



UNIVERSITÀ POLITECNICA DELLE MARCHE

FACOLTÀ DI INGEGNERIA

Dipartimento di Ingegneria Dell'Informazione (DII)

Corso di Laurea Triennale in Ingegneria Biomedica

STIMA DEL BLOCCAGGIO DEI CANALI POTASSIO A SEGUITO
DELLA SOMMINISTRAZIONE DI FARMACI ANTIARITMICI
MEDIANTE MODELLO MATEMATICO

ESTIMATION OF POTASSIUM CHANNEL BLOCK FOLLOWING
ADMINISTRATION OF ANTIARRHYTHMIC DRUGS THROUGH
MATHEMATICAL MODEL

Relatrice:

Prof.ssa Laura Burattini

Laureanda:

Laura Scinocca

Correlatrici:

Dott.ssa Micaela Morettini

Dott.ssa Agnese Sbröllini

Anno Accademico 2019/2020

*A mia madre,
porto sicuro per
rifugiarsi dopo ogni sconfitta.*

*A mio padre,
fiero sostenitore del:
“Non l’ho mai vista studiare!”*

Ed anche un po’ a me.

ABSTRACT

Il cuore è l'organo propulsore del sistema cardiocircolatorio. L'attività contrattile delle fibrocellule muscolari cardiache avviene grazie alla presenza del sistema elettrico di conduzione, che viene studiato attraverso l'elettrocardiogramma (ECG). Il sistema elettrico di conduzione è formato da cellule specializzate, con funzione di pacemaker e di propagazione dello stimolo elettrico. Fisiologicamente l'impulso elettrico origina a livello del nodo seno atriale, il pacemaker cardiaco principale. L'attività elettrica della cellula è dovuta a correnti di ioni che fluiscono dall'interno all'esterno della cellula e viceversa. La generazione del potenziale d'azione (AP) del muscolo cardiaco risulta essere strettamente correlato alla presenza degli ioni potassio, sodio, calcio e cloro, presenti in concentrazioni nettamente differenti tra l'ambiente cellulare ed extracellulare. Variazioni significative delle concentrazioni ioniche a cavallo della membrana comporterebbero una genesi scorretta del potenziale d'azione che potrebbe evolvere in patologie cardiache. Lo scopo è stato quello di stimare il bloccaggio dei canali potassio a seguito della somministrazione di alcuni farmaci antiaritmici attraverso un modello matematico. A questo scopo sono stati esaminati i dati relativi ad un clinical trial che comprendeva ventidue soggetti sani ai quali erano stati somministrati ciclicamente farmaci antiaritmici: Dofetilide, Ranolazina, Chinidina e Verapamil. I soggetti sono stati sottoposti ad un'analisi continua del tracciato elettrocardiografico dal quale sono stati scelti 15 istanti di tempo per ogni soggetto dall'immediato post dosaggio fino alla fine delle 24 ore successive. Addizionalmente, per tutti gli istanti scelti sono stati prelevati dei campioni di sangue per l'analisi farmacocinetica.

Il vettorcardiogramma (VCG) medio derivato da ogni dieci secondi del segmento ECG è stato ritenuto rappresentativo del tracciato stesso, i suoi valori sperimentali sono stati riportati nel database Physionet. Il VCG medio è stato usato per l'estrazione delle features di caratteristiche della ripolarizzazione precoce $ERD_{30\%}$ e ripolarizzazione tardiva $T_{S/A}$ che rappresentano rispettivamente il 30% della durata della ripolarizzazione precoce ed il rapporto tra la pendenza dell'onda T e la sua ampiezza. Nel totale sono state utilizzate un totale di 1320 coppie di $ERD_{30\%}$ e $T_{S/A}$, partizionate e casualmente smistate in due gruppi. Il 50% del database è stato inserito nel training ed utilizzato per la costruzione del modello, mentre il restante 50% utilizzato come testing dataset. L'indice di bloccaggio dei canali hERG del potassio è stato modellato sulla base dell'equazione di regressione lineare:

$$B_{ECG}(\%) = a \cdot ERD_{30} + b \cdot T_{S/A} + c \cdot ERD_{30} \cdot T_{S/A} + d$$

È stato usato, inoltre, un indice di riferimento plasmatico per quel che riguarda il bloccaggio dei canali potassio $B_{REF}(\%)$ ottenuto attraverso l'equazione di Hill.

Dall'analisi sono stati ricavati i tre coefficienti a , b , c e l'intercetta d , con i seguenti valori:

$a = -561.0 s^{-1}$, $b = -9.7 s$, $c = 77.2$ e $d = 138.9$. Ottenendo un coefficiente di correlazione tra $B_{ECG}(\%)$ e $B_{REF}(\%)$ di $0.67(p < 10^{-81})$. L'errore stimato era di $11.5 \pm 16.7\%$. In conclusione, si può affermare che $B_{ECG}(\%)$ è un indice affidabile per quel che riguarda una stima non invasiva del bloccaggio farmaco-indotto dei canali hERG del potassio, indipendente dal bloccaggio degli altri canali ionici concomitante.

INDICE

INTRODUZIONE	I
1. Anatomia e Fisiologia del cuore	1
1.1 Il circolo sistemico	
1.1.1 La parete e le cellule cardiache	
1.2 Attività elettrica del cuore	3
1.2.1 Potenziale di membrana delle cellule	4
1.2.2 Potenziale d'azione cardiaco	5
1.2.3 Le correnti ioniche	7
1.3 Il sistema di conduzione cardiaco	8
2. Elettrocardiogramma	9
2.1 Il tracciato ECG	9
2.2 Le derivazioni ECG	11
2.2.1 Derivazioni bipolari	11
2.2.2 Derivazioni unipolari aumentate di Goldberger	12
2.2.3 Derivazioni unipolari precordiali di Wilson	13
2.2.4 Derivazioni ortogonali o di Frank	14
2.3 Il vettore cardiaco	15
2.4 Vettorcardiogramma	15
3. Bloccaggio canali ionici	17
3.1 Descrizione e classificazione dei farmaci antiaritmici	18
3.1.1 Aritmie e disturbi dell'attività cardiaca	19
3.2 Sindrome del QT Lungo	20
3.3 Effetto dei farmaci sulla morfologia dell'onda T	21
4. Modello matematico per la stima del bloccaggio dei canali potassio	23
4.1 Materiali e Metodi	23
4.1.1 Database	23
4.1.2 Estrazione delle features di ripolarizzazione elettrocardiografica	24
4.1.3 Analisi Statistica	25
4.2 Risultati	26
DISCUSSIONE E CONCLUSIONE	II
BIBLIOGRAFIA	IV
RINGRAZIAMENTI	V

Introduzione

Negli anni '90 molti farmaci antiaritmici vennero ritirati dal mercato in quanto induttori del prolungamento dell'intervallo QT e *torsade de pointes*, grave aritmia sopra ventricolare. Fu ampiamente riconosciuto che quasi tutti i farmaci che causavano questa aritmia avevano una stretta correlazione anche con il bloccaggio del canale hERG del potassio. La generazione del potenziale d'azione (AP) del muscolo cardiaco risulta essere strettamente correlato alla presenza degli ioni potassio, sodio, calcio e cloro, presenti in concentrazioni nettamente differenti tra l'ambiente cellulare ed extracellulare. È, quindi, di fondamentale importanza preservare l'equilibrio ionico tra l'interno e l'esterno membrana plasmatica al fine di consentire un regolare sviluppo del potenziale d'azione. Qualora avvenga un'alterazione significativa delle concentrazioni ioniche si può incorrere in una incorretta generazione del potenziale d'azione e lo sviluppo di patologie cardiache che ne conseguono. Si è osservato, dunque come la somministrazione di alcuni farmaci antiaritmici di uso comune possono dar luogo operando attivamente al bloccaggio delle correnti ioniche a cavallo della membrana plasmatica e dunque modificando l'AP. Tra gli effetti collaterali è presente un effetto collaterale noto come *torsades de pointes* (torsione di punta), una tachicardia ventricolare (TV) polimorfa che può verificarsi nel contesto di un allungamento dell'intervallo QT. La TV polimorfa si associa spesso a ischemia acuta e tende ad essere elettricamente instabile. Si verifica in presenza di alterazioni della ripolarizzazione. Benché sia stata osservata nelle forme congenite della sindrome del QT lungo, presenti fin dall'infanzia, questa aritmia si sviluppa generalmente come risposta pro-aritmica ad un farmaco antiaritmico di classe IA o III e più raramente in caso di somministrazione di un agente di classe IC. Lo scopo di questa tesi è la stima del bloccaggio dei canali hERG del potassio (K^+) dopo la somministrazione di determinati farmaci antiaritmici mediante un modello matematico basato sulle features di ripolarizzazione elettrocardiografica e come queste possano svolgere un ruolo predittivo relativo al bloccaggio dei canali ionici. Questa stima sarà svolta su dei dati raccolti e liberamente disponibili sul database Physionet di un studio clinico condotto su ventidue soggetti sani senza patologie cardiovascolari pregresse nel quadro clinico familiare a cui sono stati somministrati ciclicamente quattro farmaci antiaritmici.

CAPITOLO UNO: Anatomia e Fisiologia del cuore

Il cuore è un organo muscolare cavo situato nel mediastino anteriore. La sua continua attività fa sì che venga definito il centro propulsore dell'apparato circolatorio.

Il cuore è rivestito esteriormente da una membrana sierosa, chiamata pericardio, che lo fissa inferiormente al centro frenico del diaframma e lo avvolge, isolandolo e proteggendolo dagli organi vicini. Il pericardio può essere suddiviso in pericardio viscerale e pericardio parietale. Il pericardio viscerale, o epicardio, riveste la superficie esterna del cuore, mentre il pericardio parietale ricopre la superficie interna del sacco pericardico, che circonda il cuore.

Diverse caratteristiche esterne del cuore possono essere utilizzate per identificare le sue quattro camere mostrate in sezione nella Figura 1.

I due atri hanno pareti muscolari relativamente sottili e sono ampiamente espandibili. Il limite tra atri e ventricoli è segnato dal solco coronarico, mentre il confine tra i ventricoli sinistro e destro è dato dal solco intraventricolare anteriore ed il solco intraventricolare posteriore. I solchi contengono, oltre al tessuto adiposo, le principali arterie e vene che forniscono sangue al muscolo cardiaco. Le grandi vene ed arterie del sistema circolatorio sono connesse alla porzione superiore, l'estremità inferiore e appuntita del cuore è l'apice. Il cuore è inclinato rispetto all'asse longitudinale del corpo e ruotato leggermente verso sinistra, cosicché la superficie anteriore consiste principalmente dell'atrio destro e del ventricolo destro. La parete del ventricolo sinistro costituisce gran parte della superficie posteriore.

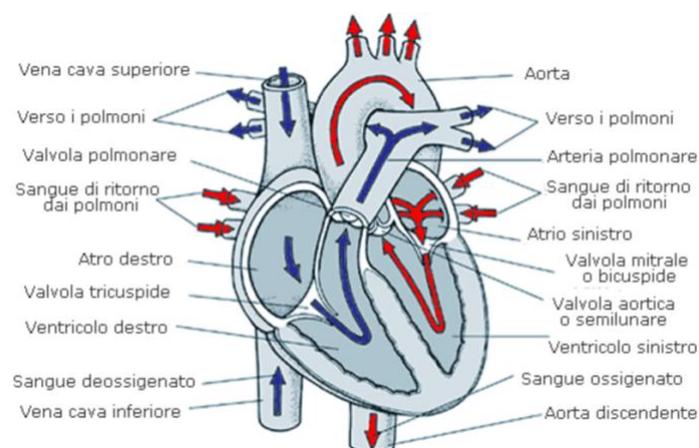


Fig. 1 Sezione anatomica del cuore

1.1 Il circolo sistemico

Ogni atrio si apre nel ventricolo dello stesso lato attraverso una valvola atrioventricolare (AV), pieghe di tessuto fibroso che assicurano l'unidirezionalità del flusso ematico dagli atri ai ventricoli.

L'atrio destro riceve il sangue dal circolo sistemico attraverso due grandi vene, la vena cava superiore e la vena cava inferiore. Le vene cardiache restituiscono il sangue venoso del cuore attraverso il seno coronario, che si apre nell'atrio destro, poco al di sotto dell'apertura della vena cava inferiore. Il sangue si sposta dall'atrio destro al ventricolo destro attraverso un'ampia apertura ai cui bordi si trovano tre lembi di tessuto fibroso, la valvola tricuspide. Il sangue che lascia il ventricolo destro fluisce nel tronco polmonare, il punto di partenza del circolo polmonare. La valvola semilunare polmonare protegge l'entrata in questo tronco efferente. All'interno del tronco polmonare, il sangue fluisce nelle arterie polmonari sinistra e destra. Questi vasi si ramificano ripetutamente nei polmoni prima di dare origine ai capillari dove avvengono gli scambi gassosi. Da questi capillari respiratori il sangue ossigenato si muove nelle vene polmonari sinistra e destra, che lo distribuiscono all'atrio sinistro. Come l'atrio destro, l'atrio sinistro ha un'auricola esterna ed una valvola, la valvola atrioventricolare sinistra, o valvola bicuspidale. L'organizzazione interna del ventricolo sinistro somiglia a quella del ventricolo destro. I muscoli papillari, estroflessioni conformi alla superficie interna del ventricolo, rinforzano le corde tendinee che si inseriscono nella valvola bicuspidale. Il sangue che lascia il ventricolo sinistro passa attraverso la valvola semilunare aortica e nell'aorta, il punto d'inizio del circolo sistemico.

1.1.2 La parete cardiaca e le cellule cardiache

La parete del cuore si distingue in tre diversi strati: l'epicardio, il miocardio e l'endocardio. L'epicardio ricopre la superficie esterna del cuore, è una membrana sierosa composta da un epitelio esposto e da un sottostante strato di tessuto connettivo adeso al miocardio. Il miocardio, o parete muscolare del cuore, contiene tessuto muscolare cardiaco, vasi ematici e nervi. Il tessuto muscolare cardiaco del miocardio forma strati concentrici che si avvolgono attorno agli atri e si dispongono a spirale nelle pareti dei ventricoli. Le superfici interne del cuore, comprese le valvole cardiache, sono ricoperte dall'endocardio.

Le cellule muscolari cardiache, miociti, sono più piccole delle fibre muscolari scheletriche e contengono un unico nucleo posizionato centralmente. Ogni fibrocellula cardiaca è in contatto con diverse altre per mezzo di siti specializzati noti come dischi intercalari. A livello di un disco intercalare, le membrane collegate di due cellule adiacenti sono tenute insieme da desmosomi e connesse da gap-Junction. Queste ultime provvedono alla diffusione di ioni e piccole molecole, permettendo al potenziale d'azione di propagarsi rapidamente da cellula a cellula. In un singolo battito cardiaco, l'intero cuore si contrae in modo coordinato così che il sangue fluisce nella corretta direzione al tempo opportuno.

Due tipi di cellule cardiache sono coinvolte in un battito normale: le cellule contrattili che costituiscono la massa del tessuto muscolare cardiaco e producono le potenti contrazioni che spingono il sangue, e le cellule muscolari non contrattili specializzate nel sistema di conduzione, controllando e coordinando le attività delle cellule contrattili.

1.2 Attività elettrica del cuore

1.2.1 Potenziale di membrana delle cellule

L'attività elettrica della cellula è dovuta a correnti di ioni che fluiscono dall'interno all'esterno della cellula e viceversa. La membrana cellulare, composta da un doppio strato fosfolipidico, è quasi del tutto impermeabile alle sostanze idrosolubili e permeabile alle sostanze liposolubili. Le proteine trans membrana che si trovano nel film fosfolipidico sono addette alla diffusione intracellulare ed extracellulare di acqua e ioni. Essi sono presenti in concentrazioni variabile nel liquido interstiziale e all'interno della cellula, contribuendo a creare una corrente ionica a cavallo della membrana cellulare.

Il potenziale di membrana di una cellula è la differenza di potenziale che si misura ai capi della membrana cellulare, risultante da un processo di natura elettro-chimica di diffusione degli ioni attraverso la membrana stessa. È presente nelle cellule di tutti gli eucarioti e assume valori generalmente compresi tra -40 mV e -80 mV, variando a seconda del tipo di cellula. I principali ioni che concorrono al potenziale di membrana delle cellule miocardiche e le relative concentrazioni sono (Tab. 1):

<i>IONE</i>	<i>INTERNO</i>	<i>ESTERNO</i>
Sodio [Na ⁺]	18 mM	145 mM
Potassio [K ⁺]	135 mM	3 mM
Cloro [Cl ⁻]	7 mM	120 mM
Calcio [Ca ²⁺]	100 nM	1,2 mM

Tab. 1: Concentrazione ioniche all'interno e all'esterno della membrana delle cellule miocardiche.

Si nota l'elevata concentrazione di K⁺ ed una bassa concentrazione di Ca²⁺ nei liquidi intracellulari, viceversa nei liquidi extracellulari che presentano una notevole concentrazione di Na⁺ e Cl⁻.

Il potenziale di equilibrio per ogni ione è calcolabile mediante l'equazione di Nerst (1).

$$E = -\frac{RT}{zF} \ln \frac{[I]_{in}}{[I]_{es}} \quad (1)$$

dove:

R: costante universale dei gas (= 8.31 J*K⁻¹*mol⁻¹); T: temperatura in Kelvin;

z: numero degli ioni trasferiti nella cellula;

F: costante di Faraday (= 9.65*10⁴ C*mol⁻¹).

Il potenziale di membrana, invece, viene definito attraverso l'Equazione di Goldman (2) e tiene conto della totalità degli ioni presenti:

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K[K_{es}^+] + P_{Na}[Na_{es}^+] + P_{Cl}[Cl_{in}^-]}{P_K[K_{in}^+] + P_{Na}[Na_{in}^+] + P_{Cl}[Cl_{es}^-]} \quad (2)$$

dove:

P_i= permeabilità, ovvero facilità con la quale una carica attraversa la membrana, con i che rappresenta la corrente ionica (K⁺, Na⁺, Cl⁻).

1.2.3 Il potenziale d'azione cardiaco

Partendo da condizioni di riposo il potenziale transmembrana può transitoriamente invertirsi diventando positivo e generando un potenziale d'azione (AP, Action Potential), per poi tornare alla condizione di riposo. Esistono diverse forme del potenziale d'azione a seconda del tipo di tessuto cellulare, ma, in qualunque forma esso sia, costituisce un segnale elettrico che si propaga con estrema velocità e che trasporta informazione per la comunicazione a livello intercellulare. La sua morfologia è descritta in figura (Fig. 2):

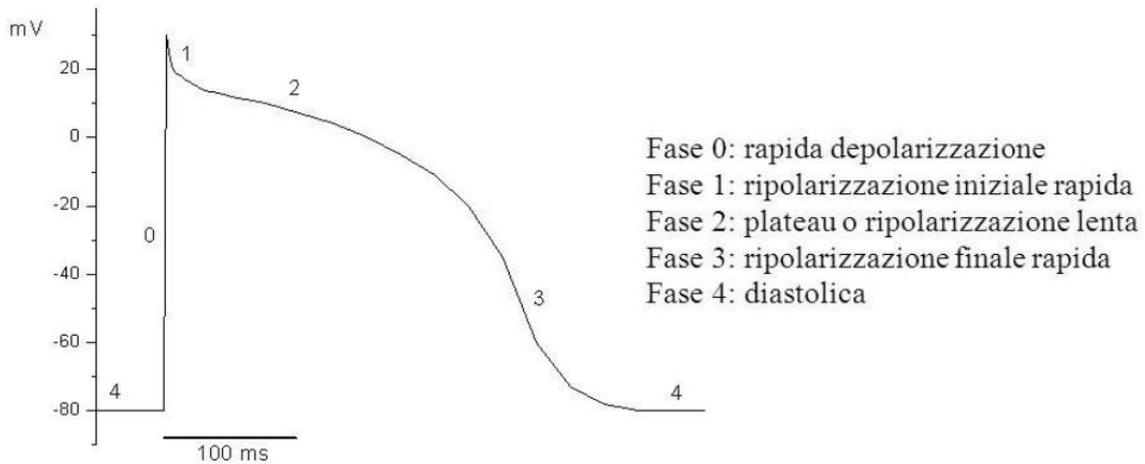


Fig. 2 Potenziale d'azione di una fibra miocardica.

La cellula cardiaca, come nelle fibre muscolari a riposo ha un potenziale trans-membrana negativo di 80-90 mV, l'ampiezza del potenziale d'azione è di circa 105 mV ed il picco del potenziale è situato a circa +20 mV (Fig. 2). In tale situazione di riposo i canali K^+ sono aperti ed i canali Na^+ sono chiusi. L'apertura dei canali del sodio voltaggio-dipendenti dà inizio al potenziale d'azione.

Possono essere descritte così le cinque fasi del potenziale d'azione delle cellule cardiache:

- *FASE 0*: anche detta fase di depolarizzazione rapida è provocata da uno stimolo efficace che superi il valore di soglia ed è dovuta quasi esclusivamente all'ingresso di ioni Na^+ a seguito di un rapido aumento della conduttanza dei canali ionici corrispondenti. L'ingresso di Na^+ provoca l'attivazione di altri canali rapidi dello ione sodio che ne aumentano ulteriormente l'ingresso, con un meccanismo a feedback positivo. La velocità di depolarizzazione è determinata dal flusso di questi entrante nella cellula. L'ingresso di Na^+ si arresta dopo 1-2 ms a causa dell'inattivazione dei canali ionici subito dopo l'apertura e la conduttanza torna ad assumere i valori che aveva prima dell'attivazione. Finché la cellula non è completamente ripolarizzata (-90 mV) i canali non riescono ad uscire da questo stato di inattivazione.
- *FASE 1*: Breve periodo di ripolarizzazione che rispecchia in parte l'effetto dell'inattivazione dei canali rapidi del Na^+ , ma soprattutto causata dall'apertura di canali del K^+ che consentono il passaggio di una corrente uscente transiente ripolarizzante.
- *FASE 2*: Fase di plateau caratteristica dell'AP cardiaco nonché principale responsabile della sua durata. In questa fase, gli ioni Ca^{2+} e in parte anche gli ioni Na^+ entrano nella cellula attraverso canali molto lenti. Contemporaneamente escono gli ioni potassio.
- *FASE 3*: L'uscita degli ioni potassio continua anche dopo la chiusura dei canali del calcio. L'interno della cellula tende a diventare negativo.
- *FASE 4*: Nell'ultima fase si ha il ripristino delle concentrazioni ioniche ai valori di riposo.

1.2.4 Le correnti ioniche

Durante il potenziale d'azione fisiologico, le correnti Na^+ e di Ca^{2+} sono entranti e causano depolarizzazione, le correnti di K^+ sono uscenti e causano ripolarizzazione. Le correnti vengono denotate dal simbolo I seguito dal simbolo dello ione che trasporta la corrente (es. I_{Na} = corrente di Na^+) e, eventualmente, da ulteriori simboli che definiscono il tipo di corrente. In Fig. 3 sono rappresentate le principali correnti cardiache di interesse.

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

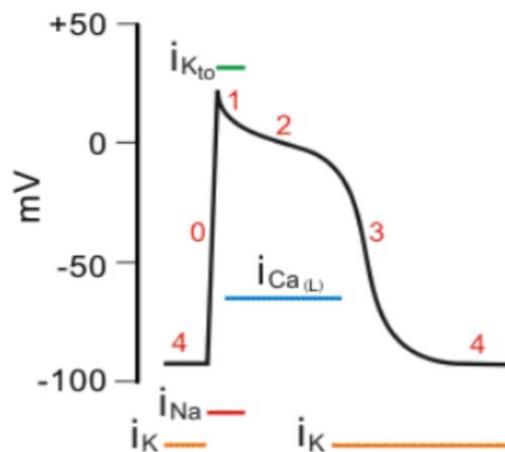


Fig. 3 Principali correnti coinvolte nell' AP cardiaco

1.3 Il sistema di conduzione cardiaco

Diversamente dagli altri muscoli del corpo la cui attività dipende dal cervello e dal midollo spinale, il cuore è autosufficiente in quanto possiede un proprio stimolatore che genera l'impulso elettrico che determina la contrazione cardiaca.

Lo stimolo che genera la contrazione è di natura elettrica e si origina involontariamente dai centri di controllo posti nel sistema nervoso centrale nell'encefalo e nel midollo spinale. Esso viene trasportato dal sistema nervoso centrale al cuore attraverso le vie efferenti parasimpatiche e simpatiche.

Questo stimolatore che si chiama nodo senoatriale produce l'impulso nervoso che come una scossa elettrica genera la contrazione del cuore. È questa sua proprietà, detta automatismo, di produrre spontaneamente lo stimolo che regola la frequenza cardiaca, *ritmo sinusale*, è un vero e proprio pacemaker del cuore. È situato nell'atrio destro, vicino allo sbocco della vena cava superiore.

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; la sua estremità è in continuità con il miocardio atriale e con fibre dei tratti internodali.

Lo stimolo, giunto nel nodo atrio ventricolare, rallenta in modo che la depolarizzazione dei due atri possa essere completata e, successivamente, riacquista velocità diffondendosi attraverso il fascio di His. Questo tessuto specializzato nella conduzione è continuazione del nodo atrioventricolare ed è situato nella porzione membranosa e prossimale del setto interventricolare.

Esso si suddivide nelle branche destra e sinistra che decorrono sotto l'endocardio lungo le due superfici del setto del cuore. Perifericamente entrambe le branche del fascio comune si suddividono e formano la rete subendocardiaca delle fibre di Purkinje, che si estendono nelle pareti ventricolari in rapporto diretto con le fibre della muscolatura ventricolare.

Pertanto, non appena l'impulso elettrico partito dal nodo senoatriale arriva ai ventricoli, il cuore batte ed il sangue scorre a raggiungere tutte le parti del corpo.

CAPITOLO DUE: Elettrocardiogramma

Per analizzare la propagazione del potenziale d'azione nel cuore, si può valutare il segnale elettrocardiografico. L'insorgere degli impulsi nel miocardio porta alla generazione di differenze di potenziale (ddp), che variano nello spazio e nel tempo e che possono essere registrate tramite degli elettrodi. La registrazione della ddp da parte di elettrodi posti sulla superficie corporea avviene grazie alla conducibilità dei liquidi interstiziali del corpo umano.

2.1 Il tracciato elettrocardiografico

Il tracciato elettrocardiografico (ECG) rappresenta il metodo più facile, meno dispendioso e più pratico per osservare se l'attività elettrica del cuore è normale oppure se sono presenti patologie di natura meccanica o bioelettrica. Il normale tracciato ECG presenta un aspetto caratteristico costituito da diverse onde, positive e negative, che si ripetono ad ogni ciclo cardiaco e che in presenza di alterazioni dell'attività elettrica del cuore si modificano, rendendone possibile la diagnosi. In Figura 4 è rappresentata la morfologia di un singolo battito cardiaco. La contrazione atriale causa una deflessione nel tracciato ECG chiamata curva P. Le altre curve, Q, R, S e T sono dovute all'azione dei ventricoli e sono quindi note come complesso ventricolare.

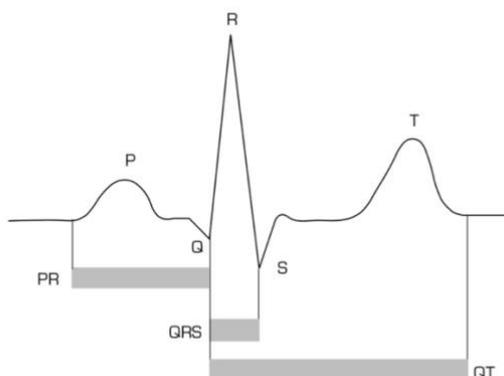


Fig. 4 Rappresentazione grafica di un battito sintetico

Secondo convenzioni stabilite a livello internazionale, la traccia ECG si compone delle seguenti parti:

- *Onda P*, la prima onda identificabile nel ciclo. Ha origine dal nodo senoatriale e corrisponde alla depolarizzazione degli atri. È di piccole dimensioni in quanto la contrazione degli atri non è così potente. La sua durata varia tra i 60 e i 120 ms, l'ampiezza è uguale o inferiore ai 2,5 mm.
- *Intervallo PR*, è l'intervallo necessario affinché la depolarizzazione atriale raggiunga i ventricoli. Raggiunto il nodo AV, si ha un rallentamento della conduzione elettrica sino al raggiungimento del sistema di conduzione ventricolare per mezzo del fascio di His e delle sue branche. Si registra un intervallo isoelettrico a causa delle minime forze elettriche generate dalle dimensioni ridotte di queste strutture. Le misurazioni dell'intervallo PR sono generalmente comprese tra un minimo di 120 ms e un massimo di 200 ms (da 3 a 5 mm).
- *Complesso QRS*, si tratta di un insieme di tre onde che si susseguono l'una all'altra, e corrisponde alla depolarizzazione dei ventricoli. L'onda Q è negativa e di piccole dimensioni, e corrisponde alla depolarizzazione del setto interventricolare; la R è un picco molto alto positivo, e corrisponde alla depolarizzazione dell'apice del ventricolo sinistro; la S è un'onda negativa anch'essa di piccole dimensioni, e corrisponde alla depolarizzazione delle regioni basale e posteriore del ventricolo sinistro. La durata dell'intero complesso è compresa tra i 60 e 90 ms (da 1,5 a 2,25 mm). In questo intervallo avviene anche la ripolarizzazione atriale che però non risulta visibile perché mascherata dalla depolarizzazione ventricolare.
- *Tratto ST*, rappresenta il periodo in cui le cellule ventricolari sono tutte depolarizzate e pertanto non sono rilevabili movimenti elettrici, sino all'inizio della ripolarizzazione. Il tratto ST è isoelettrico, ossia posto sulla linea di base del tracciato, dalla quale si può spostare di non più di 1 mm (pari a 0,1 mV) verso l'alto o verso il basso.
- *Onda T*, Rappresenta la prima onda ripolarizzazione dei ventricoli. Non sempre è identificabile perché può avere un'ampiezza anche molto piccola.
- *Intervallo QT*, rappresenta la sistole elettrica, cioè il tempo in cui avviene la depolarizzazione e la ripolarizzazione ventricolare. La sua durata varia al variare della frequenza cardiaca, generalmente si mantiene tra i 350 e i 440ms.
- *Onda U*, è un'onda che non sempre è possibile apprezzare in un tracciato, perché spesso di dimensioni minime. È dovuta alla ripolarizzazione dei muscoli papillari.

2.2 Le derivazioni elettrocardiografiche

Come affermato in precedenza, per registrare l'ECG è necessario disporre degli elettrodi sulla superficie corporea, formando delle derivazioni sistematiche in maniera tale da poter osservare correttamente le variazioni del vettore dipolo del cuore. Un ECG completo "standard" comprende 12 differenti derivazioni, quest'ultime descriveranno lo stesso impulso nello stesso istante. Si applicheranno sul paziente 10 elettrodi: 4 periferici (su polsi e caviglie) e 6 precordiali. La registrazione bipolare utilizzerà solo una coppia di elettrodi esploranti, diversamente la registrazione unipolare impiegherà un solo elettrodo esplorante che registra la differenza di potenziale tra sé stesso ed un altro elettrodo a potenziale zero. Si definiscono così le derivazioni:

- Derivazioni bipolari degli arti: D_I , D_{II} , D_{III} ;
- Derivazioni unipolari degli arti: aVR , aVL , aVF ;
- Derivazioni precordiali: V_1 , V_2 , V_3 , V_4 , V_5 , V_6 ;

2.2.2 Derivazioni bipolari

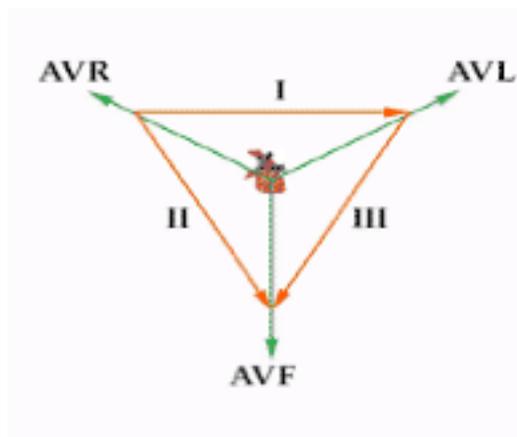


Fig. 5 Triangolo di Einthoven

Le due coppie di elettrodi usata nelle derivazioni bipolari sono poste, rispettivamente, la prima sul polso destro e polso sinistro e la seconda su caviglia destra e caviglia sinistra. Gli elettrodi, così disposti, formeranno un triangolo equilatero noto come il triangolo di Einthoven (Fig. 5). Il centro di questo triangolo è il cuore mentre i suoi vertici vengono definiti come RA (Right Arm), LA (Left Arm) e LL (Left Leg). Le linee congiungenti RA con LA, RA con LL e LA con LL identificano tre direzioni rappresentabili rispettivamente con tre versori a_I , a_{II} , a_{III} che costituiscono un triangolo equilatero [2]. È possibile individuare le derivazioni D_I , D_{II} e D_{III} attraverso proiezioni del vettore H sulle tre direzioni a_I , a_{II} e a_{III} secondo la seguente relazione (3):

$$D_i = H \cdot a_i \quad \text{con } i = I, II, III \quad (3)$$

Il vettore cardiaco H è analizzato su un piano frontale di 360° , è quindi necessaria una ripartizione del piano in tre sezioni da 120° ciascuna. Ciononostante, tutti gli eventuali cambiamenti del vettore non potranno essere registrati se non con la determinazione di altre derivazioni. È stato necessario, dunque, introdurre le derivazioni “aumentate” di Goldberger.

2.2.3 Derivazioni unipolari aumentate di Goldberger

Le derivazioni unipolari aumentate di Goldberger sono tre: aV_R , aV_L e aV_F (Fig. 6). Queste esplorano il piano frontale lungo le bisettrici degli angoli del triangolo di Einthoven e derivano dagli stessi elettrodi di D_I , D_{II} , D_{III} , ma usano il terminale centrale di Goldberger come polo negativo. Infatti, congiungendo gli estremi di ogni derivazione con due resistenze tra loro uguali e utilizzando la giunzione tra di esse come riferimento, rispetto all'elettrodo situato sul vertice opposto del triangolo, si ottiene la registrazione lungo altre tre direttrici, corrispondenti alle bisettrici del triangolo stesso [2]. In questo modo, considerando la giunzione delle due resistenze come l'elettrodo di riferimento e gli elettrodi su spalla sinistra-destra-gamba sinistra come elettrodi esploranti, si ottengono le tre derivazioni unipolari degli arti. Esse sono denominate (4): aV_R tra punto centrale spalla sinistra-gamba e spalla destra, aV_L tra punto centrale spalla destra-gamba e spalla sinistra e aV_F fra punto centrale delle spalle e la gamba sinistra.

$$\begin{aligned}
 aV_R &= -\frac{1}{2}(D_I + D_{II}) \\
 aV_L &= -\frac{1}{2}(D_I - D_{III}) \\
 aV_F &= -\frac{1}{2}(D_{II} + D_{III}) \quad (4)
 \end{aligned}$$

In tal modo, si è arrivati a definire l'attività cardiaca con 6 derivazioni che rendono possibile suddividere il piano frontale in sei sezioni da 60° ciascuna, così provvedendo ad una visione abbastanza accurata dell'attività elettrica cardiaca ma non sufficiente.

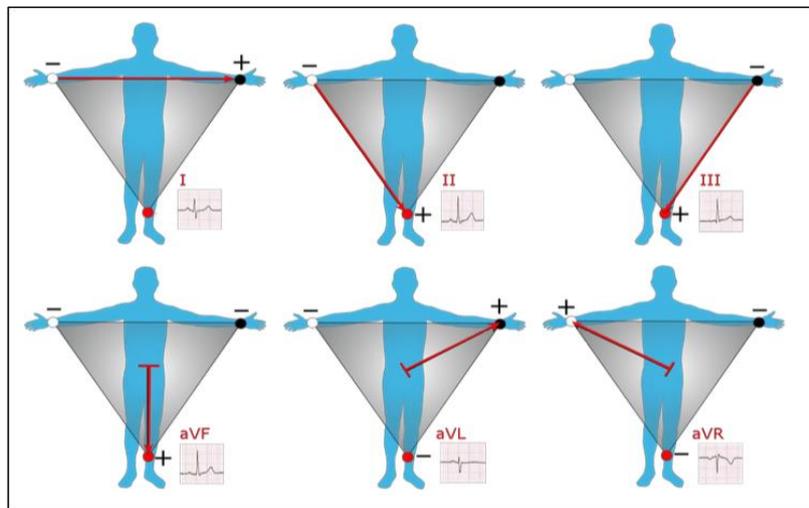


Fig. 6 Derivazioni bipolari e unipolari aumentate

2.2.4 Derivazioni unipolari precordiali di Wilson

Per concludere e per avere una maggior definizione dell'attività cardiaca è necessario avere degli elettrodi che siano abbastanza vicini al cuore, al contrario di quelli delle derivazioni uni e bipolari che si trovano lontane. G. A. Wilson introdusse come riferimento un centro elettrico W, denominato Terminale Centrale di Wilson. Quest'ultimo è usato come polo negativo che associato ad un elettrodo esplorante permette di valutare le differenze di potenziale in siti anatomici specifici. In particolare, questi nuovi elettrodi serviranno per identificare e localizzare, in maniera molto precisa, delle lesioni che potrebbero sfuggire con l'uso delle altre derivazioni, e per analizzare il vettore della depolarizzazione cardiaca sul piano trasversale, diverso da quello frontale precedentemente analizzato. Si usano allora sei elettrodi esploranti posti rispettivamente:

- V₁: nel VI spazio intercostale sulla linea parasternale destra;
- V₂: nel VI spazio intercostale sulla linea parasternale sinistra;
- V₃: tra V₂ e V₄;
- V₄: nel V spazio intercostale sulla linea emiclaveare sinistra, corrispondente alla punta cardiaca;
- V₅: nel V spazio intercostale sulla linea ascellare anteriore sinistra;
- V₆: nel V spazio intercostale sulla linea ascellare media sinistra.

Con le derivazioni unipolari di Wilson si ottengono le 12 derivazioni che consentono un'analisi completa ed esaustiva dell'attività elettrica del cuore. (Fig. 7)

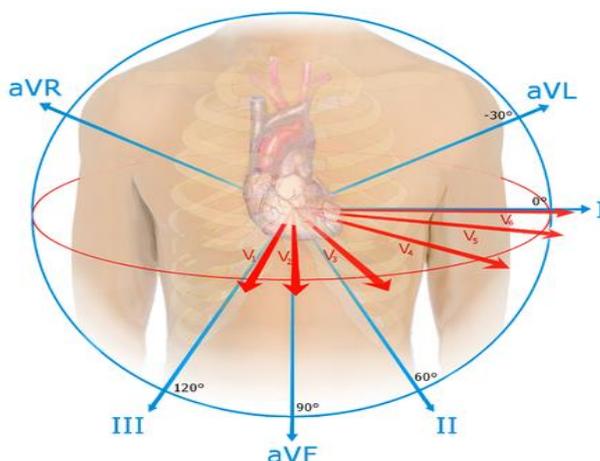


Fig. 7 Le derivazioni ECG su piano frontale e orizzontale

2.2.4 Derivazioni ortogonali di Frank

Ci si è posto il problema di passare dalle differenze di potenziali misurate dagli elettrodi alla proiezione del dipolo elettrico equivalente sui tre assi principali. Molti studiosi, tra cui E. Frank avanzarono la proposta per l'identificazione del vettore cardiaco attraverso 7 elettrodi. Questi ultimi, quindi, vengono posti 5 elettrodi sul torace, uno sulla caviglia sinistra e un altro per determinare un potenziale di riferimento. Grazie a una rete di correzione che tiene conto del mezzo di conduzione si possono ottenere le proiezioni del dipolo cardiaco sui tre assi ortogonali diretti come le tre direzioni principali: testa-piedi, torace-schiena, spalla destra-sinistra. Uno dei vantaggi dell'utilizzo delle derivazioni ortogonali consiste nel registrare tre diverse misurazioni, linearmente indipendenti, da cui è possibile ottenere proiezioni in ogni possibile direzione.

2.3 Il vettore cardiaco

L'attività elettrica cardiaca in ogni istante può essere rappresentata da un vettore. Nella diagnostica è importante valutare l'orientamento del vettore elettrico ventricolare, asse elettrico cardiaco, che dà un'indicazione sulla direzione media di attivazione dei ventricoli e sul potenziale medio generato dai ventricoli. Applicando la concezione di Einthoven e analizzando, nelle derivazioni agli arti, l'ampiezza del complesso QRS, che è espressione della proiezione del vettore sull'asse di derivazione, si può risalire al vettore risultante, che esprime la depolarizzazione ventricolare. L'orientamento dell'asse elettrico cardiaco si valuta costruendo il vettore risultante su un sistema di coordinate polari ottenute partendo dall'inclinazione degli assi di derivazione agli arti. Si ricorda che:

- Gli assi di derivazione delle bipolari D_I , D_{II} e D_{III} , sono i lati del triangolo di Einthoven o le loro parallele, passanti per il centro. Così: D_I 0° , D_{II} 60° e D_{III} 120° .
- Gli assi di derivazione delle unipolari aV_R , aV_L e aV_F sono le bisettrici degli angoli del triangolo di Einthoven. Così: aV_R 30° , aV_L 150° e aV_F 90° .

Il vettore risultante avrà come modulo la somma di ciascun momento di dipolo elettrico generato tra cellule miocardiche e ambiente extracellulare, direzione data dalla direzione di propagazione della corrente elettrica e verso dato dalla differenza di potenziale. In condizioni normali, l'asse elettrico cardiaco è compreso tra -30° e 90° - 110° , media 60° . Deviazioni a sinistra o a destra rispetto al normale possono indicare alterazioni della propagazione dell'eccitamento.

2.4 Vettorcardiogramma

Il vettorcardiogramma (VCG) è un metodo per registrare la grandezza e la direzione delle forze elettriche generate dal cuore per mezzo di una serie continua di vettori che formano linee curve attorno a un punto centrale. Data la tridimensionalità del corpo umano, l'idea di base fu di costruire tre derivazioni cardinali che contenessero tutte le informazioni elettriche. Le tre derivazioni sono rappresentate dall'asse destra- sinistra (X), dall'asse testa-piedi (Y) e dall'asse antero-posteriore (Z). Per ogni istante della propagazione dell'impulso attraverso il cuore, il vettore dipolo varia direzione, verso e modulo. Esso può aumentare o diminuire la sua lunghezza in funzione dell'aumento o diminuzione del suo stesso voltaggio e cambiare la direzione in base alla variazione della direzione media del potenziale elettrico cardiaco. Nel VCG in Fig. 8 si assume il punto 5 come punto di riferimento 0, che rappresenterà l'estremità negativa di tutti i vettori successivi. Quando il cuore è completamente polarizzato, l'estremità positiva del vettore rimane al punto 0 poiché il potenziale elettrico vettoriale è nullo. All'inizio della depolarizzazione ventricolare, quando la corrente inizia a fluire nei i ventricoli, l'estremità positiva del vettore si sposta dal punto di riferimento 0 descrivendo delle anse. Durante la depolarizzazione, il vettore si propaga verso il basso, orientato verso l'apice dei ventricoli, realizzando la prima porzione dell'ansa del vettorcardiogramma ventricolare. Il vettore diventa più grande all'aumentare della massa ventricolare depolarizzata: il vettore 2 rappresenta lo stato di depolarizzazione dei ventricoli e il vettore 3 descrive il potenziale elettrico cardiaco. A questo punto, i ventricoli sono completamente depolarizzati e il vettore torna nuovamente a potenziale 0 [3].

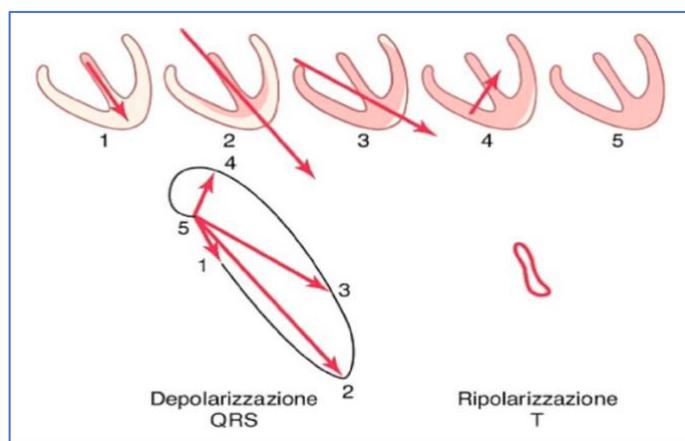


Fig. 8 Vettorcardiogrammi QRS e T

CAPITOLO TRE: Bloccaggio dei canali ionici

Recentemente, numerosi farmaci sono stati revocati per motivi di sicurezza legati alla loro interazione con il canale del potassio denominato hERG, che provoca l'allungamento dell'intervallo QT, importante fattore di rischio per lo sviluppo di aritmie cardiache potenzialmente fatali. Tra questi si pone l'attenzione su alcuni farmaci antiaritmici come Dofetilide, Ranolazina, Chinidina e Verapamil. Nello specifico, i farmaci antiaritmici sono in grado di sopprimere o prevenire le aritmie agendo sul flusso dei canali ionici o modulando il tono del sistema nervoso autonomo. Essi sono suddivisi in base ai loro effetti sull'elettrofisiologia del cuore. Lo schema d'uso più frequente fu proposto originalmente da Vaughan-Williams (Fig. 9) e consisteva in una classificazione basata sugli effetti farmacologici di tipo antiaritmico e non in una classificazione farmacologica.

CLASSE	ESEMPIO	MECCANISMO
Ia	Chinidina Procainamide Disopiramide	Blocco canali Na ⁺ -vel max depol +PDA+PRE
Ib	Lidocaina Fenitoina Tocainide	Blocco canali Na ⁺ -vel max depol -PDA+PRE
Ic	Flecainide Propafenone	Blocco canali Na ⁺ -vel max depol
II	Propranololo Timololo	Blocco recettori β
III	Amiodarone	Antagonisti canali K ⁺ +PDA +PRE
IV	Verapamile	Blocco canali Ca ²⁺

PDA = Potenziale d'azione

PRE = Periodo refrattario effettivo

Fig. 9 Classificazione di Vaughan-Williams dei farmaci antiaritmici

3.1 Descrizione e classificazione dei farmaci antiaritmici

Questa sottile differenza è importante perché nella maggior parte dei casi i farmaci antiaritmici producono effetti tra loro differenti, e una classificazione puramente farmacologica può rivelarsi ingannevole. Inoltre, tipi diversi di tessuto cardiaco possono anche rispondere diversamente a un farmaco specifico.

Nell'ordine si può notare come la *Chinidina* rientri nella Classe Ia, riservata a farmaci che assicurano un grado di blocco maggiore nei tessuti che si depolarizzano frequentemente. Questa proprietà viene chiamata dipendenza dall'uso e permette a questi farmaci di bloccare le cellule che stanno scaricando con una frequenza anormalmente alta, senza interferire con il normale battito del cuore a frequenza bassa. Farmaci con attività IA, oltre a produrre un aumento misurabile della refrattarietà ventricolare, causano un allungamento dell'intervallo QT.

In particolare, la Chinidina è una potente sostanza antiaritmica, usata per il mantenimento del ritmo sinusale in pazienti con flutter o fibrillazione atriale e per la prevenzione di recidive di tachicardia e fibrillazione ventricolare. La chinidina, in concentrazioni intorno ad 1 µg/ml, va ad ostacolare la componente rapida dei canali del potassio. Se in concentrazioni più elevate, blocca anche la componente lenta e la corrente di Ca²⁺.

Il *Dofetilide* rientra nella Classe III. I farmaci appartenenti a questa classe agiscono bloccando i canali del K⁺, riducendo l'ampiezza delle correnti ripolarizzanti durante la fase 2 e producono un prolungamento della durata del potenziale d'azione (vedi Fig. 3.5). L'aumento di quest'ultimo porta ad un aumento della refrattarietà, un effetto efficace nel trattamento delle aritmie da rientro. Nonostante il prolungato plateau riduca i fenomeni da rientro, può predisporre a EADs. Gli agenti di classe III hanno la caratteristica di prolungare l'intervallo QT dell'ECG e possono essere a loro volta pro-aritmici. Precisando, il Dofetilide prolunga il periodo refrattario e la durata del potenziale d'azione, senza presentare né un effetto beta-bloccante, né calcioantagonista. Il farmaco trova indicazione nel trattamento della fibrillazione e del flutter atriale, ma risulta più efficace nel convertire a ritmo sinusale il flutter atriale che non la fibrillazione. L'unico effetto elettrofisiologico della Dofetilide sembra essere il blocco della componente rapida della corrente ritardata correttiva del potassio (I_{Kr}), importante per la ripolarizzazione. L'effetto sull'I_{Kr} consiste nel prolungare la refrattarietà senza rallentare la conduzione, cosa che si ritiene essere

largamente responsabile del suo effetto antiaritmico. È anche responsabile dell'allungamento dell'intervallo QT sull'ECG.

Verapamil appartiene alla Classe IV, anche denominata calcio bloccante. Infatti, i farmaci di questa classe ritardano la fase di ascesa (fase 0) dei potenziali nel nodo SA e AV e prolungano la ripolarizzazione delle cellule nodali AV, nonostante risultino utili nel trattamento delle aritmie che implicano fenomeni da rientro attraverso il nodo AV, se somministrati in dosi eccessive possono condurre al blocco totale della conduzione. I *calcio bloccanti* provocano un'inibizione dell'afflusso di ioni Ca^{++} nella cellula, sia agendo sulla stabilizzazione di questi ioni di membrana, che bloccando il canale lento del Ca^{++} . *Verapamil*, bloccando l' $ICa-L$ in tutte le fibre cardiache, riduce l'altezza del plateau del potenziale d'azione, accorcia leggermente il potenziale d'azione muscolare e prolunga lievemente il potenziale d'azione totale delle fibre di Purkinje, sebbene non agisca significativamente sull'ampiezza dell'AP.

In ultimo, il farmaco *Ranolazina* ha dimostrato di inibire una serie di canali ionici nel miocardio, nello specifico opera circa il 26% del blocco del canale hERG potassio e circa il 21% del bloccaggio delle correnti di sodio. Il prolungamento del tratto QT è di circa 13 ms, ma è associato ad un basso rischio di torsione di punta.

3.1.1 Aritmie e disturbi dell'attività cardiaca

Le aritmie sono anomalie del ritmo cardiaco che si manifestano occasionalmente o continuativamente. In cardiologia sono divise in due gruppi. Nel primo gruppo rientra la maggior parte delle aritmie che si verificano negli atri, situati sopra ai ventricoli, sono chiamate aritmie sopra ventricolari e di solito non sono immediatamente pericolose. Il secondo gruppo è quello delle aritmie che originano nei ventricoli, aritmie ventricolari. Se non trattate queste possono spesso condurre a situazioni di emergenza, arresto cardiaco e infine morte cardiaca improvvisa. All'insorgere delle aritmie possiamo distinguere i due meccanismi responsabili.

Il primo è dato da un'automaticità normale causata da una parziale depolarizzazione della membrana, può avvenire ovunque e generare un "focus" ectopico, sostenuta da un aumento della ICa^{2+} .

Il secondo è definito da un'attività trigger, ovvero da anormali oscillazioni del potenziale di membrana che dipendono dal precedente potenziale d'azione. Ne esistono due tipi:

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

3.2 Sindrome del QT Lungo

Precedentemente, si è analizzato come i vari canali ionici vadano a caratterizzare ed influenzare la morfologia del tracciato ECG. In particolare, si deve analizzare come il blocco dei canali ionici hERG del potassio possano causare il prolungamento dell'intervallo QT che è una sintomatologia sfociante in torsioni di punta ed aritmie ventricolari. La sindrome del QT Lungo (LQTS) però è una patologia ereditaria provocata da geni mutati che sono in grado di alterare il normale funzionamento dei canali ionici. Sono stati identificati sette tipi di LQTS ereditaria di cui i tipi più comuni sono tre. La LQTS di tipo uno e due è interessata da un flusso di ioni potassio anormale attraverso i canali ionici e in condizioni di esercizio o di forte emozione può accadere che il cuore inizi a battere in maniera incontrollata e non riesca più a soddisfare una gittata di sangue sufficiente per il corretto funzionamento sistemico. La LQTS di tipo tre invece è causata da un flusso anomalo degli ioni sodio e si manifesta in particolare con episodi di fibrillazione ventricolare. In ultimo, verso la fine degli anni '90 fu notato come l'assunzione di determinati tipi di farmaci (antiaritmici, antidepressivi e antipsicotici) andassero ad influenzare la durata dell'intervallo QT, prolungandolo. Bisogna sottolineare che il prolungamento della fase di ripolarizzazione rende possibile l'insorgenza di un potenziale d'azione precoce che, se sostenuto dall'attivazione dei canali del calcio tempo dipendenti, può dar luogo ad aritmie come la torsione di punta e che possono evolvere in fibrillazione ventricolare e SCD.

Analizzare l'intervallo QT significa caratterizzare i punti fiduciali che lo definiscono: il QRS-on-set, cioè l'inizio del cosiddetto complesso QRS associato alla depolarizzazione dei ventricoli e l'onda T. Come descritto in precedenza il blocco della corrente di sodio aumenta la durata del complesso QRS rallentando la conduzione ventricolare. Sebbene sia Chinidina un bloccante del canale del sodio, alle concentrazioni osservate in questo studio, si pensa che ostruisca la corrente del sodio soltanto in minima parte. Questo farmaco tende solo verso il prolungamento di QRS, ma non risulta correlazione tra i livelli plasmatici di Chinidina e l'aumento del QRS. Ranolazina, pur essendo bloccante del canale del sodio, è stato associato soltanto ad un leggero prolungamento di QRS e non vi è alcuna dipendenza fra i livelli di farmaco nel plasma e QRS. Infine, Dofetilide e Verapamil non presentano azione di bloccaggio di questo canale.

3.3 Effetti dei farmaci sulla morfologia dell'onda T

Gli studi clinici, richiesti dalla FDA, hanno osservato che il bloccaggio del canale hERG in presenza di una certa concentrazione di Dofetilide causa la planarità, asimmetria e dentellatura dell'onda T, con una diminuzione della grandezza massima del vettore T. Si è inoltre osservato che i farmaci con azione di bloccaggio dei canali hERG in grado di bloccare anche le correnti verso l'interno possono causare un minore rischio di torsione, oppure perché in grado di diminuire la dispersione di ripolarizzazione o perché in grado di impedire after-depolarizations precoci. Inoltre, è stato provato che Chinidina e Ranolazina causano cambiamenti di morfologia dell'onda T, malgrado il blocco della corrente verso l'interno. Ciò ha portato a chiedere come i cambiamenti di morfologia dell'onda T siano associati al rischio di torsione di punta farmacologicamente indotta. Sebbene Chinidina, Ranolazina e Verapamil siano dei bloccanti multicanale, solo alla Chinidina è associata a un rischio torsione significativo. Ciò è dovuto al notevole bloccaggio dell'hERG provocato da Chinidina (circa del 71%) rispetto al blocco del calcio e del sodio (circa 8% e 3%, rispettivamente). Si è osservato, inoltre, che a concentrazioni inferiori, Chinidina è un bloccante hERG parzialmente puro, e difatti gli eventi di torsione di punta con Chinidina sono stati osservati per lo più a concentrazioni più basse. Rispetto alla precedente, al farmaco Ranolazina è stato associato ad un minore blocco del canale hERG (circa 26%) e ad un blocco della corrente del sodio più ritardato (circa 21%); mentre Verapamil è stato associato con il blocco di hERG (circa 7%) e il blocco di calcio (circa 17%). Infine, non è stato registrato alcun aumento dell'intervallo QT o cambiamento della morfologia dell'onda T

associata a Verapamil. Questo indica che Verapamil riesca quasi perfettamente a bilanciare il blocco delle correnti di calcio verso l'interno e quelle del potassio verso l'esterno. È plausibile che la presenza del blocco delle correnti di Cl^- o di Na^+ possa frenare l'insorgere di torsione di punta e, quindi, determinare un equilibrio tra il blocco delle correnti entranti ed uscenti.

Altri risultati di questa ricerca suggeriscono che lo spostamento dell'onda T a sinistra sia l'effetto più forte del blocco di calcio e di sodio. Quindi quest'ultimi sarebbero causa di una minore durata del segmento ST, con un effetto minore sulla morfologia delle onde T. Riassumendo, nonostante le onde piatte, asimmetriche e dentellate sembrano essere indici del blocco del canale hERG, questi indicatori di morfologia dell'onda T probabilmente non sempre sono correlati con il rischio di torsione di punta, come anche è stato osservato per l'intervallo QT [5].

In aggiunta, si dimostra l'esistenza di una stretta relazione fra il blocco del canale del potassio hERG e i cambiamenti di morfologia dell'onda T. In particolare, si è osservato che Ranolazina presenta una stretta dipendenza tra la dose di farmaco e la morfologia dell'onda T, ed è stato notato un maggiore cambiamento della morfologia delle onde T a quantità equivalenti del prolungamento del QT in presenza di Dofetilide.

Inoltre, lo studio clinico svolto sostiene che i biomarkers relativi alla morfologia dell'onda T probabilmente hanno valore nel determinare se il prolungamento di QT sia dovuto ad un'azione di bloccaggio dell'hERG [5].

CAPITOLO QUATTRO: Modello matematico per la stima del bloccaggio dei canali potassio.

4.1 Materiali e Metodi

4.1.1 Database

La ricerca sperimentale ha usufruito dei dati estratti dal database, registrato su PhysioNet, titolato “ECG Effects of Ranolazine, Dofetilide, Verapamil and Quinidine in Healthy Subjects” [4]. Ventidue soggetti sani, di età compresa tra i 18 e i 35 anni senza patologie cardiovascolari pregresse, sono stati sottoposti ad uno studio clinico per raccogliere e comparare i dati sui parametri elettrofisiologici e clinici. Al mattino di ogni periodo, ai soggetti a digiuno veniva somministrata una singola dose di 500 μg di Dofetilide, 400 mg di Chinidina, 1500 mg di Ranolazina e 120 mg di Verapamil. Il segnale ECG è stato registrato, durante ogni periodo, continuo a 500 Hz e con una risoluzione di ampiezza di 2.5 μV . Contemporaneamente alla registrazione dell’ECG sono stati prelevati campioni di sangue per l’analisi farmacocinetica e la misura della concentrazione plasmatica del farmaco. Da quest’ultimo poi sono state ricavate sia le concentrazioni del farmaco presente, sia estrapolati i segnali ECG in momenti specifici, al momento del predosaggio e a 15 istanti di tempo predefiniti post dose [0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 14 e 24 h]. Per ognuno dei 16 istanti sono stati estratti 3 ECG della durata di 10 secondi, quindi sono stati considerati 1056 segnali elettrocardiografici per tutti e ventidue i pazienti. I dati prelevati dal database sono i valori sperimentali associati a tutti i 3960 VCG medio ricavato da 10s del tracciato elettrocardiografico. Nell’immagine seguente (Fig. 10) è possibile vedere la concentrazione dei quattro farmaci, nei loro rispettivi cicli, per i 15 istanti successivi alla somministrazione del farmaco in tutti i 22 soggetti.

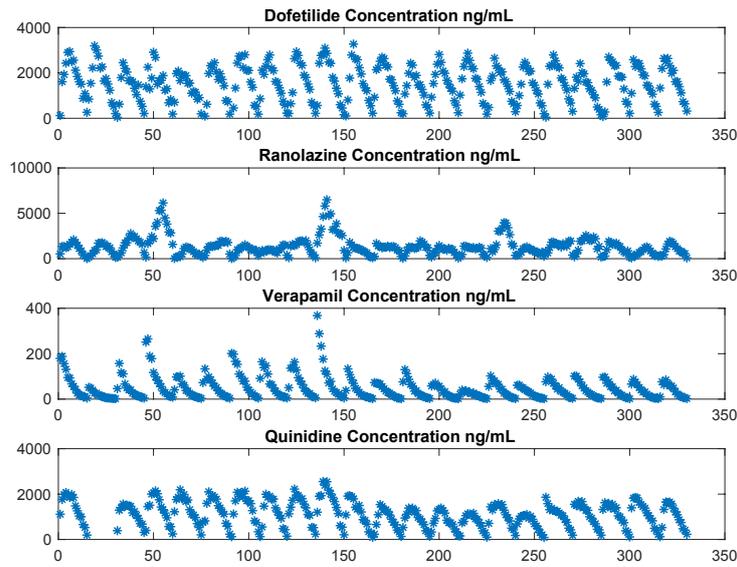


Fig. 10 Concentrazione dei farmaci per tutti i soggetti

4.1.2 Estrazione delle features di ripolarizzazione elettrocardiografica

Partendo da ciascun vettorcardiogramma medio, sono stati ricavati due indici di ripolarizzazione, l'ERD_{30%} caratteristico della ripolarizzazione precoce e $T_{S/A}$ caratteristico della ripolarizzazione tardiva.

Nello specifico, l'ERD_{30%} (s) rappresenta il 30% della durata della ripolarizzazione precoce. Questo parametro è già presente per ogni farmaco e per ogni soggetto.

Si definisce, invece, $T_{S/A}$ (s^{-1}) come (7):

$$T_{S/A} = \frac{T_{slope}}{T_{amplitude}} \quad (7)$$

Dove, $T_{amplitude}$ è un valore presente nel database mentre T_{slope} è calcolato da (8):

$$T_{slope} = \frac{T_{amplitude}}{T_{PEAK} T_{END}} \quad (8)$$

T_{slope} , dunque, rappresenta la pendenza dell'onda T e risulta essere pari al rapporto tra l'ampiezza dell'onda T e l'intervallo di tempo compreso tra il picco dell'onda T e la sua fine.

Da ogni concentrazione plasmatica dei farmaci, abbiamo calcolato il blocco $B_{REF}(\%)$ hERG stimato con l'equazione di Hill:

$$B_{REF}(\%) = 100 \cdot \frac{D^n}{IC_{50}^n + D^n} \quad (9)$$

dove $B_{REF}(\%)$ è la percentuale di blocco alla concentrazione del farmaco D, IC_{50} è la concentrazione del farmaco che causa il blocco del 50%, e n è il coefficiente di Hill. I valori IC_{50} e n per ogni farmaco sono stati ottenuti dai dati contenuti in [7] e corrispondono a 1 nM e 0.6, 6490 nM e 0.8, 499 nM e 1.1 e 343 nM e 1.0, rispettivamente per la Dofetilide, Ranolazina; Verapamil e Chinidina.

Nella determinazione del modello è stato considerato il $B_{REF}(\%)$ della concentrazione plasmatica dei quattro farmaci non considerando, qualora fossero presenti, punti con concentrazioni plasmatiche non disponibili.

4.1.3 Analisi Statistica

Per la determinazione dei coefficienti di regressione a , b , c , e d , il bloccaggio dei canali hERG del potassio è stato modellato sulla base dell'equazione di regressione (10):

$$B_{REF}(\%) = a \cdot ERD_{30} + b \cdot T_{S/A} + c \cdot ERD_{30} \cdot T_{S/A} + d \quad (10)$$

Tenendo in considerazione gli effetti dell'interazione delle due variabili, $ERD_{30\%}$ e $T_{S/A}$, e il $B_{REF}(\%)$, è stato computato il coefficiente di determinazione R^2 . Il database è stato partizionato casualmente in due dataset: il 50%, corrispondente a 660 coppie di $T_{S/A}$ ed $ERD_{30\%}$, è stato utilizzato per la costruzione del modello; la restante parte è stata utilizzata come testing dataset. La correlazione tra $B_{ECG}(\%)$ e $B_{REF}(\%)$ nel training e testing è stata effettuata mediante il calcolo del coefficiente di correlazione di Pearson (r). Addizionalmente, sono state calcolate la pendenza e intercetta della linea di regressione, insieme ai loro corrispondenti intervalli di confidenza del 95% (CI). È stato usato il test di Lilliefors per comprendere qualora la distribuzione di valori

ottenuta fosse normale o meno. Mentre le distribuzioni normali sono state espresse in termini di media \pm deviazione standard, le distribuzioni non normali sono riportati come mediana [25° percentile; 75° percentile].

4.2 Risultati

Le distribuzioni della Concentrazione, Blocco(%), ERD_{30%}, T_{S/A} dei quattro farmaci per i 22 soggetti nelle 24h successive alla somministrazione ciclica dei farmaci sono descritte nella figura 11. Complessivamente, B_{REF}(%) varia da 0.4% to 76.9% (36.4%[19.1%;53.5%]).

Simili distribuzioni sono state osservate sia nel training dataset, dove B_{REF}(%) variava da 0.4% a 76.9% (39.3%[20.9%;55.0%]), che nel testing dataset, dove B_{REF}(%) variava da 0.4% a 75.5% (34.3%[17.3%;49.2%]).

La proporzione di varianza spiegata dai due predittori nel training dataset era pari al 57% ($R^2=0.57$).

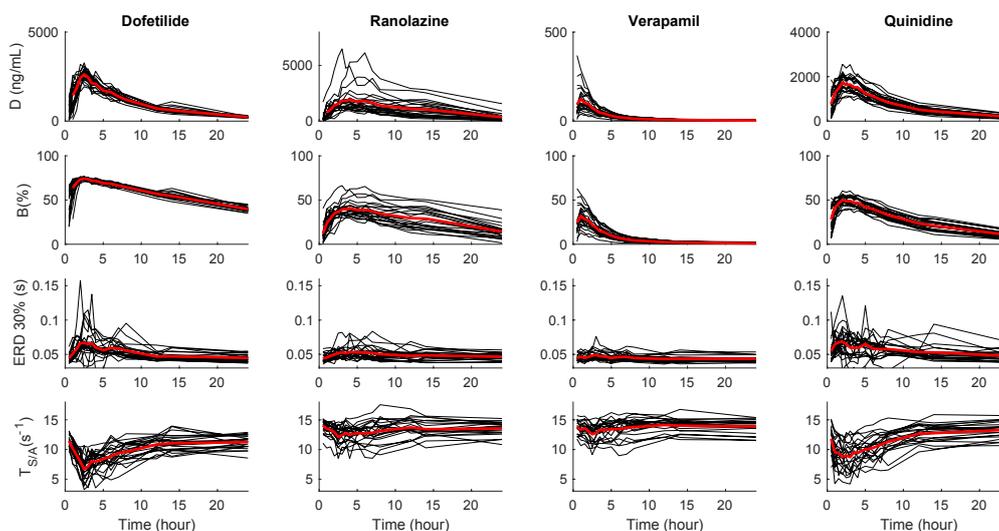


Fig. 11 Concentrazione, Blocco(%), ERD_{30%}, T_{S/A} dei quattro farmaci per i 22 soggetti nelle 24h

Dall'analisi statistica sono stati ricavati i tre coefficienti a , b , c e l'intercetta d , con i seguenti valori: $a = -561.0 s^{-1}$, $b = -9.7 s$, $c = 77.2$ e $d = 138.9$.

Si otterrà l'equazione:

$$\bar{B}_{ECG}(\%) = -561.0 \cdot ERD_{30} - 9.7 \cdot T_{S/A} + 77.2 \cdot ERD_{30} \cdot T_{S/A} + 138.9 \quad (11)$$

Tra il $B_{ECG}(\%)$ ed il $B_{REF}(\%)$ è stata trovata una significativa correlazione lineare, sia nel training dataset ($r=0.75$, $p<10^{-119}$) che nel testing dataset ($r=0.67$, $p<10^{-81}$), entrambe mostrate in Fig. 12. La retta di regressione, per il training dataset, ha pendenza ed intercetta pari ad 1.0 (CI: $0.9\div 1.1$) and 0.0 (CI: $-2.8\div 2.8$), mentre nel testing dataset a pendenza ed intercetta pari a 0.9 (CI: $0.8\div 1.0$) and -6.1 (CI: $-9.9\div -2.2$). Il diagramma di Bland Altman, osservato in entrambi i dataset, ha mostrato una sostanziale equivalenza tra $B_{ECG}(\%)$ and $B_{REF}(\%)$, con meno del 5% dei valori. (Fig. 13).

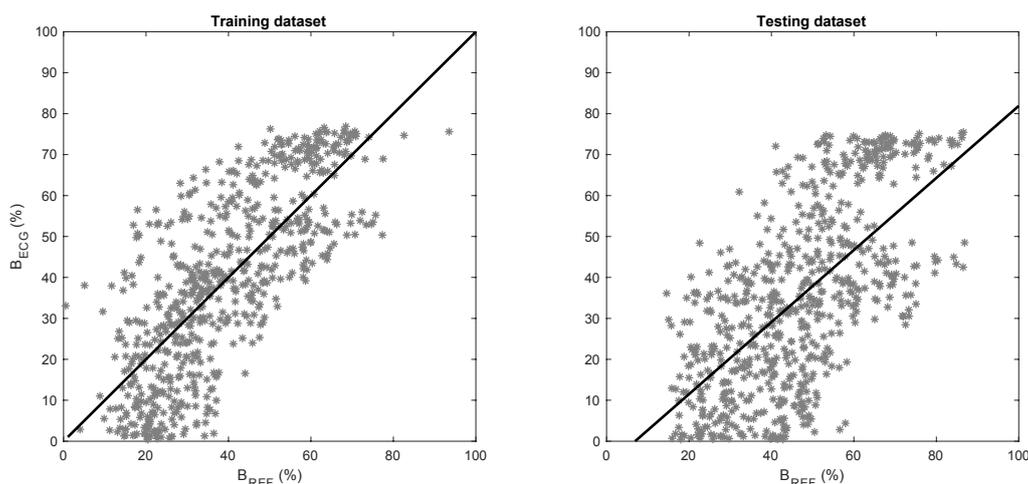


Fig. 12 Correlazione $B_{REF}(\%)$ - $B_{ECG}(\%)$ nel training e nel testing

Infine, l'errore stimato tra $B_{ECG}(\%)$ and $B_{REF}(\%)$ è di $11.5\pm 16.7\%$.

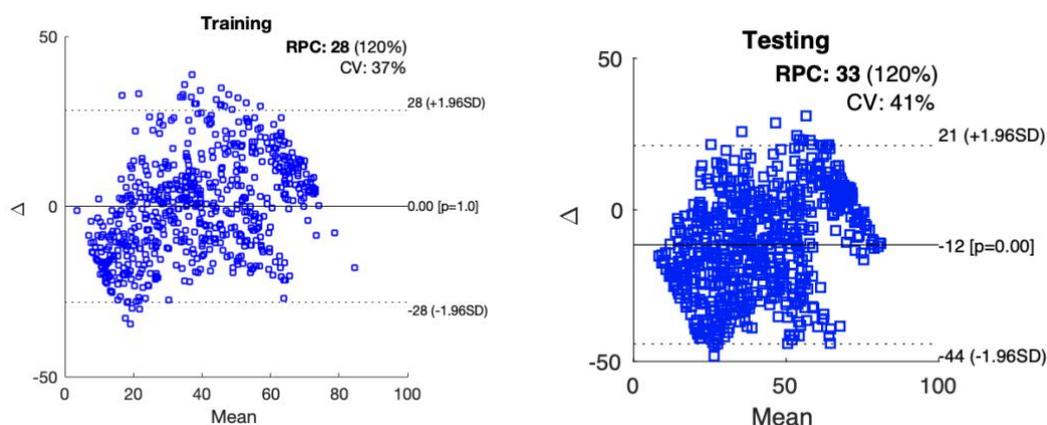


Fig. 13 Bland-Altman plot per training e testing.

Si è pensato di osservare, quindi, il comportamento degli errori se si è in una situazione di alto bloccaggio, medio bloccaggio o basso bloccaggio. A bassi bloccaggi, ovvero per un $B_{ECG}(\%)$ inferiore al 25% si ha un errore di $-23 \pm 12.0\%$. In condizione di bloccaggio medio, compreso tra 25-50%, l'errore è $-11.05 \pm 14.8\%$. Infine, ad alte percentuali di bloccaggio, superiori al 50% l'errore è pari a $5.3 \pm 9.4\%$. In Fig. 14 è possibile vedere la dispersione dell'errore nei tre intervalli.

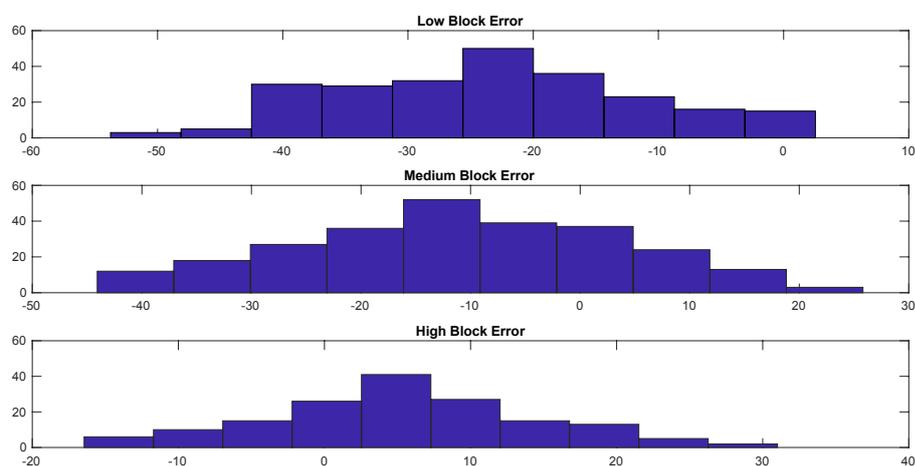


Fig. 14 Dispersione errore a basso, medio ed alto bloccaggio

In conclusione, si può affermare che $B_{ECG}(\%)$ è un indice affidabile per quel che riguarda una stima non invasiva del bloccaggio farmaco-indotto del canali hERG del potassio, indipendente dal bloccaggio degli altri canali ionici concomitante.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Nella presente tesi si è analizzato come alcune features della ripolarizzazione elettrocardiografica possano contribuire alla stima del bloccaggio dei canali hERG del potassio farmacologicamente indotto. È fondamentale ribadire come la preservazione delle concentrazioni ioniche fisiologiche a cavallo della membrana plasmatica possano garantire uno sviluppo corretto del potenziale d'azione e quindi un normale svolgimento dell'attività elettrica cardiaca. L'insorgere di patologie cardiache dovuto ad uno squilibrio ionico può risultare fatale. Facendo riferimento a vari studi presenti in letteratura, è stato riscontrato come una variazione significativa delle concentrazioni ioniche a cavallo della membrana plasmatica nel sangue danno luogo a potenziali d'azioni con anomalie e, di conseguenza, a forme diverse del tracciato elettrocardiografico. In particolar modo, si è prestato attenzione alla fase di ripolarizzazione elettrocardiografica dove le correnti ioniche del potassio hanno maggiore incidenza. A partire da uno studio svolto su ventidue soggetti sani a cui sono stati somministrati i farmaci antiaritmici Dofetilide, Ranolazina, Chinidina e Verapamil, sono state analizzate e ricavate le features di ripolarizzazione quali $ERD_{30\%}$ e $T_{S/A}$ che oltre ad essere grandezze caratteristiche della ripolarizzazione cardiaca, risultano essere strettamente legate alla variazione di concentrazione del potassio. Oltre a queste grandezze, è stata ricavata la percentuale di bloccaggio dei canali hERG del potassio $B_{REF}(\%)$ a partire dalla concentrazione plasmatica dei quattro farmaci nel sangue. Valore che servirà non solo alla costruzione di un modello predittivo lineare ma anche come riferimento per la valutazione dello stesso. Come è stato anticipato, lo scopo di questa tesi è quello di ottenere un indice non solo affidabile ma anche non invasivo per la stima del bloccaggio dei canali ionici del potassio. A tal fine, è stata svolta un'analisi statistica quale la regressione lineare utilizzando delle grandezze caratteristiche $ERD_{30\%}$ e $T_{S/A}$. Il bloccaggio dei canali hERG del potassio è stato modellato sulla base dell'equazione di regressione. L'analisi ha portato alla stima dei quattro coefficienti $a = -561.0 s^{-1}$, $b = -9.7 s$, $c = 77.2$ e $d = 138.9$. In funzione di questi, si è andata a testare l'equazione di regressione. Il $B_{ECG}(\%)$ ottenuto attraverso quest'ultima è stato confrontato con il $B_{REF}(\%)$ ed il coefficiente di correlazione tra i due è di $0.67(p < 10^{-81})$. L'errore stimato è di $11.5 \pm 16.7\%$. si è osservato, inoltre, come in condizione di alto bloccaggio l'errore si riduca notevolmente, lasciando riflettere su come questo sia dovuto soprattutto a farmaci che operano un bloccaggio sostanziale dei canali ionici del potassio come la Dofetilide, mentre il contributo dei restanti farmaci sia più variabile e meno uniforme visto la loro azione di bloccaggio degli

altri canali ionici. La farmacocinetica dei farmaci, tuttavia, non implica che questo modello non sia affidabile. Il $B_{ECG}(\%)$ risulta un ottimo indice per una stima non invasiva del bloccaggio dei canali hERG del potassio.

BIBLIOGRAFIA

[1] G. Ambrosi, P. Castano, R. F. Donato, et al., Anatomia dell'uomo, Edi-ermes, 2008

[2] F. P. Branca, Fondamenti di Ingegneria Clinica - Volume I, Springer Verlag, 2000.

[3] J. E. Hall, et al., Guyton e Hall - Fisiologia medica, Edra, 2016.

[4] L. Johannesen *et al.*, Differentiating drug-induced multichannel block on the electrocardiogram: Randomized study of dofetilide, quinidine, ranolazine, and verapamil. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*. **96**, 549–558 (2014).

[5] J. Vicente *et al.*, Comprehensive T wave morphology assessment in a randomized clinical study of dofetilide, quinidine, ranolazine, and verapamil. *Journal of the American Heart Association*. **4** (2015), doi:10.1161/JAHA.114.001615.

[6] D. M. Roden, D. Roden, D. M. Roden, The Journal of Physiology Predicting drug-induced QT prolongation and torsades de pointes A brief history: first associations between long QT and torsades de pointes. *The Authors. The Journal of Physiology C*. **594**, 2459–2468 (2016).

[7] W. J. Crumb, J. Vicente, L. Johannesen, D. G. Strauss, An evaluation of 30 clinical drugs against the comprehensive in vitro proarrhythmia assay (CiPA) proposed ion channel panel. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. **81**, 251–262 (2016).

RINGRAZIAMENTI

Questo è il momento in cui vorrei scrivere: “Ringrazio me stessa, senza di me non ce l’avrei mai fatta!”. Ma ringrazierò prima qualcun altro.

Al termine di questo percorso vorrei ringraziare tutte le persone che mi sono state accanto, ad un metro di distanza e no. Mi sarebbe piaciuto scrivere un discorso sentito e commovente ma sfortunatamente è al di fuori delle mie competenze.

Ringrazio la mia relattrice, la Professoressa Laura Burattini, che in un caldo 17 Luglio mi ha concesso l’opportunità di partecipare a questo studio.

Sono estremamente grata alla Professoressa Micaela Morettini, alla sua pazienza e disponibilità. La ringrazio per avermi capita anche nei momenti di difficoltà.

Un ringraziamento va alla Professoressa Agnese Sbröllini, senza la quale sarei rimasta alla terza riga del ciclo for.

Adesso ringrazio mia mamma, principio di ogni cosa, esempio di resilienza e del duro lavoro. Scusami se sono un po’ pigra. Grazie anche al mio papà che quando gli chiedono cosa studio non sa rispondere, però conosce la risposta di ogni rumore diverso dei motori.

A Giulia, che ha iniziato questo percorso con me e mi è stata accanto fino alla fine nonostante la distanza. Sei stata fondamentale.

Alle mie amiche di sempre che non hanno mai saputo quando dovevo sostenere gli esami perché ero scaramantica, eppure mi hanno quasi sempre sgamato. Grazie anche a Bimbo, ultimo arrivato del gruppo che mentre scrivo queste righe è in braccio a me.

Mi piacerebbe ringraziare ogni persona ha condiviso questo percorso con me e poi ha preso una strada diversa, porterò con me ogni ricordo di quel periodo.

Vorrei elencare ogni singolo nome ma se vi riconoscete tra le persone che hanno contribuito alla mia crescita personale, ad essere la persona che sono oggi, sappiate che un grazie è riservato anche a voi.

