. Amosa, Mutiu & Jami, Mohammed & ALKHATIB, MAAN & Majozi, Thokozani & Adeniyi, Adewale & Aderibigbe, Fatai & Abdulkareem, Sulyman. (2019). Modeling of Pore-Blocking Behaviors of Low-Pressure Membranes during Constant-Pressure Filtration of an Agro-Industrial Wastewater. 10.1201/b22241-9.
  53. CPT Pharmacometrics Syst. *Pharmacol.* (2019) 8, 371–379; doi:10.1002/psp4.12423
  54. Moreno JD, Lewis TJ, Clancy CE (2016) Parameterization for In-Silico Modeling of Ion Channel Interactions with Drugs. *PLoS ONE* 11(3): e0150761. doi:10.1371/journal.pone.0150761
  55. Dutta S, Chang KC, Beattie KA, Sheng J, Tran PN, Wu WW, Wu M, Strauss DG, Colatsky T and Li Z (2017) Optimization of an In silico Cardiac Cell Model for Proarrhythmia Risk Assessment. *Front. Physiol.* 8:616. doi: 10.3389/fphys.2017.00616
  56. Strauss, D.G., Gintant, G., Li, Z. *et al.* Comprehensive In Vitro Proarrhythmia Assay (CiPA) Update from a Cardiac Safety Research Consortium / Health and Environmental Sciences Institute / FDA Meeting. *Ther Innov Regul Sci* 53, 519–525 (2019). <https://doi.org/10.1177/2168479018795117>
  57. Li Z, Dutta S, Sheng J, Tran PN, Wu W, Chang K, Mdluli T, Strauss DG, Colatsky T. Improving the In Silico Assessment of Proarrhythmia Risk by Combining hERG (Human Ether-à-go-go-Related Gene) Channel-Drug Binding Kinetics and Multichannel Pharmacology. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2017 Feb;10(2):e004628. doi: 10.1161/CIRCEP.116.004628. Erratum in: *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2017 Mar;10 (3): PMID: 28202629.
  58. Li Z, Mirams GR, Yoshinaga T, Ridder BJ, Han X, Chen JE, Stockbridge NL, Wisialowski TA,

- Damiano B, Severi S, Morissette P, Kowey PR, Holbrook M, Smith G, Rasmusson RL, Liu M, Song Z, Qu Z, Leishman DJ, Steidl-Nichols J, Rodriguez B, Bueno-Orovio A, Zhou X, Passini E, Edwards AG, Morotti S, Ni H, Grandi E, Clancy CE, Vandenberg J, Hill A, Nakamura M, Singer T, Polonchuk L, Greiter-Wilke A, Wang K, Nave S, Fullerton A, Sobie EA, Paci M, Musuamba Tshinanu F, Strauss DG. General Principles for the Validation of Proarrhythmia Risk Prediction Models: An Extension of the CiPA In Silico Strategy. *Clin Pharmacol Ther.* 2020 Jan;107(1):102-111. doi: 10.1002/cpt.1647. Epub 2019 Nov 10. PMID: 31709525; PMCID: PMC6977398.
59. Paci M, Hyttinen J, Rodriguez B, Severi S. Human induced pluripotent stem cell-derived versus adult cardiomyocytes: an in silico electrophysiological study on effects of ionic current block. *Br J Pharmacol.* 2015 Nov;172(21):5147-60. doi: 10.1111/bph.13282. Epub 2015 Oct 15. PMID: 26276951; PMCID: PMC4629192.
  60. Andrysiak, K., Stępniewski, J. & Dulak, J. Human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, 3D cardiac structures, and heart-on-a-chip as tools for drug research. *Pflugers Arch - Eur J Physiol* 473, 1061–1085 (2021). <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02536-z>
  61. Rob Wallis, Charles Benson, Borje Darpo, Gary Gintant, Yasunari Kanda, Krishna Prasad, David G. Strauss, Jean-Pierre Valentin, CiPA challenges and opportunities from a non-clinical, clinical and regulatory perspectives. An overview of the safety pharmacology scientific discussion, *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, Volume 93, 2018, Pages 15-25, ISSN 1056-8719, <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2018.06.005>.
  62. Yasunari Kanda, Daiju Yamazaki, Tomoharu Osada, Takashi Yoshinaga, Kohei Sawada,
  63. Development of torsadogenic risk assessment using human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Japan iPS Cardiac Safety Assessment (JiCSA) update, *Journal of Pharmacological Sciences*, Volume 138, Issue 4, 2018, Pages 233-239, ISSN 1347-8613, <https://doi.org/10.1016/j.jphs.2018.10.010>.
  64. T. Brennan, M. Fink, B. Rodriguez, Multiscale modelling of drug-induced effects on cardiac electrophysiological activity, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Volume 36, Issue 1, 2009, Pages 62-77, ISSN 0928-0987, <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2008.09.013>.
  65. Okada J, Yoshinaga T, Kurokawa J, Washio T, Furukawa T, Sawada K, Sugiura S, Hisada T. Arrhythmic hazard map for a 3D whole ventricle model under multiple ion channel block. *Br J Pharmacol.* 2018;175:3435–3452.
  66. Okada, J. I., Washio, T., Sugiura, S., & Hisada, T. (2019). Clinical and pharmacological application of multiscale multiphysics heart simulator, UT-Heart. *The Korean journal of physiology & pharmacology : official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 23(5), 295–303. <https://doi.org/10.4196/kjpp.2019.23.5.295>
  67. ten Tusscher KH, Panfilov AV. Alternans and spiral breakup in a human ventricular tissue model. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006 Sep;291(3):H1088-100. doi: 10.1152/ajpheart.00109.2006. Epub 2006 Mar 24. PMID: 16565318.
  68. Luo CH, Rudy Y. A dynamic model of the cardiac ventricular action potential. I. Simulations of ionic currents and concentration changes. *Circ Res.* 1994 Jun;74(6):1071-96. doi: 10.1161/01.res.74.6.1071. PMID: 7514509.

69. Noble D. Modelling the heart--from genes to cells to the whole organ. *Science*. 2002 Mar 1;295(5560):1678-82. doi: 10.1126/science.1069881. PMID: 11872832.
70. Kügler, P. Modelling and Simulation for Preclinical Cardiac Safety Assessment of Drugs with Human iPSC-Derived Cardiomyocytes. *Jahresber. Dtsch. Math. Ver.* 122, 209–257 (2020). <https://doi.org/10.1365/s13291-020-00218-w>