



**POLITECNICO**  
MILANO 1863

**Tesi:**

**Valutazione degli effetti delle forme d'onda di  
defibrillazione su cardiomiociti: generazione di  
attività spontanea**

Relatore: Prof. **Sergio Cerutti**  
Correlatore: Prof. **José Wilson Magalhães Bassani**

Autore:  
ANITA GAIA MAZZOCCO 820443

**Anno Accademico 2015-2016**



# Indice

Sommario.....	4
Summary.....	7
<b>1. Introduzione.....</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Fisiologia del cuore.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.1 Il tessuto muscolare cardiaco.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1.2 L'attività elettrica cardiaca: il potenziale d'azione.....</b>	<b>14</b>
<b>1.1.3 L'accoppiamento eccitazione-contrazione: ruolo del calcio.....</b>	<b>18</b>
<b>2. Stato dell'arte.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Stimolazione elettrica di cardiomiociti isolati.....</b>	<b>24</b>
<b>3. Materiali e metodi.....</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Isolamento miociti ventricolari.....</b>	<b>31</b>
<b>3.2 Camera di perfusione.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3 Requisiti necessari per la scelta del miocita.....</b>	<b>33</b>
<b>3.4 Protocollo sperimentale di stimolazione elettrica.....</b>	<b>35</b>
<b>3.5 Analisi dell'attività spontanea.....</b>	<b>39</b>
<b>3.6 Analisi statistica.....</b>	<b>44</b>
<b>4. Risultati.....</b>	<b>45</b>
<b>4.1 Curve dose-risposta.....</b>	<b>46</b>
<b>5. Discussione.....</b>	<b>49</b>
<b>6. Conclusioni e sviluppi futuri.....</b>	<b>54</b>
<b>7. Bibliografia.....</b>	<b>56</b>

## Sommario

Numerose patologie cardiovascolari comportano gravi disturbi all'attività elettrica cardiaca che generano alterazioni del ritmo cardiaco fisiologico: aritmie. Le aritmie cardiache non consentono al cuore di svolgere correttamente la propria funzione di pompa del sistema cardiovascolare, e nei casi più gravi conducono alla fibrillazione ventricolare e quindi alla morte improvvisa del paziente affetto.

Attualmente l'unico trattamento efficace e considerato salva-vita è l'utilizzo di defibrillatori, i quali, tramite due elettrodi posti sul torace del paziente, applicano uno stimolo elettrico ad alta intensità al miocardio, che consente di terminare la fibrillazione e riportare la contrazione cardiaca al ritmo fisiologico.

Tuttavia, l'alta intensità di corrente che attraversa il muscolo miocardico, può produrre effetti deleteri, che conducono ad un insuccesso della terapia e alla ricomparsa di aritmie patologiche.

Questo studio si concentra sulla valutazione degli effetti che derivano dall'applicazione di un campo elettrico ad alta intensità su singole cellule cardiache, tramite due forme d'onda di stimolazione: bifasica simmetrica rettangolare e bifasica simmetrica esponenziale troncata. L'obiettivo ultimo è sviluppare delle tecniche di stimolazione che consentano la somministrazione di una terapia elettrica che sia sicura ed efficace in ugual misura.

Nel corso degli anni, tramite numerose valutazioni sperimentali è stato compreso che per ridurre l'intensità dello stimolo elettrico e quindi ridurre l'entità di una possibile lesione al cuore, era necessario utilizzare forme d'onda di stimolazione alternative rispetto a quella monofasica tradizionale. Si è passato dunque a progettare defibrillatori che erogassero shock elettrici con forma d'onda bifasica rettangolare, ed infine bifasica esponenziale troncata, che è la forma d'onda attualmente utilizzata.

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare gli effetti di shock elettrici con intensità crescente rispetto l'intensità di stimolo soglia, con il quale la cellula è in grado di contrarsi, utilizzando due forme d'onda differenti: lo stimolo bifasico rettangolare e lo stimolo bifasico esponenziale troncato.

Pertanto è stato effettuato un protocollo di stimolazione elettrica su miociti ventricolari

isolati di ratto adulto, con intensità di shock crescenti da 3 a 21 volte l'intensità di stimolo soglia, con le due forme d'onda descritte, in esperimenti temporalmente separati.

A seguito dell'applicazione di singoli shock ad alta intensità (fino 60 V), le cellule cardiache mostravano sviluppare delle attività spontanee, quali contrazioni e onde contrattili ("wave"), in assenza di qualsiasi campo elettrico; le quali sono imputabili a un'alterazione dell'equilibrio elettrofisiologico della cellula stimolata, considerato il precursore delle aritmie post-shock.

L'aritmogenesi post-shock è un indice di insuccesso della terapia defibrillatoria, nonché un effetto negativo generato dall'applicazione di shock ad alta intensità.

Per la conta delle attività spontanee, tutte le cellule sono state filmate durante l'intero protocollo di stimolazione, prima e dopo l'applicazione del singolo shock elettrico, ed è stato sviluppato un software di edge detection F-Shortening, che consente di riconoscere e monitorare il movimento del bordo della cellula nei video ottenuti, in modo tale da poter individuare le contrazioni in termine di accorciamenti della cellula. Per ogni video il software genera un file che riporta il grafico degli accorciamenti della cellula nel tempo, nel quale sono distinguibili i picchi indicativi di ciascuna attività contrattile spontanea.

Sono stati quindi contati gli eventi di attività spontanea, successivi all'applicazione del singolo shock, in un intervallo di tempo di 45 secondi, in modo tale da determinare la frequenza media di attività spontanea generata in seguito allo stimolo ad alta intensità.

In conclusione, per ogni cellula studiata si ottengono i dati relativi alla variazione di frequenza media di attività spontanea in funzione dell'intensità crescente di stimolazione.

L'obiettivo è di stabilire per la prima volta una relazione di tipo dose-risposta, considerando la defibrillazione come una somministrazione di una dose di elettricità, e la generazione di attività spontanea come la risposta negativa, indotta dalla somministrazione dello shock elettrico.

Le curve dose-risposta vengono utilizzate per confrontare l'efficacia della stimolazione con forma d'onda bifasica esponenziale troncata rispetto la stimolazione bifasica rettangolare; le curve sono state costruite tramite il software GraphPad Prism.

Il risultato principale dell'analisi statistica è che, qualitativamente, la forma d'onda bifasica

esponenziale troncata è meno dannosa per le cellule, inducendo un numero inferiore di attività spontanee post-shock, rispetto alla forma d'onda rettangolare alla stessa intensità di campo elettrico. Sebbene la curva dose-risposta della stimolazione esponenziale troncata presenti uno spostamento verso destra e un abbassamento rispetto la curva di stimolazione rettangolare, indice di stimolazione meno lesiva e più efficace; non è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa tra le due curve dose-risposta, probabilmente a causa del numero ridotto di cellule studiate (8 cellule per ogni tipo di forma d'onda). Inoltre, a conferma del risultato, nel caso della stimolazione esponenziale troncata nessuna cellula è giunta a morte a seguito di attività spontanee con frequenza elevata, mentre 6 cellule su 8 sono morte con shock bifasici rettangolari.

Da quanto trovato in letteratura, la minor lesività della forma d'onda esponenziale troncata è interpretabile come una minore generazione di elettroporazione.

L'applicazione di un campo elettrico ad alta intensità crea, a livello della membrana cellulare, una distribuzione spaziale di potenziale elettrico che depolarizza la regione della membrana che si trova in prossimità del catodo, e iperpolarizza la regione della membrana in prossimità dell'anodo. Pertanto dove avviene la depolarizzazione si genera il potenziale d'azione, che ristabilisce il ritmo cardiaco normale. Mentre la regione della membrana che presenta iperpolarizzazione risulta essere a rischio maggiore di elettroporazione. L'elettroporazione è difatti l'effetto deleterio che deriva dall'applicazione di shock ad alta intensità, a causa dei quali il potenziale di membrana giunge a superare la soglia di elettroporazione; pertanto la nascita di pori sulla membrana cellulare altera l'equilibrio ionico della cellula che governa l'attività elettrica e contrattile d'essa, causando principalmente un ingresso eccessivo di calcio, il quale attiva la contrazione muscolare spontanea, fino a causare la morte della cellula stessa.

L'attività spontanea si genera difatti a causa di un'alterazione elettrofisiologica, che è inoltre alla base dell'aritmogenesi. Per questo motivo l'aspetto rilevante di questo lavoro, inoltre, è quello di mostrare la possibilità di studiare e confrontare condizioni differenti di stimolazione, tramite un metodo in grado di determinare una relazione tra intensità di stimolazione elettrica e generazione di attività spontanea, indicativa dell'entità di lesività della tecnica valutata.

## Summary

Many cardiovascular diseases involve electrical dysfunctions that cause disturbances in the heart rhythm: arrhythmias. Cardiac arrhythmias do not allow the heart to beat properly, impairing the cardiac pumping function. Ventricular fibrillation is the most serious cardiac rhythm disturbance; the heart begins to contract in a rapid, unsynchronized way, and thus can't pump any blood, causing cardiac arrest.

Nowadays, the most effective procedure to reestablish normal contraction rhythms is the application of an electric shock to the heart by means of two electrodes placed on the patient's chest.

Electric stimulation such as defibrillation is still clinically used to revert arrhythmias; nevertheless, this therapeutic approach may often cause shock-induced deleterious effects, due to the high intensity current that flow through myocardial muscle. So it may lead to a failure of the therapy and the reappearance of pathological arrhythmias.

The aim of this study is evaluate the effects of two stimulation waveforms: symmetrical biphasic rectangular pulse and symmetrical biphasic truncated exponential pulse.

The ultimate goal is to develop stimulation techniques that allow an electric therapy that is safe and effective equally.

Numerous experimental evaluations have shown that to reduce the intensity of the electrical stimulus and thus reduce the probability of a possible injury to the heart, it was necessary to use waveforms of alternative stimulation compared to the traditional monophasic pulse, so that biphasic rectangular and exponential truncated pulse, which is currently used.

The purpose of this study was to evaluate the effects of electric shock with increasing intensity from stimulation threshold, using these two different waveforms.

Therefore it has been carried out an electrical stimulation protocol on adult rat ventricular myocytes, with increasing intensity of shocks from 3 to 21 times the threshold stimulus intensity, with the two waveforms described, in temporally separate experiments.

Following the application of individual shock high intensity (up to 60 V), the cardiac cells showed develop spontaneous activity, such contractions and waves, in the absence of any electric field; which is attributable to an alteration of cellular electrophysiology, considered

the forerunner of post-shock arrhythmias. The post-shock arrhythmogenesis is a failure index of defibrillation therapy.

All cells were filmed during the entire stimulation protocol, before and after the application of a single electric shock, and has been developed an edge detection software F-shortening, which allows to recognize and monitor the movement of the cell edge, so as to be able to identify the contractions in term of cell shortenings.

The software generates a file that contains the graph of the shortening of the cell over time, where each peak corresponds to a spontaneous contractile activity.

Spontaneous activity events were counted in a 45 second time interval, to determine the average frequency of spontaneous activity following the high intensity stimulus.

In conclusion, for each cell studied, were obtained the data relating to the variation of average frequency of spontaneous activity in increasing intensity stimulation.

The objective is to establish for the first time a dose-response relationship, whereas the defibrillation as a administration of a dose of electricity, and the generation of spontaneous activity as the negative response, induced by electric shocks administration.

The dose response curves are used to compare the effectiveness of biphasic truncated exponential stimulation and rectangular biphasic stimulation; the curves were constructed using the GraphPad Prism software.

The main result of the statistical analysis is that, qualitatively, the biphasic truncated exponential waveform is less detrimental to the cells, inducing a lower number of spontaneous activity post-shock, compared to the rectangular waveform at the same electric field intensity. Although the exponential truncated dose-response curve is more shifted to the right and lower than the rectangular curve, index of less detrimental and more effective stimulation; was no statistically significant difference between the two dose-response curves, probably due to the low number of cells studied (8 cells for each type of waveform). In addition, to confirm this, In addition, in confirmation of the result, in the case of the truncated exponential waveform no cell has died, as a result of high frequency spontaneous activity, while 6 of 8 cells have died with rectangular biphasic shocks.

From the literature, the less injurious effect of truncated exponential waveform is justified by a lower generation of electroporation.

The high intensity electric field creates on cell membrane an potential spatial distribution that depolarizes the membrane region which is located in the vicinity of the cathode, and hyperpolarized the membrane region in the vicinity of the anode. Therefore where depolarization occurs generating the action potential, which restores the heart's normal rhythm, the hyperpolarized membrane region is where electroporation begins to occur.

Electroporation is the deleterious effect that arises from the application of high-intensity shock, because of which the membrane potential reaches the electroporation threshold; therefore the pores creation on the cell membrane alters the ionic balance which governs the cell electrical and contractile activity, causing mainly calcium excessive input, which activates the spontaneous muscle contraction, up to cause the cell death.

Spontaneous activity is indeed generating by an altered electrophysiology, which also causes arrhythmogenesis.

For this reason, the significant aspect of this work, moreover, is to show the possibility to study and compare different stimulation conditions, using a method capable of determining a relationship between electrical stimulation intensity and generation of spontaneous activity, as defibrillation detrimental effect.

# 1. Introduzione

Il cuore è l'organo centrale del nostro corpo che provvede alla distribuzione del sangue con le sostanze essenziali a tutti gli organi dell'organismo, consentendone il funzionamento. Il cuore è infatti una pompa muscolare che si contrae ritmicamente per inviare il sangue, contenente l'ossigeno e le sostanze nutritive, in tutto l'organismo [1].

Per mantenere una corretta circolazione sanguigna, il cuore deve essere in grado di realizzare una contrazione sincrona a un ritmo fisiologico di 70 battiti al minuto. Pertanto una perdita di sincronia nel processo di contrazione e rilassamento che da luogo a sistole e diastole rispettivamente, compromette la funzione del cuore.

Differenti patologie cardiache portano a disturbi nella conduzione dello stimolo elettrico responsabile del ritmo cardiaco [2]. Ad esempio, l'infarto del miocardio o l'ipertrofia ventricolare creano blocchi di conduzione elettrica che provocano una perdita di sincronia e quindi di coordinazione necessaria alla contrazione cardiaca [3,4]. Un'alterata attivazione elettrica del miocardio infatti conduce ad un accorciamento della durata della contrazione, ovvero una diminuzione di durata della sistole, che porta allo scompenso cardiaco. Il cuore non riesce a pompare sangue sufficiente per rispondere al fabbisogno energetico di tutto l'organismo, fino ad arrivare all'arresto cardiaco [5].

Le alterazioni del ritmo cardiaco normale dovute a condizioni patologiche del miocardio sono definite aritmie cardiache [6]. L'aritmia si riferisce a qualsiasi cambiamento nella normale sequenza degli impulsi elettrici, che porta il cuore a battere in maniera erronea: più lentamente (bradicardia: frequenza cardiaca minore di 60 battiti al minuto) o più velocemente (tachicardia: frequenza cardiaca maggiore di 100 battiti al minuto) [7].

La fibrillazione ventricolare è considerata la patologia più seria di disturbo al ritmo cardiaco. Il ventricolo comincia a fibrillare (tremare) non essendo più in grado di pompare sangue al circolo fino a giungere al collasso della camera ventricolare, all'arresto cardiaco e alla morte improvvisa del paziente affetto.

Oltre 100 anni fa, è stato scoperto che l'applicazione di uno shock elettrico ad alta intensità al tessuto miocardico era in grado di terminare la fibrillazione ventricolare [8].

Ancora oggi l'unico trattamento efficace clinicamente usato per fermare la fibrillazione ventricolare o rianimare un paziente in arresto cardiaco è infatti l'utilizzo della tecnica di defibrillazione.

La defibrillazione è un processo in cui dispositivi elettrici applicano uno shock elettrico al cuore. Questa tecnica terapeutica consente di ristabilire il corretto ritmo cardiaco in cuori che stavano soffrendo aritmie gravi, come la fibrillazione, o che non presentano alcuna attività elettrica, come in condizione di arresto cardiaco [7,9].

I dispositivi che sfruttano questo principio possono essere impiantabili o esterni. I device impiantabili sono il defibrillatore cardiaco impiantabile e il pacemaker, i quali vengono utilizzati da pazienti ad alto rischio di arresto cardiaco, come ad esempio pazienti che hanno già sofferto ischemia o infarto miocardico o che presentano difetti al pacemaker naturale (il nodo senoatriale).

I defibrillatori esterni invece fanno parte dell'equipaggiamento di emergenza delle strutture ospedaliere e svolgono la loro funzione scaricando uno shock ad alta intensità tramite elettrodi transtoracico, ovvero posti sul torace.

L'European Society of Cardiology (ESC) ha riportato nel 2015 una statistica di 50 mila morti l'anno in Italia per arresto cardiaco dovuto a fibrillazione ventricolare; per questo motivo si raccomanda l'installazione di queste apparecchiature in tutti quei locali pubblici che accolgono un numero elevato di persone [10].

Sebbene l'imponente utilizzo di questa terapia considerata salva-vita, non è ancora completamente compreso il meccanismo, grazie al quale uno shock elettrico ad alta intensità giunga a bloccare una fibrillazione e riportare il ritmo cardiaco a un valore fisiologico. Il concetto base della stimolazione elettrica defibrillatoria è che lo shock applicato deve essere in grado sia di fermare temporaneamente l'attività elettrica cardiaca disordinata e riavviarla secondo il ritmo fisiologico (nel caso di fibrillazione), sia di eccitare la gran maggioranza di tessuto miocardico (nel caso di arresto cardiaco) [9].

Per quanto la defibrillazione sia l'unico metodo efficace, l'alta intensità di corrente che attraversa il muscolo miocardico, oltre ad essere dolorosa, può condurre a danni del tessuto miocardico e alla rigenerazione di aritmie e quindi a un insuccesso della terapia. Infatti, non sempre questa tecnica riesce nel suo obiettivo di ristabilire completamente il ritmo cardiaco.

L'aritmogenesi a seguito di defibrillazione cardiaca risulta essere una complicazione considerevole in quanto può condurre alla rigenerazione di fibrillazione. Alla base dell'origine di aritmie post-defibrillazione si trova un problema di tipo elettrofisiologico

legato ai meccanismi ionici che regolano l'eccitazione e la contrazione del muscolo cardiaco [11].

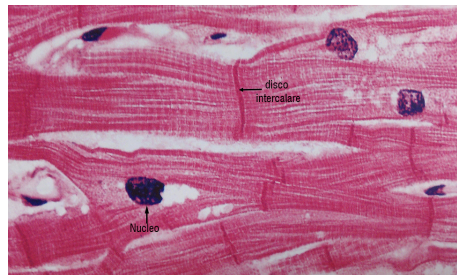
È stato dimostrato che l'applicazione di uno shock ad alta intensità può provocare elettroporazione delle membrane cellulari, la quale è potenzialmente la causa di disturbi elettrofisiologici che portano alla nascita di aritmie [12,13]. L'elettroporazione causa difatti lesioni alla membrana cellulare con nascita di pori che non presentano permeabilità ionica specifica. A causa di queste aperture presenti sulla membrana cellulare, la cellula va incontro a perdita di materiale intracellulare e a scambi ionici non fisiologici, che alterano l'equilibrio elettrofisiologico del miocita [14]. A seguito dell'applicazione dello shock e quindi della nascita di elettroporazione della membrana cellulare, si registra inoltre un aumento della concentrazione interna di calcio, il quale è il protagonista del meccanismo di accoppiamento eccitazione-contrazione alla base dell'innescò della contrazione muscolare cardiaca [15].

Questi effetti, originati dall'elettroporazione, conducono all'attivazione di potenziali d'azione precoci e irregolari ed allo sviluppo di attività contrattili spontanee che contraggono le cellule miocardiche in modo disordinato, risultando quindi generare aritmie.

## 1.1 La fisiologia del cuore

In questo capitolo viene brevemente presentata la fisiologia del cuore, in modo tale da comprendere i meccanismi elettrici, che si originano in risposta a uno stimolo elettrico esterno, e che generano la contrazione muscolare cardiaca.

### 1.1.1 Il tessuto muscolare cardiaco



**Figura 1** *Tessuto muscolare cardiaco: sezione longitudinale.* [16]

Il tessuto muscolare cardiaco come il muscolo scheletrico striato è organizzato in fibre muscolari, ognuna delle quali è una singola cellula cardiaca, chiamata miocita cardiaco (Fig. 1).

A differenza del muscolo scheletrico, in cui le fibre si trovano organizzate in fasci, nel cuore le fibre sono interconnesse; le cellule cardiache si ramificano per collegarsi alle cellule adiacenti in modo da formare una rete complessa, chiamata anche sincizio. Inoltre le cellule cardiache sono connesse tra loro tramite i dischi intercalanti, nei quali è presente una struttura chiamata giunzione comunicante che permette il passaggio di ioni e rappresenta la connessione elettrica tra cellule contigue.

Questa struttura sinciziale e la presenza dei dischi intercalanti consentono la rapida propagazione del potenziale d'azione.

L'aspetto peculiare del comportamento meccanico del cuore è la sua dipendenza dal volume di fine diastole; ovvero maggiore è il volume di fine diastole o maggiore è l'allungamento delle fibre cardiache, maggiore sarà il volume di sangue eiettato o maggiore sarà la forza contrattile originata. Questo fenomeno è noto come legge di

Starling.

Ogni cardiomiocita è delimitato da una membrana cellulare chiamata sarcolemma. Le fibre muscolari sono formate a loro volta da miofibrille, che rappresentano la componente contrattile. Le miofibrille sono costituite da elementi connessi in serie chiamati sarcomeri, contenenti filamenti di miosina e actina, protagonisti del meccanismo di contrazione muscolare.

Le miofibrille sono completamente rivestite dal reticolo sarcoplasmatico, il quale svolge un ruolo importante nel meccanismo di innesco della contrazione, in quanto contiene elevate quantità di ioni calcio e presenta una membrana ricca di pompe ioniche con alta affinità al calcio. Un altro ruolo importante è rivestito dai tubuli T, che sono delle invaginazioni della membrana cellulare verso l'interno della fibra. Questi tubuli permettono all'onda di depolarizzazione, che investe la membrana cellulare con l'arrivo del potenziale d'azione, di giungere fino al cuore delle miofibrille, in prossimità del reticolo sarcoplasmatico, e consentono l'innesco del meccanismo di eccitazione-contrazione grazie alla presenza di canali del calcio voltaggio-dipendenti.

### **1.1.2 L'attività elettrica cardiaca: il potenziale d'azione**

Il cuore per svolgere correttamente la sua funzione di pompa di sangue possiede un rigoroso sistema di autoregolazione del ritmo cardiaco.

Il tessuto muscolare cardiaco è caratterizzato da due differenti tipologie di fibre; le fibre contrattili e le fibre di conduzione. Le fibre contrattili esprimono la capacità contrattile e pertanto traducono il segnale elettrico in contrazione meccanica; mentre le fibre di conduzione costituiscono il cosiddetto sistema di conduzione che consente la sistematica propagazione del segnale elettrico, responsabile del ritmo cardiaco.

Le fibre cardiache di conduzione elettrica sono caratterizzate dalla capacità di essere in grado di contrarsi autonomamente, anche senza un impulso elettrico esterno, e ciò deriva da alcune peculiarità che contraddistinguono l'attività elettrica cardiaca [17].

Il tessuto cardiaco è infatti formato prevalentemente da cellule muscolari contrattili, che traducono il segnale elettrico in contrazione meccanica, e in percentuale minore da cellule

muscolari di conduzione altamente specializzate chiamate cellule pacemaker, le quali generano intrinsecamente l'impulso elettrico.

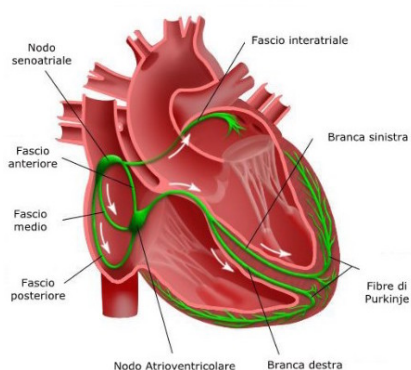
Le cellule contrattili cardiache sono collegate in stretta continuità in modo tale da formare una fitta maglia, chiamata sincizio. Questa struttura permette un rapido trasferimento dell'impulso elettrico da una cellula all'altra tramite le giunzioni comunicanti; in questo modo una grande popolazione di cellule è in grado di contrarsi contemporaneamente.

Questo aspetto è fondamentale in quanto la contrazione coordinata è indispensabile per consentire al cuore di pompare sangue in maniera efficiente.

Pertanto il sistema di conduzione elettrica permette di coordinare la contrazione cardiaca e quindi consente al cuore di battere.

Come in precedenza affermato, le cellule candidate a generare l'impulso elettrico che origina il battito cardiaco sono le cellule pacemaker. Pur essendo cellule autoritmiche, tuttavia il sistema nervoso autonomo svolge una funzione regolatrice se necessario, modulando ad esempio la frequenza e la forza di contrazione del muscolo cardiaco.

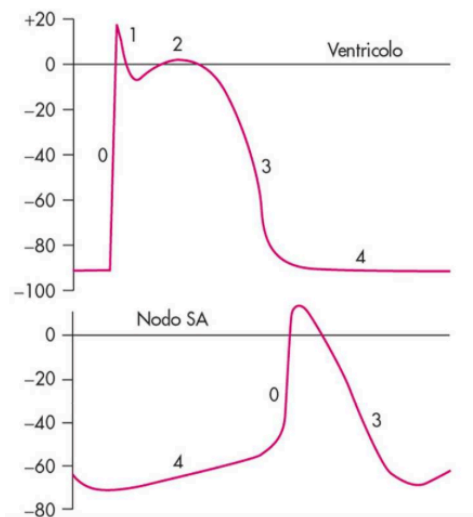
Le cellule pacemaker originano il potenziale d'azione che andrà a propagarsi attraverso l'intero miocardio e sono concentrate a livello nel nodo senoatriale e nel nodo ventricolare, considerati i due pacemaker naturali del cuore, che consentono rispettivamente la contrazione atriale e ventricolare.



**Figura 2** *Sistema di conduzione cardiaco.* [18]

L'attività elettrica delle cellule cardiache si origina quindi nel nodo senoatriale, situato nell'atrio destro alla base della vena cava superiore (Fig. 2). Dal nodo il potenziale si propaga con una velocità di circa 1 m/s nelle fibre muscolari investendo tutto il tessuto

atriale, provocando la contrazione atriale. Il passaggio dell'impulso elettrico da atrio destro a atrio sinistro avviene attraverso il fascio di Bachmann (o fascio interatriale). L'attività elettrica passa quindi al tessuto ventricolare tramite il nodo atrioventricolare. A livello del nodo atrioventricolare il segnale elettrico subisce un breve ritardo, il che permette di separare temporalmente la contrazione atriale da quella ventricolare, dando tempo ai ventricoli di riempirsi di sangue, prima della sistole. A livello ventricolare il sistema di conduzione comincia con il fascio di His e le sue due branche (branca destra e branca sinistra, in figura 2) per poi ramificarsi nei ventricoli formando le fibre del Purkinje. Questo sistema di fibre a conduzione veloce, circa 2 m/s, anche chiamato sistema His-Purkinje consente una contrazione sincrona delle fibre dell'intero ventricolo [19].



**Figura 3** Potenziali d'azione delle fibre contrattili dei ventricoli (in alto) e del nodo senoatriale (in basso). [20]

Il potenziale d'azione delle fibre contrattili presenta una forma d'onda differente dal potenziale d'azione del tessuto di conduzione nodale delle cellule pacemaker (Fig. 3).

Le variazioni del potenziale di membrana sono dovute a movimenti di ioni, correnti ioniche, dallo spazio intracellulare allo spazio extracellulare, o viceversa, che contribuiscono a modificare il potenziale cellulare. La quantità di ione che diffonde attraverso una membrana dipende dalla permeabilità della membrana a quello ione, dalla sua differenza di concentrazione e dalla differenza di potenziale elettrico.

Il potenziale d'azione delle fibre contrattili è caratterizzato da 5 fasi distinte. Inizia con una rapida depolarizzazione (fase 0) principalmente legata all'ingresso di ioni  $\text{Na}^+$  nella

cellula, a cui segue una breve ripolarizzazione (fase 1), dovuta all'apertura dei canali del potassio che genera un flusso uscente di ioni  $K^+$ . Il valore di potenziale soglia che consente l'attivazione del potenziale d'azione è di circa  $-65$  mV; la fase di depolarizzazione innalza il potenziale di membrana fino a  $+20$  mV. La fase 2 di plateau del potenziale d'azione deriva soprattutto dal flusso di cariche positive entranti di calcio e in parte minore di  $Na^+$ . In questa fase il calcio veste un ruolo importante non solo perché consente di allungare la durata del potenziale d'azione, ma soprattutto perché svolge la funzione di trigger per l'attivazione del processo di contrazione [19]. Al termine del plateau la fuoriuscita di ioni  $K^+$  risulta essere imponente rispetto la corrente catodica entrante, generando una rapida ripolarizzazione (fase 3). Nella fase 4 il potenziale d'azione torna a riposo ad un valore di circa  $-90$  mV.

Il potenziale d'azione cardiaco delle cellule contrattili presenta delle peculiarità rispetto il potenziale d'azione delle fibre muscolari. Infatti il potenziale d'azione cardiaco presenta un plateau di durata maggiore (200-300 ms), che permette di allungare il periodo di refrattarietà assoluta, il quale coincide con l'inizio della depolarizzazione fino al termine della fase di ripolarizzazione. Questa caratteristica impedisce alle fibre cardiache di essere nuovamente eccitabili durante la contrazione cardiaca, rendendo impossibile una contrazione tetanica del miocardio. Inoltre la durata maggiore del potenziale d'azione permette al sincizio cardiaco di contrarsi simultaneamente, consentendo la contrazione sincrona dei ventricoli.

Le cellule pacemaker in quanto cellule autoeccitabili presentano una forma di potenziale d'azione differente. Il potenziale d'azione delle fibre nodali è caratterizzato da una durata minore, legato all'assenza di una fase di plateau, e una fase iniziale (fase 4) caratterizzata da una lenta depolarizzazione che consente a questo tipo di cellule di essere autoritmiche. L'aumento graduale del potenziale di membrana porta quest'ultimo a superare spontaneamente la soglia di sparo, consentendo alla cellula pacemaker di essere in grado di autoeccitarsi, generando un nuovo potenziale d'azione.

### 1.1.3 L'accoppiamento eccitazione-contrazione: ruolo del calcio

L'accoppiamento eccitazione-contrazione è il processo tramite il quale l'eccitazione elettrica del miocita si traduce nella contrazione cardiaca.

Il ruolo del calcio nei meccanismi di contrazione delle cellule muscolari è fondamentale, in quanto viene considerato come l'attivatore diretto dei miofilamenti che consentono la contrazione. Pertanto un malfunzionamento nei metodi di segnalazione cellulare del calcio risulta essere la causa principale che origina disfunzione contrattile e aritmia, in condizioni patologiche [21,22].

In altre parole l'accoppiamento eccitazione-contrazione è il processo tramite il quale la depolarizzazione della membrana del miocita, durante il potenziale d'azione, produce un aumento della concentrazione del calcio nel citosol della cellula cardiaca consentendo la contrazione cardiaca.

Come affermato in precedenza, l'unità contrattile di base del cuore è il sarcomero, che forma il sincizio cardiaco, cioè una maglia formata da sarcomeri in stretta continuità che permette di sincronizzare e accelerare la capacità contrattile miocardica. I sarcomeri sono collegati tra di loro tramite un sistema di tubuli T, ossia invaginazioni del sarcolemma che si estendono all'interno della cellula fino ad arrivare in prossimità del reticolo sarcoplasmatico (SR).

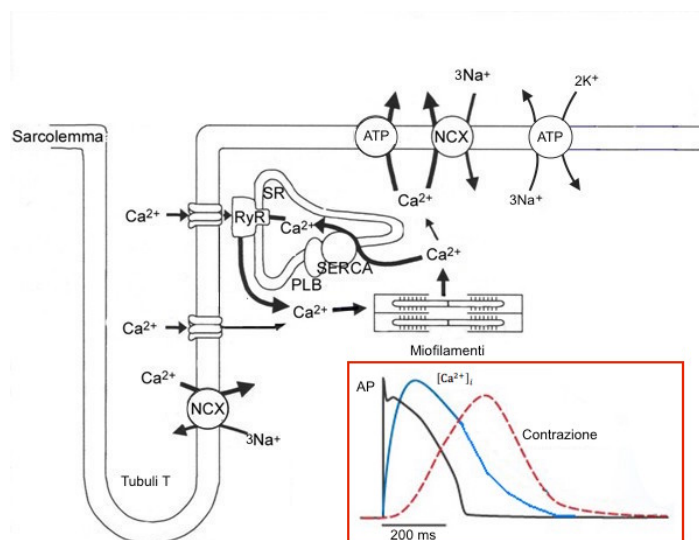


Figura 8 Accoppiamento eccitazione-contrazione. [21]

Il reticolo sarcoplasmatico svolge una funzione specifica nel meccanismo di contrazione in quanto riserva di calcio, che lo sequestra e lo rilascia secondo un meccanismo di regolazione complesso. Il reticolo sarcoplasmatico presenta una zona caratteristica ricca di canali del calcio detti anche canali-recettori rianodinici (RyR), la quale è rivolta verso i tubuli T, dove sono localizzati i canali del calcio voltaggio-dipendenti di tipo L [23]. Questo nanodominio formato dal reticolo sarcoplasmatico e i tubuli T è considerato il centro di controllo dell'accoppiamento eccitazione-contrazione ed è stimato che ogni miocita cardiaco presenti circa 20000 di questi nanodomini [24].

Il potenziale d'azione proveniente dalle cellule adiacenti invade la membrana delle cellule contrattili, provocando la depolarizzazione di queste.

Durante la fase iniziale di depolarizzazione, i canali voltaggio-dipendenti di calcio, presenti a livello dei tubuli T, si aprono consentendo l'entrata di calcio nella cellula cardiaca. Quindi la concentrazione interna di calcio aumenta e questo consente al calcio di legarsi ai canali-recettori rianodinici del reticolo sarcoplasmatico, permettendone l'apertura. Questo processo, tramite il quale l'entrata di calcio innesca il rilascio di calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico, viene definito come rilascio di calcio indotto dal calcio.

L'incremento di calcio citoplasmatico genera una cosiddetta scarica di calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico, che consente a quest'ultimo di legarsi alla troponina C del miofilamento cardiaco. Il complesso  $Ca^{2+}$ -troponina interagisce con la tropomiosina e sblocca i siti attivi tra i filamenti di actina e miosina. Questa interazione consente ai ponti trasversali di iniziare i loro cicli e di far contrarre le miofibrille [1].

Lo sviluppo di forza contrattile dipende dal contenuto interno di calcio (vedi fig. 4), pertanto alterando la quantità e la durata dell'incremento di calcio citosolico, o alterando la sensibilità dei miofilamenti al calcio, varia la forza di contrazione sviluppata [24].

Per consentire il rilassamento muscolare, la concentrazione di calcio interna deve diminuire in modo tale da permettere al calcio di dissociarsi dalla proteina troponina C.

Pertanto è necessario che il calcio, presente nel citoplasma, venga sia trasportato fuori dalla cellula e sia rissequestrato dal reticolo sarcoplasmatico.

I meccanismi di segnalazione cellulare alla base del rilassamento cardiaco sono ancora oggi non completamente compresi. Il meccanismo più largamente approvato è legato alla

pompa  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX), dove una parte di calcio viene espulsa in cambio di Na; mentre una pompa calcio-ATPasica pompa nuovamente il calcio all'interno del reticolo sarcoplasmatico dove viene immagazzinato per la contrazione successiva.

La quantità di calcio entrante attivata dalla depolarizzazione di membrana viene regolata tramite due principali effetti locali; l'inattivazione di flusso ionico entrante calcio-dipendente sul lato citosolico mediato dalla calmodulina [25], una delle proteine regolatrici dei canali rianodinici [26], e anche lo stesso rilascio di calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico contribuisce all'inattivazione della corrente entrante di calcio [27]. Questi meccanismi controllano finemente l'entrata di calcio.

Inoltre la quantità di calcio che entra durante l'accoppiamento eccitazione-contrazione deve essere uguale alla quantità di calcio uscente, in modo tale da mantenere l'equilibrio ionico del miocita.

Il rilascio di calcio da parte del reticolo sarcoplasmatico dipende inoltre dalla quantità di calcio contenuta nel reticolo sarcoplasmatico; ovvero, un alto carico di calcio sarcoplasmatico aumenta direttamente il flusso di calcio rilasciato dal reticolo, grazie all'effetto stimolatorio del calcio, contenuto nel reticolo, sui canali recettori rianodinici[28]. Quindi, in una condizione di basso contenuto di calcio sarcoplasmatico, la corrente di calcio entrante tramite i canali presenti sui tubuli T può non indurre rilascio di calcio; così come un'alta concentrazione di calcio nel reticolo sarcoplasmatico può provocare rilascio spontaneo di calcio in assenza di potenziale d'azione, ovvero aritmie cardiache.

I meccanismi di terminazione di rilascio di calcio e di fuoriuscita di calcio dal miocita sono fondamentali per consentire al cuore di riempirsi di sangue durante la fase diastolica. Per fare quindi in modo che la concentrazione citosolica di calcio torni alla condizione di riposo è necessario che i recettori canali rianodinici si chiudano e i livelli di calcio all'interno del reticolo sarcoplasmatico ritornino all'equilibrio, e inoltre che il calcio in eccesso presente nel citosol venga estruso dal miocita.

L'estrusione di calcio, come precedentemente affermato, avviene tramite principalmente la pompa sodio-calcio, la quale lavora seguendo una stechiometria di 3 ioni di  $\text{Na}^+$  per ogni ione di  $\text{Ca}^{2+}$  [29]. Durante la fase di ripolarizzazione del potenziale d'azione infatti un'alta concentrazione interna di calcio combinata a un potenziale di membrana negativo porta all'estrusione di calcio tramite la pompa  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ . In aggiunta anche la pompa calcio-

ATPasica presente a livello del sarcolemma contribuisce all'estrusione di calcio, ma in dose minore [30].

Il meccanismo di rilascio di calcio da parte dei canali rianodici, pur non essendo ancora completamente chiaro, sembra essere dovuto all'unione di diversi aspetti. La diminuzione di concentrazione sarcoplasmatica del calcio (meccanismo chiamato di "riduzione locale di calcio") promuove infatti la chiusura dei canali rianodici, la quale porta a sua volta alla chiusura di canali adiacenti (meccanismo di "attrito stocastico"), e inoltre sembra che questi recettori presentino siti di inattivazione calcio-dipendenti ("inattivazione") [31-34].

La struttura deputata invece all'accumulo di calcio nel reticolo sarcoplasmatico è la pompa SERCA, calcio-ATPasica, a cui è legato il fosfolambano (PLB) il quale inibisce l'attività di questa pompa mantenendola chiusa. La fosforilazione del fosfolambano, mediata dalla calmodulina, consente ad esso di distaccarsi dalla pompa SERCA, consentendo l'entrata di calcio nel reticolo sarcoplasmatico [35].

Anche a riposo, in caso di aumento locale di calcio citosolico o nel reticolo sarcoplasmatico, possono attivarsi i canali-recettori rianodinici, i quali, rilasciando ulteriore calcio, possono attivare canali rianodinici adiacenti, dando luogo a onde che possono propagarsi in tutta la lunghezza della cellula, generando queste onde contrattili [21].

## 2. Stato dell'arte

La stimolazione elettrica tramite shock ad alta intensità, utilizzata tuttora clinicamente tramite defibrillatori, è oggetto di studi sperimentali da molti anni per poter comprendere quali siano i meccanismi di risposta allo stimolo elettrico che avvengono sia a livello cellulare che e a livello tissutale, e quindi dell'intero miocardio.

Questo studio si concentra su valutare gli effetti della tecnica di defibrillazione su singole cellule miocardiche.

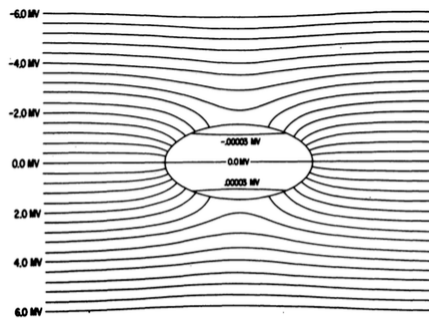
La stimolazione elettrica del miocardio tramite elettrodi transtoracici, equivale nello studio della risposta della singola cellula a un tipo di stimolazione extracellulare [36].

Quando una sospensione cellulare viene sottoposta a stimolazione tramite due elettrodi situati in posizione opposta, succede che si generano delle correnti elettriche nello spazio extracellulare che fluiscono da un elettrodo all'altro, generando un campo elettrico con linee di campo parallele alla direzione delle correnti.

La membrana cellulare è formata da un doppio strato lipidico che presenta canali ionici caratterizzati da alta selettività; per questo motivo è considerata analoga a un dielettrico, essendo contraddistinta da un bassissimo valore di conducibilità elettrica. Pertanto il contributo presentato dell'entrata di correnti elettriche nello spazio citosolico è considerato trascurabile, bensì ciò che porta all'eccitazione elettrica della cellula con nascita del potenziale d'azione, è la generazione del potenziale extracellulare in prossimità della membrana cellulare, dovuta al campo elettrico. Il potenziale extracellulare varia nello spazio, come mostrato in figura 9: risulta nullo nel punto equidistante dagli elettrodi e massimo in prossimità degli elettrodi [37].

Di conseguenza anche il potenziale di membrana, che può essere considerato semplicemente dato dalla differenza tra il potenziale interno e il potenziale esterno ( $V_{\text{membrana}} = V_{\text{interno}} - V_{\text{esterno}}$ ), varia lungo la membrana cellulare. Si rammenti che la cellula è caratterizzata da un'elettronegatività dello spazio intracellulare, ovvero un potenziale di riposo di circa -90mV, rispetto il potenziale nullo del mezzo extracellulare, in condizioni fisiologiche a riposo [1].

La cellula risulterà presentare quindi regioni della membrana iperpolarizzate e regioni depolarizzate, a seconda se queste si affacciano verso l'elettrodo positivo (anodo) o verso l'elettrodo negativo (catodo), rispettivamente.



**Figura 9** Singola cellula sottoposta a stimolazione elettrica tramite elettrodi equidistanti da essa. [37]

Sarà quindi il potenziale delle zone della membrana depolarizzate a determinare in primo luogo l'apertura dei canali ionici per la generazione del potenziale d'azione, il quale produrrà la contrazione cardiaca [9].

Questo meccanismo di eccitazione cellulare mediante stimolazione elettrica è stato confermato da numerosi studi che utilizzano tecniche di mappatura ottica per misurare le variazioni del potenziale di membrana tramite coloranti fluorescenti voltaggio-sensibili [38,39].

La risposta elettrica della singola cellula del miocardio dipende quindi dall'intensità, dalla durata e dalla distribuzione spaziale del potenziale esterno, che si genera in prossimità della cellula, e dalla presenza simultanea di regioni di depolarizzazione e di iperpolarizzazione lungo la membrana cellulare.

L'obiettivo della defibrillazione è di ristabilire il ritmo cardiaco normale dell'intero miocardio; difatti lo shock elettrico applicato deve essere in grado di generare correnti elettriche che vadano ad investire l'intero muscolo cardiaco, il quale è caratterizzato da una struttura altamente anisotropica, formata da miociti collegati da dischi intercalari, da tessuti con orientazioni differenti e separati da giunzioni di collagene. Lo shock elettrico applicato al cuore deve essere quindi abbastanza forte da eccitare la grande massa di tessuto muscolare cardiaco con orientazioni e conducibilità elettriche differenti [40].

Per questo motivo l'elevato shock elettrico risulta essere lesivo, fino ad essere letale, per molte cellule miocardiche; per le quali è necessario indagare su quali siano gli effetti della defibrillazione.

## 2.1 Stimolazione elettrica di cardiomiociti isolati

L'applicazione di uno shock nell'ambiente extracellulare comporta la generazione di un campo elettrico e quindi di un gradiente di potenziale in prossimità della membrana cellulare che consente l'eccitazione elettrica della cellula – come affermato in precedenza.

Diversi studi sperimentali su cardiomiociti hanno valutato negli anni l'efficacia della tecnica di defibrillazione con l'intenzione di comprendere l'effetto dei parametri di stimolazione elettrica, tra cui: intensità, durata e forma d'onda del campo elettrico applicato.

Nel campo della stimolazione per caratterizzare la risposta elettrica del tessuto stimolato e predirne quindi il comportamento a seguito dell'applicazione di un impulso elettrico si utilizzano le curve liminali, che descrivono la relazione tra intensità e durata dell'impulso (o "strength-duration curve"). Dalle curve liminali sono ricavabili due parametri fondamentali per valutare l'efficacia della stimolazione: la reobase e la cronassia. La reobase rappresenta il campo elettrico soglia minimo necessario per stimolare la cellula, indipendentemente dalla durata dello stimolo, ovvero considerando stimoli di durata tendente a infinito; mentre la cronassia è la durata dell'impulso con intensità pari al doppio della reobase ed indica la pendenza della curva liminale. Tempi di cronassia più brevi indicano una maggiore eccitabilità della cellula. Questi due parametri sono legati dall'equazione di Weiss-Lapique.

Il primo modello che si propone di stimare la variazione del potenziale di membrana dovuta a un campo elettrico è il modello Klee e Plonsey [37].

In questo modello le cellule sono ipotizzate di forma sferoidale, ovvero caratterizzate dalle due dimensioni relative all'asse minore e maggiore dello sferoide, con membrana cellulare a bassa conduttività e spazio intracellulare a potenziale costante e nullo.

In questo modo il risultato mostra l'influenza delle dimensioni della cellula, sottoposta a stimolazione, rispetto all'orientazione del campo elettrico e, l'influenza dell'intensità del campo, sul gradiente di potenziale che si genera sulla membrana cellulare.

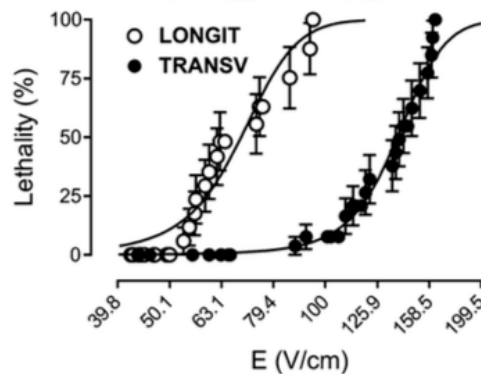
Il risultato di questo studio è tuttora valido e mostra che il valore di potenziale massimo che si crea agli estremi della membrana cellulare, a seguito dell'applicazione di un campo elettrico, dipende dall'orientazione dell'asse di simmetria della cellula rispetto al campo

elettrico.

In conclusione ciò che risulta da questo studio è che più la cellula è stretta e allungata nella direzione del campo elettrico maggiore sarà la differenza di potenziale che si creerà ai suoi estremi e minore sarà la regione di membrana che giunge al massimo valore di potenziale di membrana.

Pertanto, noto che i miociti cardiaci presentano di per sé una forma più allungata in una direzione, è possibile riconoscere l'asse minore e l'asse maggiore della cellula stimolata. In una porzione di tessuto cardiaco che mostri cellule con orientazioni diverse, le cellule orientate parallelamente al campo elettrico saranno quindi le più sensibili alla stimolazione, il che comporta che esse rispondano più rapidamente all'impulso elettrico, generando potenziale d'azione; ma anche che a causa dell'alta intensità di potenziale transmembrana sono più a rischio di morte a causa di elettroporazione[41,42].

A conferma di questo risultato gli studi sperimentali, che hanno costruito le curve liminali per le due diverse orientazione dello stimolo elettrico, hanno trovato valori di campo elettrico reobase minori per impulsi paralleli all'asse maggiore della cellula [52,56]. Da questi studi deriva inoltre la scelta della durata dello stimolo di 5 ms, la durata minima alla quale corrisponde il valore di stimolo reobase.

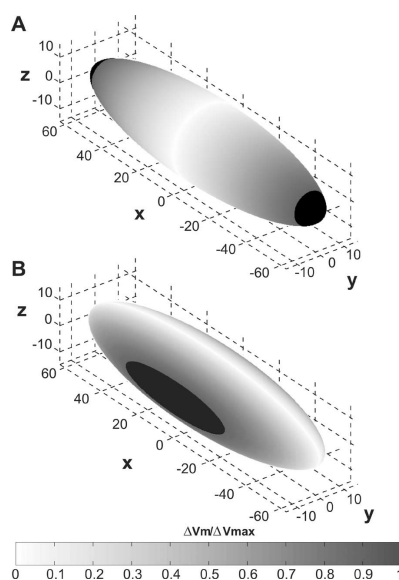


**Figura 10** Curve letalità-intensità di campo per cellule orientate longitudinalmente e trasversalmente al campo elettrico. [41]

Nel 2008, il gruppo di ricerca del Centro di Ingegneria Biomedica di Campinas (UNICAMP, Br) determina per la prima volta la relazione tra intensità di campo elettrico e letalità cellulare, valutando inoltre l'influenza dell'orientamento e della forma d'onda del campo elettrico [41]. Le curve di letalità ottenute sono caratterizzate da un andamento

sigmoidale. A conferma del risultato di Klee e Ponsley, vengono costruite le curve di letalità che mostrano che l'applicazione del campo elettrico parallelamente all'asse maggiore della cellula comporta un rischio maggiore di morte della cellula; un campo elettrico di 80 V/cm è letale per il 75% delle cellule orientate longitudinalmente al campo elettrico e per il 3% delle cellule orientate trasversalmente (figura 10).

Utilizzando la relazione della stima del potenziale massimo extracellulare di Klee e Ponsley, questo studio stima il potenziale massimo della membrana e la sua distribuzione, mostrando che il valore di potenziale raggiunto con l'applicazione di un campo elettrico letale risulta essere maggiore del 20% nelle cellule orientate longitudinalmente al campo rispetto quelle orientate trasversalmente.



**Figura 11** *Variazione spaziale del potenziale di membrana in seguito ad applicazione di campo elettrico.* Modellizzando la cellula con forma di sferoide prolato, nella figura A il campo elettrico è applicato parallelamente all'asse maggiore dello sferoide, mentre nella figura B è orientato trasversalmente ad esso. La variazione spaziale del potenziale di membrana  $\Delta V_m$  rispetto il potenziale di membrana massimo ( $\Delta V_{max}$ ), calcolato con la relazione di Klee e Ponsley, sono indicate da una scala di grigi. Le regioni in nero corrispondono all'area della membrana in cui:  $\Delta V_m / \Delta V_{max} \geq 0.9$ . [41]

Nella figura 11 è riportata la rappresentazione della variazione spaziale del potenziale di membrana; essa mostra come il potenziale di membrana raggiunga il suo valore massimo nelle aree della membrana cellulare più prossime agli elettrodi di stimolazione (zona più scura), mentre si annulla a livello del punto medio tra i due elettrodi (zona più chiara). È inoltre possibile notare come il decadimento spaziale del potenziale di membrana è più rapido per le cellule orientate parallelamente al campo elettrico rispetto a quelle orientate

trasversalmente, per le quali l'area di membrana, caratterizzate da alta intensità di potenziale, è maggiore di 2.6 volte quella delle cellule orientate longitudinalmente. Questo dato sembra spiegare il motivo per cui le cellule orientate trasversalmente necessitano di un campo elettrico soglia maggiore, in quanto le aree della membrana che giungono al potenziale soglia sono più estese .

Questi risultati mostrano inoltre che danni cellulari irreversibili possono essere generati da un campo elettrico d'intensità maggiore di 50 V/cm, la quale può essere raggiunta in alcune regioni del miocardio quando sottoposto a defibrillazione [44].

Valutando l'effetto delle due diverse forme d'onda su cellule orientate parallelamente al campo è risultato che la forma d'onda bifasica rettangolare è meno lesiva della monofasica con la stessa durata (10 ms).

Difatti l'utilizzo della forma d'onda monofasica è stato eliminato commercialmente da molti anni. Evidenze sperimentali affermano che la forma d'onda monofasica ha una probabilità di successo molto minore e una probabilità di rigenerazione di aritmie post-shock molto maggiore rispetto l'onda bifasica [45,46]. L'inversione di polarità dell'onda bifasica sembra infatti limitare i danni dovuti all'elettroporazione sul lato anodico [47], mentre anche per quanto riguarda la capacità di originare potenziali d'azione sembra che l'esistenza di una prima fase di stimolazione funga da condizionamento sottosoglia, che attiva i canali del sodio che si trovavano in uno stato di disattivazione o riposo, e quindi facilita la nascita del potenziale d'azione con la seconda fase dello stimolo [43].

Come affermato in precedenza, quando una cellula viene sottoposta a un campo elettrico uniforme, avviene una polarizzazione di membrana non uniforme, in modo tale che un polo della cellula risulta iperpolarizzato mentre l'altro polo risulta depolarizzato.

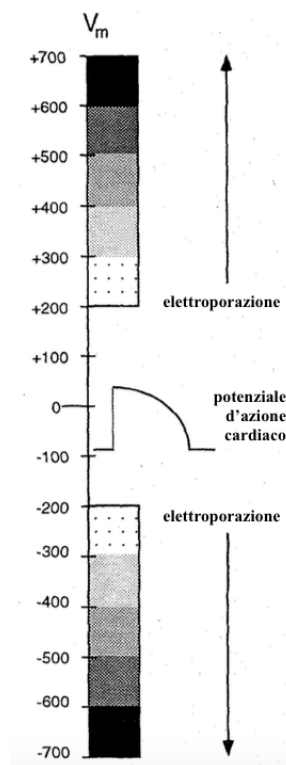
In primo luogo sul lato anodico, le variazioni del potenziale transmembrana se sufficientemente grandi provocano lo sviluppo del processo di elettroporazione, caratteristico di qualsiasi membrana doppiolipidica, come quella cellulare, sottoposta a campo elettrico [12,48].

La probabilità che avvenga l'elettroporazione e la dimensione dei pori originati aumenta con l'aumentare del potenziale di membrana. L'entità dell'elettroporazione è determinata dagli stessi parametri che influenzano l'efficacia della stimolazione elettrica: l'intensità, la

durata e il numero di stimoli applicati [13].

Per quanto la base della tecnica di defibrillazione sia quella di applicare uno shock elettrico che permetta, tramite la depolarizzazione, l'apertura dei canali ionici e una variazione di potenziale tale da generare il potenziale d'azione, quando il potenziale esce dal range fisiologico avviene l'elettroporazione. Numerosi studi affermano che la soglia di potenziale che provoca elettroporazione si trova in un range di 200mV-1V [49], come mostrato in figura 12.

La generazione di pori non selettivi provoca un aumento di conducibilità di membrana e una perdita di materiale cellulare, come enzimi e metaboliti. Infatti se i pori originati rimangono aperti per un tempo abbastanza lungo si ha un flusso degli ioni  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{K}^+$ , responsabili delle variazioni di potenziale di membrana, che alterando le concentrazioni degli stessi nello spazio intra ed extracellulare, portano a consentire la rigenerazione di potenziali d'azioni spontanei, ovvero senza lo stimolo esterno [50].



**Figura 12** Potenziale d'azione e potenziale soglia di elettroporazione. [49]

Il danno maggiore che può verificarsi, a seguito di generazione di pori non selettivi sulla membrana cellulare, è legato a un'entrata eccessiva di calcio nella cellula, definita sovraccarico di calcio, che danneggia l'equilibrio elettrofisiologico cellulare [15,51]. Nel caso peggiore, un sovraccarico di calcio provoca un'ipercontrazione che comporta la morte della cellula.

È importante notare anche che l'elettroporazione è un fenomeno reversibile.

Essendo dipendente dalle variazioni di potenziale di membrana, il flusso di ioni che deriva dalla nascita dei pori, limita l'aumento di potenziale di membrana evitando un ulteriore incremento di pori, ed inoltre quando cessa lo stimolo elettrico si sviluppa un meccanismo di riparazione fisiologica, che permette la chiusura dei pori e il ritorno a concentrazione ioniche fisiologiche.

La conducibilità di membrana aumenta rapidamente, quando il potenziale supera la soglia di elettroporazione; questa variazione repentina di conducibilità stabilizza il potenziale di membrana. Durante l'applicazione dello stimolo elettrico la conducibilità cresce più lentamente, ovvero la rottura di membrana ("membrane breakdown") avviene rapidamente ma il processo di generazione di pori e di aumento di dimensione dei pori è molto lento. A seconda dell'intensità e della durata dello stimolo, alcuni pori crescono in dimensione fino ad arrivare ad uno stato stazionario, altri diminuiscono progressivamente, e la regione di membrana affetta da elettroporazione aumenta.

Una volta cessato l'impulso elettrico, la conducibilità di membrana diminuisce bruscamente ma non torna al valore che aveva prima dell'applicazione del campo elettrico. Molti studi affermano che mentre la diminuzione della dimensione dei pori è un processo che necessita di qualche secondo, la completa chiusura di essi necessita invece alcuni minuti.

Inoltre è stato riscontrato che l'applicazione di una serie di shock elettrici alla membrana cellulare risulta in un aumento progressivo di conducibilità ad ogni shock; questo è probabilmente dovuto al fatto che, non solo lo shock successivo potrebbe danneggiare ulteriormente una membrana cellulare che non abbia recuperato del tutto la sua struttura fisiologica, ma anche che l'esistenza di pori aperti abbia portato ad una talmente elevata perdita di materiale cellulare che abbia impedito il completo recupero elettrofisiologico della cellula.

La conseguenza che deriva principalmente dall'elettroporazione è la generazione di aritmie in seguito all'applicazione dello shock elettrico. La rottura della membrana, che deriva dalla creazione di pori, e l'aumento di conducibilità conseguente ad essa, provoca una variazione dell'elettrofisiologia cellulare.

Evidenze sperimentali riportano un aumento di concentrazione interna di calcio, responsabile dell'accoppiamento eccitazione-contrazione, il quale va a interferire nella dinamica ionica che genera il potenziale d'azione [53].

La corrente di calcio verso lo spazio intracellulare è stata considerata la principale attivatrice delle contrazioni aritmiche a seguito di defibrillazione. Studi attuali, in cui vengono utilizzati farmaci inibitori di correnti di calcio, dimostrano che non è propriamente esatto considerare il calcio come l'unico responsabile della nascita di aritmie post-shock. Pur essendo confermato sperimentale che l'ipercontrazione della cellula, che porta alla morte della stessa, sia dovuta a questo grande aumento di concentrazione interna di calcio, questo fenomeno risulta modificare l'eccitabilità cellulare in quanto va a interferire con i flussi ionici fisiologici. Infatti, è noto anche che l'aumento di concentrazione di calcio intracellulare riduce la corrente di potassio verso l'esterno della cellula [54]. Essendo il potassio considerato il principale responsabile del potenziale di riposo della cellula, la riduzione di fuoriuscita di questo ione favorisce la depolarizzazione, che conduce a generazione di potenziali d'azione aritmici.

L'aumento di conducibilità e l'aumento di potenziale diastolico post-shock è quindi imputabile a una corrente intracellulare non specifica, che sembra incrementare il potenziale di membrana portandolo a superare la soglia di eccitazione elettrica.

Studi sperimentali su singole cellule cardiache, tessuti e sull'intero cuore confermano che l'applicazione di shock ad alta intensità tramite la tecnica di defibrillazione comportano generazione di lesione ai tessuti, imputabile all'elettroporazione, i quali influenzano l'efficacia di questa terapia nel riportare il ritmo cardiaco al suo stato fisiologico.

## **3. Materiali e metodi**

### **3.1 Isolamento miociti ventricolari**

Il procedimento di isolamento delle cellule cardiache viene effettuato nel centro di Ingegneria Biomedica dell'Università Statale Unicamp (Br).

I miociti vengono isolati dal ventricolo sinistro di ratto maschio Wistar (4-6 mesi) tramite perfusione coronarica con collagenase I, seguendo quindi il protocollo sperimentale di Penna e Bassani [55], approvato dal Comitato Etico per la sperimentazione animale (CEUA/IB/UNICAMP, protocollo 2088-1).

La stimolazione elettrica viene effettuata entro le 12 ore successive l'isolamento cellulare.

### **3.2 Camera di perfusione**

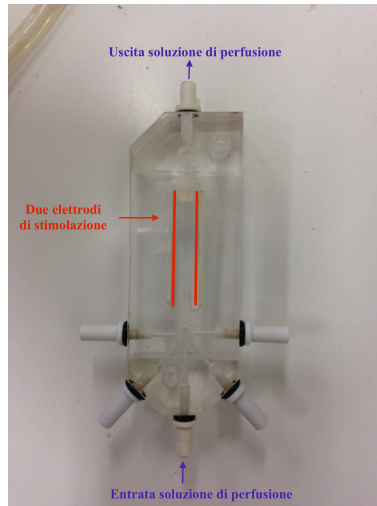
La camera di perfusione è il contenitore dove vengono collocate le cellule isolate in sospensione per essere in seguito sottoposte al protocollo sperimentale. Pertanto, esse vengono inizialmente fatte aderire al fondo della camera, e quindi vengono perfuse e sottoposte a stimolazione elettrica. Durante l'intera sperimentazione, la camera è fissata al microscopio Zeiss, grazie al quale è possibile monitorare tutte le fasi della sperimentazione: l'adesione, la perfusione e la stimolazione elettrica.

La camera di perfusione è di forma rettangolare e costituita di materiale Plexiglass con la parete interna inferiore, dove avverrà l'adesione cellulare, in vetro (Fig. 13).

La fase iniziale della sperimentazione consiste nel preparare il campione cellulare da sottoporre a stimolazione.

Inizialmente il fondo della camera viene rivestito di Collagene, il quale ha la caratteristica di favorire l'adesione cellulare. Dopo un periodo di tempo di 20 minuti, necessario a far seccare il collagene, le cellule in sospensione vengono poste all'interno della camera e lasciate aderire al fondo per nuovamente 20 minuti.

La camera di perfusione è fatta in modo tale da accogliere al suo interno i due elettrodi di stimolazione, negli incavi laterali alla superficie di adesione cellulare.



**Figura 13** *Camera di perfusione.* È possibile notare la superficie rettangolare, in cui vengono fatte aderire le cellule, al centro della camera, ai lati della quale la camera presenta due incavi, dove vengono collocati i due elettrodi di stimolazione. La soluzione di perfusione fluisce all'interno della camera parallelamente ai lati maggiori del rettangolo.

La stimolazione elettrica viene realizzata quindi tramite due elettrodi, costituiti da due fili di Platino, posti all'interno della camera in posizione opposta, lungo le pareti maggiori.

Una volta trascorso il tempo necessario a far aderire le cellule, il campione cellulare viene perfuso con la soluzione di Tyrode, che simula il plasma sanguigno di ratto, in quanto contiene i nutrienti necessari per mantenere la vitalità cellulare, e contemporaneamente viene sottoposto a stimolazione elettrica secondo il protocollo di stimolazione elettrica di cardiomiociti di ratto [41,55-57] per 5 minuti circa, con lo scopo di permettere alle cellule di recuperare la propria funzionalità contrattile.

La perfusione avviene a una velocità di circa 3 ml/min, con una soluzione di Tyrode a 23°C, con la seguente composizione: 140 mM NaCl, 6 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 6 mM H<sub>2</sub>O, 5 mM N-2-idrossietilpiperazine-N'-acido etan-solfonico (HEPES), 11.1 mM glucosio; a un pH di 7.4.

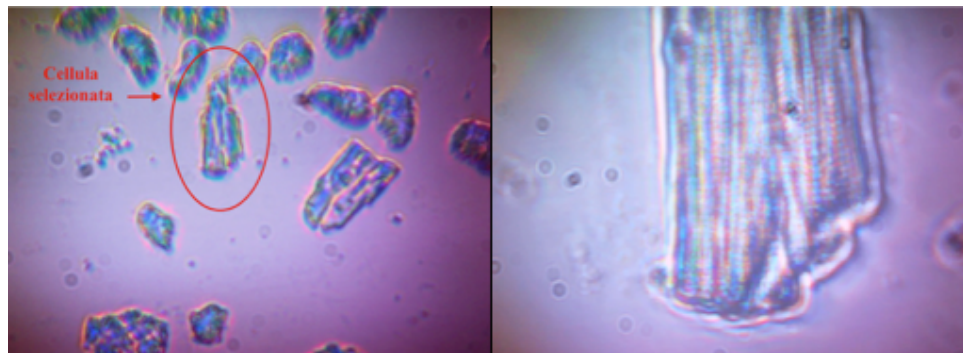
Il protocollo di stimolazione elettrica di cardiomiociti di ratto consiste in una stimolazione con onda bifasica rettangolare di 10 ms di durata totale (5 ms per la fase positiva e 5 ms per la fase negativa dell'onda), a una frequenza di 5 Hz, con un'intensità tale da superare la soglia (al massimo 10 V) e generare contrazione muscolare. Pertanto le cellule in questo periodo iniziale ricevono un impulso elettrico ogni 2 secondi; questo tipo di stimolazione essendo mantenuta nel tempo, ha l'obiettivo di permettere alle cellule di raggiungere lo stato elettrofisiologico stazionario.

### 3.3 Requisiti necessari per la scelta del miocita

Il protocollo di stimolazione elettrica viene applicato su una cellula per ogni campione cellulare, la quale viene selezionata sulla base di requisiti necessari per l'obiettivo di questo studio:

- Deve mostrare striature tipiche del tessuto muscolare striato cardiaco, ossia una struttura cellulare integra, e una preservata attività contrattile di risposta allo stimolo elettrico; ovvero deve trovarsi in stato di quiescenza se in assenza di stimolo elettrico e deve contrarsi se sottoposta a stimolo elettrico.
- Deve essere orientata parallelamente alla direzione del campo elettrico con un range di  $\pm 5^\circ$ .
- Deve essere localizzata a una distanza minima di 2 mm dagli elettrodi di stimolazione, in modo tale che la cellula si trovi nell'area in cui il campo elettrico è stimato uniforme, con un errore di stima ( $< 2\%$ ) [55-56].

Nella figura sottostante (Fig. 14) viene riportata a sinistra l'immagine registrata dal microscopio con una scala di 1:10, in cui è possibile individuare la cellula selezionata per la stimolazione elettrica, mentre per la figura a destra è stata utilizzata una lente a ingrandimento maggiore (1:40).



**Figura 14** Immagine registrata al microscopio della cellula scelta per essere sottoposta al protocollo sperimentale di questo studio. Nell'immagine a sinistra viene riportata la cellula selezionata nel campione cellulare, in cui è possibile distinguere cellule morte e cellule ancora vitali, grazie alla forma allungata di queste ultime rispetto le prime. Nell'immagine a destra, a scala di ingrandimento maggiore, la cellula presenta bordi distinguibili per l'analisi dell'attività spontanea con edge detection.

Nella prima fase sperimentale in cui dev'essere selezionata la cellula con i requisiti necessari, viene utilizzata una lente a ingrandimento minore, in modo tale da poter individuare la cellula con più facilità.

La cellula selezionata presenta le striature tipiche di un cardiomiocita e i bordi sono ben definiti, il che denota una struttura cellulare intatta, indice di vitalità. Nell'immagine a sinistra è possibile inoltre osservare diversi aggregati cellulari che rappresentano miociti morti. Essi infatti non presentano la forma allungata caratteristica di una cellula muscolare ma si presentano di forma arrotondata ovale.

Una volta selezionata la cellula viene cambiata la lente di ingrandimento in modo tale da permettere la registrazione dei video della singola cellula, la quale pertanto deve presentare bordi distinguibili per l'analisi dei risultati tramite edge detection.

L'attività contrattile della cellula si manifesta principalmente in due modi; tramite contrazioni, che sono accorciamenti in lunghezza della cellula, o tramite onde, che si presentano proprio come onde che percorrono la superficie della cellula in lunghezza [21].

### 3.4 Protocollo sperimentale di stimolazione elettrica

La figura 15 mostra il piano di lavoro con tutti gli elementi utilizzati per eseguire il protocollo sperimentale di stimolazione elettrica.

La camera contenente le cellule si trova fissata in un microscopio, dove, come affermato in precedenza, viene perfusa e sottoposta a stimolazione.

L'immagine del microscopio viene ripresa da una camera CCD e visionata sul monitor del computer grazie al software Debut Professional NCH, in modo tale da monitorare continuamente l'attività contrattile della cellula durante la stimolazione.

L'oscilloscopio KEYSIGHT DSO1004A viene utilizzato per registrare le variazioni in termini di tensione applicata dallo stimolatore ad alta potenza.

Lo stimolatore ad alta potenza è stato progettato nel Centro di Ingegneria Biomedica dell'Università Statale di Campinas (Br), in grado di rilasciare un singolo shock sincronizzato con forma d'onda bifasica simmetrica rettangolare o esponenziale troncata (Fig.16), fino a un'intensità di 60V.

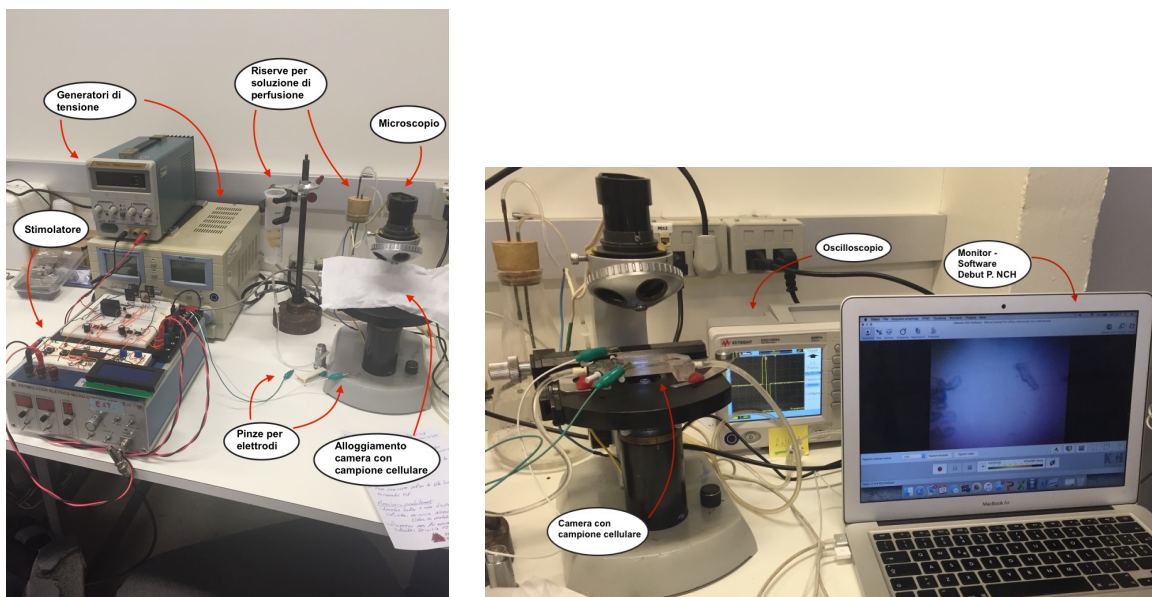
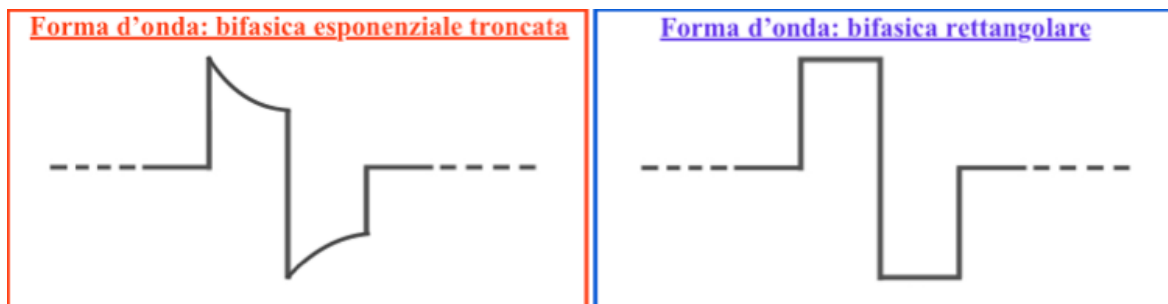


Figura 15 Rappresentazione del piano di lavoro con tutti i dispositivi utilizzati.



**Figura 16** Le due forme d'onda di stimolazione confrontate in questo studio.

Una volta scelta la cellula per procedere alla stimolazione elettrica è necessario sospendere temporaneamente la perfusione e la stimolazione elettrica iniziale, e regolare il livello della soluzione di Tyrode, in modo tale da consentire la stima del campo elettrico.

L'intensità del campo elettrico viene infatti stimata a partire dal potenziale applicato, modellizzando la camera come nel caso di un condensatore a piani paralleli, come rapporto tra tensione di stimolazione applicata dai due elettrodi e distanza tra gli elettrodi di stimolazione. Per poter utilizzare questa approssimazione è necessario che il livello della soluzione sia costante in modo tale che anche la densità di corrente sia costante [41]. A volume di soluzione costante viene applicato il protocollo di stimolazione elettrica.

In primo luogo deve essere determinato il valore di campo elettrico soglia  $E_S$ , che corrisponde al valore di potenziale elettrico extracellulare che permette al potenziale di membrana di superare la soglia di sparo del potenziale d'azione, il quale quindi permette alla cellula di contrarsi.

Il valore soglia viene calcolato secondo il protocollo di stimolazione elettrica di cardiomiociti di ratto. Utilizzando le stesse condizioni di stimolazione – onda bifasica rettangolare di 10 ms di durata totale, a 5 Hz di frequenza – viene diminuita gradualmente la tensione di stimolazione e si determina il valore di potenziale soglia  $V_S$ , come l'intensità della fase positiva dell'ultimo stimolo prima che la cellula smetta di contrarsi.

Quindi utilizzando l'approssimazione, che ipotizza la camera essere analoga a un condensatore a piani paralleli, il campo elettrico soglia risulta:

$$E_S \left[ \frac{V}{cm} \right] = \frac{V_S}{d_{\text{elettrodi}}} \text{ con } d_{\text{elettrodi}} = 0,75 \text{ cm.}$$

Una volta determinata l'intensità del campo elettrico soglia  $E_S$ , questo valore viene usato come riferimento per la stimolazione elettrica ad alta intensità.

Il protocollo sperimentale prevede un primo step di stimolazione basale, in quanto non viene applicato alcun shock ad alta potenza, al quale seguono 7 step ripetitivi, nei quali l'intensità del singolo shock viene aumentata ad ogni step.

Ad ogni step la cellula viene sottoposta nei 20 secondi iniziali alla stimolazione secondo protocollo di stimolazione elettrica di miociti di ratto con un valore di tensione di  $6 \pm 1$  V, per consentire ad essi di raggiungere il proprio stato stazionario (come affermato in precedenza). Successivamente viene stimolata con un singolo shock ad alta intensità e infine lasciata in assenza di stimolazione elettrica per un tempo minimo di 45 secondi, durante i quali viene monitorata l'attività spontanea evocata dallo shock finale, obiettivo di questo studio.

L'attività contrattile evocata nel primo step di stimolazione, ossia senza l'applicazione dello shock ad alta intensità, rappresenta quindi la risposta elettrica basale del cardiomiocita. La frequenza media dell'attività contrattile basale viene considerata come riferimento per valutare la variazione di frequenza media di attività spontanea con l'aumentare dell'intensità di stimolazione.

Gli step ad alta intensità consistono invece nella stimolazione iniziale nei primi 20 secondi, in seguito ai quali viene rilasciato un singolo shock ad alta intensità, il quale ha lo scopo di simulare lo shock liberato con la tecnica della defibrillazione. Il protocollo prevede infatti un incremento costante dell'intensità di questo shock defibrillatorio, come avviene in alcuni casi durante la rianimazione di un paziente in arresto cardiaco o che presenta fibrillazione ventricolare.

Il circuito elettronico per la stimolazione ad alta intensità è stato progettato in modo tale da essere caratterizzato da un sincronismo perfetto dello shock con la stimolazione a bassa intensità iniziale. Pertanto non appena viene attivato il circuito, esso dissocia lo stimolatore a bassa intensità dalla camera in cui sono presenti le cellule, e rilascia lo stimolo ad alta intensità a una distanza di 2 secondi, calcolata a partire dal fronte di crescita della tensione della prima metafase dell'onda di stimolazione. Per questo motivo il ritardo dello shock può arrivare al massimo a 4 secondi, perché se attivato durante il rilascio dell'ultimo impulso a bassa intensità, il circuito aspetterà il prossimo fronte di crescita per contare i 2 secondi di sincronismo.

L'intensità dello shock elettrico viene calcolata a partire dall'intensità del campo elettrico soglia e aumentata di un fattore 3 ad ogni step:

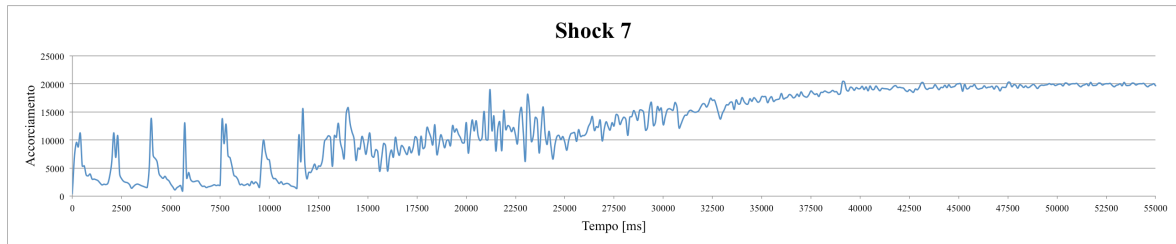
- Step 1  $V_{shock1} = 3 \cdot V_S$
- Step 2  $V_{shock2} = 6 \cdot V_S$
- Step 3  $V_{shock3} = 9 \cdot V_S$
- Step 4  $V_{shock4} = 12 \cdot V_S$
- Step 5  $V_{shock5} = 15 \cdot V_S$
- Step 6  $V_{shock6} = 18 \cdot V_S$
- Step 7  $V_{shock7} = 21 \cdot V_S$

In seguito allo shock, la stimolazione elettrica viene arrestata e viene registrata l'attività spontanea contrattile che segue lo shock ad alta intensità per un tempo di 45 secondi, obiettivo di questo studio. La cellula viene mantenuta in assenza di qualsiasi stimolo elettrico fino a che non presenti più attività spontanea, ovvero recuperi il proprio stato di quiescenza.

Negli ultimi step, in cui l'intensità raggiunge valori molto alti, è necessario attendere fino a circa 5 minuti prima che l'attività elettrica della cellula termini e questa torni al suo stato di riposo, presentando la sua attività contrattile basale. Durante questo tempo il miocita viene perfuso con la soluzione di Tyrode, che contiene i nutrienti necessari a mantenere la vitalità cellulare.

Considerando che l'intensità del potenziale soglia  $V_S$  risulta essere in un range di 1.8-3 V, in accordo a quanto trovato in letteratura [2-4], lo shock può arrivare a un'intensità molto alta (circa 60V). Per questo motivo in molti casi lo shock genera un'attività contrattile spontanea con frequenza media talmente alta da portare alla morte della cellula.

La morte della cellula si manifesta come una ipercontrazione e perdita di struttura cellulare (Fig. 17); la cellula comincia a contrarsi molto velocemente e ad accorciarsi visibilmente fino a diventare un aggregato cellulare di forma arrotondata, perdendo completamente la propria integrità cellulare e quindi funzionalità contrattile [4].



**Figura 17** *Andamento temporale degli accorciamenti dovuti alle contrazioni spontanee di una cellula sottoposta a shock ad alta intensità con forma d'onda bifasica rettangolare: viene riportato il caso in cui la cellula giunge a morte. L'accorciamento diventa maggiore nella fase finale del tracciato, mostrando una drastica riduzione in lunghezza della cellula, ovvero l'ipercontrazione indice di morte.*

Pertanto se avviene la morte della cellula non è più possibile procedere con il protocollo sperimentale e si passa quindi al prossimo campione cellulare.

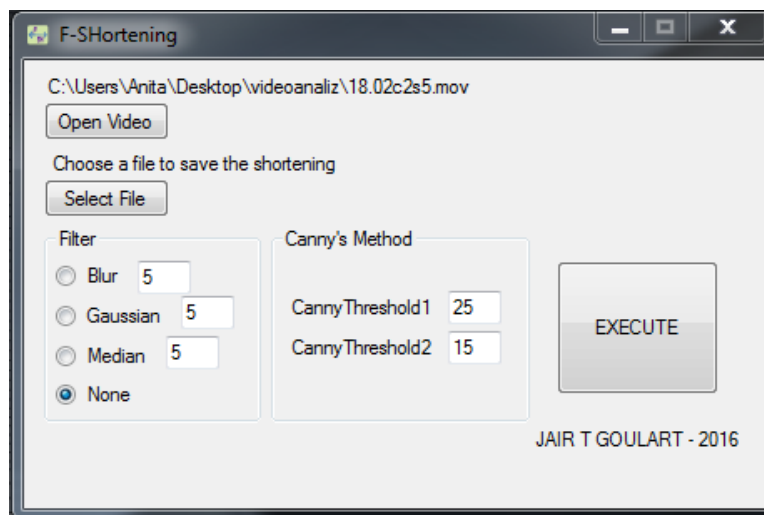
In conclusione per ogni cellula si ottengono al massimo 8 video, che coincidono con il primo video che presenta l'attività contrattile basale, e i 7 video dei 7 step di stimolazione ad alta intensità.

### 3.5 Analisi dell'attività spontanea

I video ottenuti dalla stimolazione elettrica vengono analizzati tramite un software chiamato F-Shortening, prodotto appositamente nel Centro di Ingegneria Biomedica dell'Università Statale di Campinas (Br), che si basa sul metodo di Canny di edge detection.

Questo software riceve in entrata i file mov dei video di ogni cellula e produce in uscita un file txt che riporta gli accorciamenti nel tempo, Fig. 18.

Il metodo di Canny è un metodo di edge detection, usato nell'elaborazione delle immagini per il riconoscimento dei bordi (edge). Il software infatti analizza ogni fotogramma del video, assegnando a ogni pixel un preciso valore di intensità di grigio. A questo punto se una regione dell'immagine considerata presenta una discontinuità nei livelli di grigio, significa che il fotogramma in quella regione presenta un contorno.



**Figura 18** *Interfaccia grafica del software F-Shortening.* Il comando “Open Video” seleziona il video (.mov) da analizzare, mentre il comando Select File determina il nome e la posizione del file (.txt) in cui viene salvato il risultato. “Execute” avvia quindi il software. Blur, Gaussian e Median sono i tipi di filtri di smoothing; CannyThreshold1 e CannyThreshold2 sono le due soglie per il riconoscimento dei contorni.

Il metodo di canny opera, più specificatamente, in quattro fasi:

- 1- riduzione del rumore tramite l'utilizzo di un filtro di smoothing; questi filtri hanno l'obiettivo di rendere più uniforme un'immagine. Il risultato è un'immagine che presenta una leggera sfocatura rispetto l'immagine originale e in cui nessun singolo pixel è affetto da disturbi di livello significativo.

I filtri utilizzabili in questo caso sono il filtro Blur, il filtro mediano, e il filtro gaussiano. Il filtro Blur effettua una media dei valori dei pixel di una determinata area dell'immagine secondo opportuni pesi in modo da ridurre brusche variazioni e eliminare piccole imperfezioni. Il filtro mediano sostituisce un pixel con il valore mediano dei pixel nell'intorno. Il filtro gaussiano ha un effetto più accentuato e pesa gli elementi secondo una funzione gaussiana.

- 2- Ricerca del gradiente di luminosità: un contorno di un oggetto nell'immagine può puntare verso una direzione qualsiasi. Quindi il metodo di Canny effettua un ulteriore filtraggio, usando 4 tipi di filtri differenti al fine di individuare i contorni orizzontali, verticali e quelli sulle due diagonali. A questo punto per ciascun pixel viene assunta come direzione del contorno quella relativa al filtro che da il valore maggiore, che corrisponde alla direzione in cui si ha il massimo gradiente di luminosità.

- 3- Soppressione dei non massimi: utilizzando la mappa dei gradienti è possibile individuare i punti corrispondenti ai massimi locali, ovvero in cui la derivata del gradiente si annulla. Questi punti saranno quindi considerati come punti di un contorno.
- 4- Individuazione dei contorni mediante thresholding a doppia soglia; l'estrazione dei contorni viene effettuata definendo due soglie, una bassa e una alta, che vengono confrontate con il gradiente in ciascun punto. Quindi vengono eliminati i pixel con gradiente minore della soglia bassa e conservati quelli con gradiente maggiore della soglia alta; mentre i punti compresi tra le due soglie vengono conservati solo se contigui a un punto che ha superato la soglia alta.

In seguito i file txt generati dal software vengono elaborati con il programma Microsoft Office Excel 2010, con cui è possibile visualizzare il grafico dell'accorciamento della cellula in funzione del tempo.

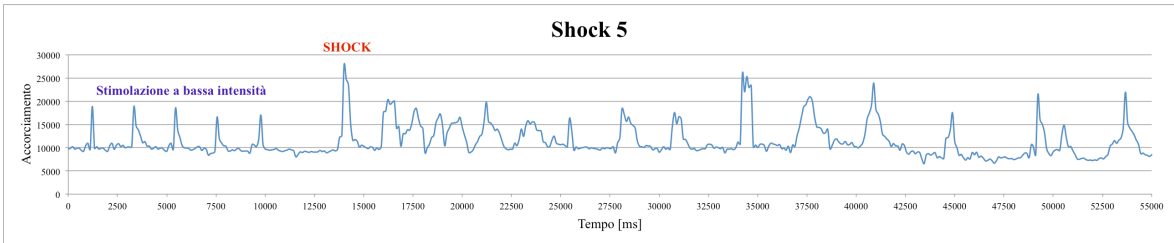
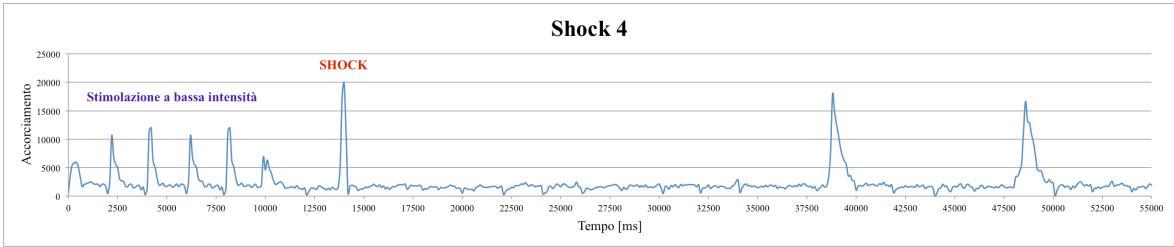
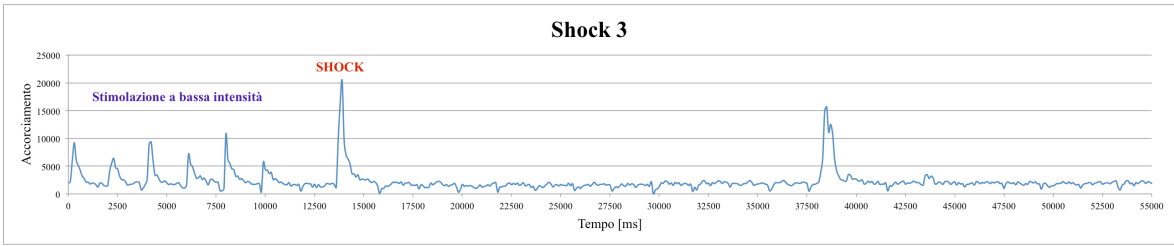
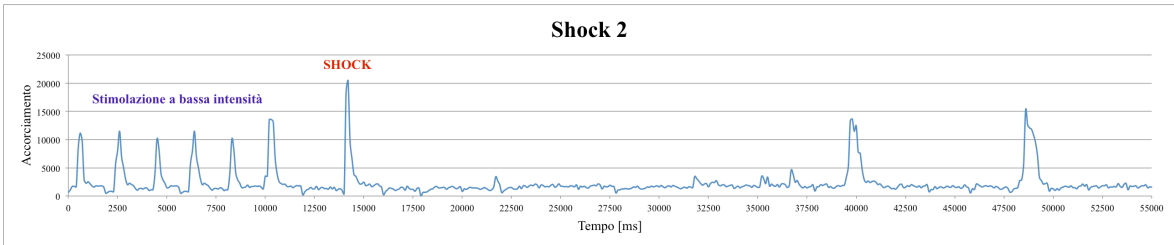
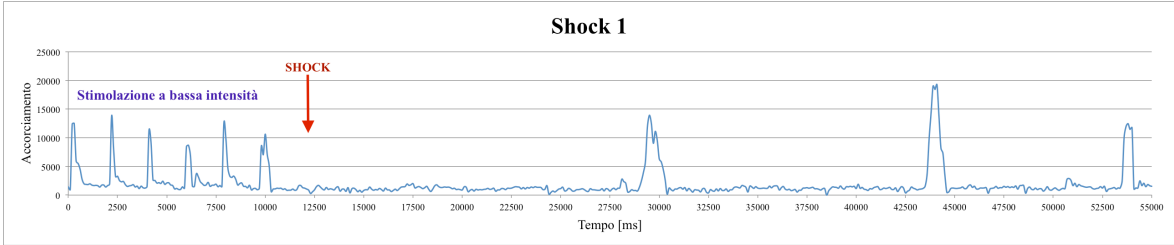
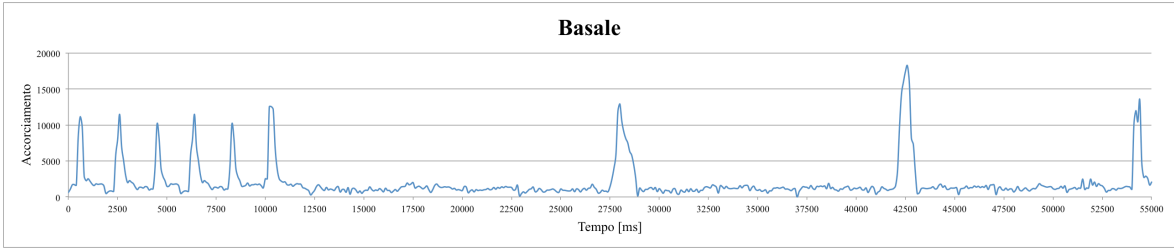
L'accorciamento che si trova sull'asse verticale è un numero adimensionale e corrisponde allo spostamento del bordo della cellula, determinato ad ogni fotogramma analizzato dal software F-Shortening. Pertanto i picchi riconoscibili nel tracciato corrispondono agli accorciamenti corrispettivi alle contrazioni del miocita.

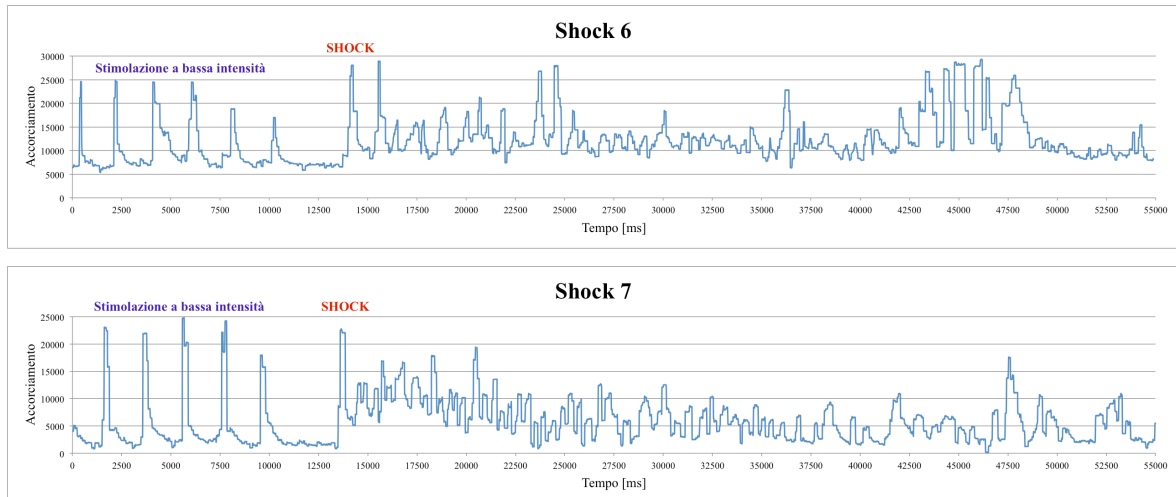
Nella figura 19 sono riportati i sette grafici che mostrano l'attività contrattile della cellula in esame, che si genera in seguito a stimolazione elettrica secondo i sette step del protocollo sperimentale.

Nel caso rappresentato, la cellula è stata sottoposta ai sette cicli di stimolazione elettrica utilizzando la forma d'onda dello shock ad alta intensità bifasica esponenziale troncata.

L'andamento iniziale del grafico, che comprende i primi 10 secondi (ovvero i primi 10000 ms), mostra l'attività contrattile della cellula quando sottoposta alla stimolazione a 5 Hz con forma d'onda bifasica rettangolare con durata totale di 10 ms. Le contrazioni raffigurate si sviluppano infatti con un intervallo di 2 secondi l'una dall'altra.

Al termine dei 10 secondi viene liberato lo shock ad alta intensità che genera una contrazione più accentuata a seconda dell'intensità, con un ritardo di 2 o 4 secondi a seconda del sincronismo.





**Figura 19** Attività contrattile di risposta alla stimolazione elettrica. La figura riporta i sette grafici che rappresentano i sette step del protocollo sperimentale. In ogni grafico è rappresentato lo spostamento del contorno della cellula in funzione del tempo; a ogni picco corrisponde un accorciamento della cellula, ovvero una contrazione.

Nella figura soprastante è possibile notare che nel primo step non è distinguibile lo shock ad alta intensità, dovuto al fatto che il primo shock di 3 volte il potenziale soglia  $V_S$  risulta talmente basso da non produrre contrazione della cellula. Negli altri step lo shock è riconoscibile dal picco maggiore di accorciamento, in seguito alla stimolazione iniziale.

### **3.6 Analisi statistica**

Successivamente alla raccolta dei dati, si ottengono due classi di dati: la classe delle cellule che sono state stimulate elettricamente con la forma d'onda bifasica esponenziale troncata, e la classe di cellule stimulate con la forma d'onda bifasica rettangolare.

Per valutare l'effetto delle due tipologie di forme d'onda sono state costruite curve dose-risposta: si può infatti considerare la terapia della defibrillazione come la somministrazione di una dose di elettricità, e la generazione di attività spontanea come la risposta negativa della cellula allo shock elettrico ricevuto.

Infine viene effettuata un confronto statistico tramite F test per verificare la significatività dei risultati ottenuti.

Le curve di dose-risposta e gli F test vengono eseguiti mediante il software GraphPad Prism 6.0.

## 4. Risultati

In questo capitolo sono mostrati i risultati ottenuti a seguito della stimolazione elettrica di miociti ventricolari di ratto mediante due tipologie di forma d'onda differenti: bifasica simmetrica rettangolare e bifasica esponenziale troncata.

La stimolazione ad alta intensità è stata eseguita tramite uno stimolatore ad alta potenza realizzato nel centro di Ingegneria Biomedica dell'Università Statale Unicamp (Br), in grado di liberare shock fino a un'intensità di 60 V.

La tecnica di stimolazione consiste nell'incrementare progressivamente l'intensità elettrica dello shock, in modo tale da poter valutare a ogni incremento come varia la risposta elettrica della cellula in termini di variazione della frequenza media di attività spontanea, che si genera in seguito allo shock.

L'intensità crescente dello shock elettrico viene calcolata a partire dall'intensità del campo elettrico soglia, determinato prima di eseguire il protocollo sperimentale (vedi Materiali e metodi) e aumentata di un fattore 3 ad ogni step. Il valore di campo elettrico soglia è di  $1,783 \text{ V/cm} \pm 0,315 \text{ V/cm}$ , e quindi all'ultimo step di stimolazione l'intensità dello shock elettrico, pari a 21 volte il valore soglia, giunge fino  $37,446 \text{ V/cm} \pm 6.619 \text{ V/cm}$ .

È stato scelto questo metodo sperimentale con l'obiettivo di verificare l'esistenza di una relazione di tipo dose-risposta tra intensità di campo elettrico applicato e generazione di attività spontanea, che possa essere usata come riferimento per valutare e quantificare la lesività di una tecnica di defibrillazione.

A seguito dell'elaborazione dei dati raccolti, si è voluto infine analizzare l'efficacia della forma d'onda bifasica esponenziale troncata, attualmente in uso, rispetto la forma bifasica rettangolare, in termini di diminuzione di lesività.

## 4.1 Curve dose-risposta

In questo studio sono state sottoposte a stimolazione elettrica un totale di 16 miociti ventricolari di ratto, i quali sono stati divisi in due classi in base al tipo di forma d'onda di campo elettrico applicata.

Sono stati raccolti i dati di 8 cellule per la stimolazione bifasica esponenziale troncata e di 8 cellule per la stimolazione bifasica rettangolare.

Per ogni cellula è stata determinata la frequenza media di attività spontanea, come numero di attività spontanee avvenute nell'intervallo di tempo di 45 secondi, ad ogni step di stimolazione, partendo dallo step di risposta basale 1, aumento di 3 volte ad ogni step. Questi dati sono stati utilizzati per creare le curve di dose e risposta, che riportano la relazione tra intensità di campo elettrico applicato (1,3,6,9,12,15,18,21) e la frequenza media di attività spontanee generate.

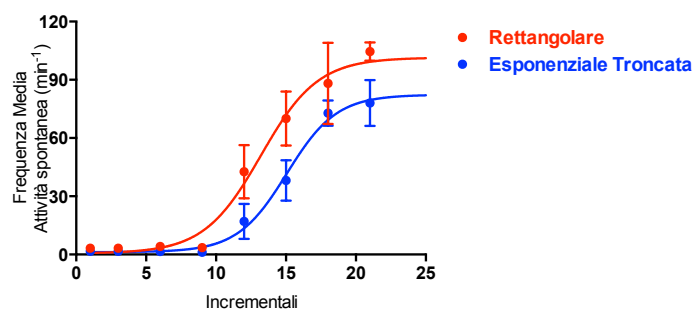
In seguito i dati raccolti di ogni cellula sono stati interpolati con la seguente funzione sigmoidea di dose-risposta:

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{[(\log EC_{50} - X) \cdot \text{Hillslope}]}}$$

in cui sull'asse Y compare la frequenza media di attività spontanee, e sull'asse X il rapporto tra campo elettrico applicato e campo elettrico basale  $E/E_s$ , ovvero gli incrementali di ogni step di stimolazione (1,3,6,9,12,15,18,21).

Bottom è il valore di minimo locale corrispondente all'asintoto minore della curva sigmoide e Top il maggiore locale corrispondente all'asintoto maggiore;  $EC_{50}$  è il valore d'intensità di campo elettrico X al quale corrisponde la frequenza media di attività spontanea a metà tra la frequenza Bottom e la frequenza Top; infine Hillslope è il coefficiente di Hill che definisce la pendenza della curva sigmoide.

In seguito all'interpolazione sono stati eliminati i dati di quelle cellule che non si adattavano statisticamente a questa interpolazione, ovvero quelle per le quali l'interpolazione era determinata ambigua dal software GraphPad Prism; si ottengono infine un gruppo di 5 cellule per la forma d'onda rettangolare e 6 cellule per l'esponenziale troncata.



**Figura 20** Curve dose-risposta in cui la frequenza media di attività spontanea generata dallo shock elettrico è funzione del rapporto di intensità di campo elettrico applicato rispetto al campo elettrico soglia (Incrementali).

La figura 20 mostra le curve dose-risposta della stimolazione bifasica rettangolare e bifasica esponenziale troncata.

È stata eseguita la media dei valori interpolati ottenuti ed in seguito è stato effettuato un F test per confrontare la curva dose-risposta dell'esponenziale troncata e la curva dose-risposta della bifasica rettangolare. È risultato pertanto che non esiste differenza statisticamente significativa tra le due curve dose-risposta ( $p < 0.05$ ).

Per determinare la lesività di una forma d'onda rispetto l'altra si valuta se esiste una differenza statisticamente significativa tra i valori di LogEC50: più il valore di LogEC50 è alto, o più la curva sigmoide è spostata verso destra, minore sarà la lesività del metodo.

**Tabella 1** Valori ottenuti con GraphPad Prism 6.0, rappresentati dalla media  $\pm$  errore standard, con N equivalente al numero di campioni su cui è stato effettuato il confronto statistico.

	<b>Bifasica Rettangolare (N=5)</b>	<b>Bifasica Esponenziale Troncata (N=6)</b>
Bottom	0.5698 $\pm$ 6.924	1.218 $\pm$ 3.702
Top	101.4 $\pm$ 12.87	82.31 $\pm$ 9.147
LogEC50	13.21 $\pm$ 0.9459	15.06 $\pm$ 0.7365
Hillslope	0.2130 $\pm$ 0.08808	0.2448 $\pm$ 0.09066

Dai risultati rappresentati in Figura 20 e riportati numericamente in Tabella 1, si deduce che, per quanto non risulti una differenza statisticamente significativa, la curva dose-risposta della forma d'onda esponenziale troncata si trova più spostata verso destra ed è caratterizzata da un LogEC50 maggiore del 10% circa rispetto la curva della forma d'onda bifasica rettangolare.

Con la stimolazione esponenziale si raggiunge lo stesso effetto in termini di frequenza media di attività spontanea ma ad un'intensità di campo maggiore rispetto la stimolazione con forma d'onda bifasica rettangolare.

Inoltre la frequenza media massima raggiunta nell'ultimo step di stimolazione ad alta intensità con la bifasica rettangolare è maggiore del 20% circa rispetto il caso di stimolazione con shock in forma esponenziale troncata (valore Top in Tabella 1).

Il coefficiente di Hill (Hillslope), che indica la pendenza della curva dose-risposta, è simile nei due casi: l'aumento della frequenza di attività spontanea con l'aumentare dell'intensità segue quindi un andamento all'incirca analogo nei due tipi di stimolazione.

**Tabella 2** Valori di frequenza media  $\pm$  l'errore standard.

		<b>Frequenza media di attività spontanea</b>	
	<b>E /E<sub>S</sub></b>	<b>Bifasica Rettangolare</b>	<b>Bifasica Esponenziale Troncata</b>
<u>Basale</u>	1	3.200 $\pm$ 1.319	1.667 $\pm$ 0.760
<u>Step 1</u>	3	3.200 $\pm$ 1.319	1.667 $\pm$ 0.760
<u>Step 2</u>	6	4.167 $\pm$ 1.493	1.500 $\pm$ 0.719
<u>Step 3</u>	9	3.50 $\pm$ 1.928	1.167 $\pm$ 0.543
<u>Step 4</u>	12	42.667 $\pm$ 13.674	17.000 $\pm$ 9.004
<u>Step 5</u>	15	70.000 $\pm$ 13.981	38.167 $\pm$ 10.448
<u>Step 6</u>	18	88.200 $\pm$ 20.980	72.800 $\pm$ 6.507
<u>Step 7</u>	21	104.500 $\pm$ 4.735	78.000 $\pm$ 11.818

In Tabella 2 sono riportati i valori della frequenza media di attività spontanea relativa a ogni step di stimolazione. La variazione di frequenza più evidente si riscontra, per entrambe le tipologie di stimolazione, nel passaggio dallo step 3 allo step 4, come mostrato anche in figura 19 nelle curve di dose-risposta.

## 5. Discussione

Questo studio presenta un'analisi quantitativa e probabilistica della relazione che esiste tra generazione di attività spontanea e intensità di campo elettrico esterno applicato a cardiomiociti isolati di ratto.

Questa relazione, descritta per la prima volta, rappresenta un'alternativa alla relazione letalità-intensità utilizzata finora [41], con lo scopo di confrontare quantitativamente differenti condizioni di stimolazione e comprenderne gli effetti che determinano l'efficacia e la lesività della tecnica di stimolazione.

La variazione di frequenza di attività spontanea, che si genera in seguito a stimolazione ad alta intensità, è un indice di lesione cellulare con cui è possibile comparare un metodo di stimolazione rispetto un altro, senza dover giungere al caso peggiore di danno cellulare, ovvero la morte della cellula stimolata.

L'attività spontanea è intesa come un'attività contrattile che la cellula esibisce a seguito di shock ad alta intensità e in assenza di stimolo elettrico. L'elettrofisiologia cellulare mostra che la contrazione di una cellula cardiaca è il risultato di un processo rigoroso i cui protagonisti sono principalmente il potenziale transmembrana, la selettività della membrana cellulare e le concentrazioni ioniche intra ed extracellulari.

Come mostrato nella parte di introduzione, lo stimolo elettrico agisce andando a depolarizzare la membrana ovvero aumentando il potenziale di membrana consentendo l'apertura dei canali ionici che governano lo sviluppo del potenziale di azione, grazie al quale la cellula si contrae. Per questo motivo una cellula che presenta un aumento di frequenza di attività spontanee contrattili, rispetto la frequenza che cellule cardiache in stato di riposo presentano, in una condizione di assenza di stimolo elettrico è considerato anomalo e segnale di una lesione cellulare che abbia alterato il rigoroso equilibrio elettrofisiologico del miocita.

Difatti l'insuccesso della tecnica terapeutica di defibrillazione è legato non solo all'inefficacia della stimolazione nel terminare le fibrillazioni patologiche, ma anche nella ricomparsa di aritmie in seguito allo shock defibrillatorio.

L'aritmogenesi post-shock è dovuta a blocchi di conduzione, legati alla morte di cellule del tessuto cardiaco; ad un aumento del potenziale di membrana, dovuto all'aumento di

conduttività a seguito dell'elettroporazione, e che rende più facile l'originarsi di potenziali d'azione disordinati; ed a un danno cellulare considerato per lo più legato ad un accumulo di calcio intracellulare [6,44,48].

Per questo motivo è possibile quantificare il danno in termini di frequenza di attività spontanea, in quanto quest'attività è generata da un disordine elettrofisiologico che sta alla base anche dell'aritmogenesi.

La frequenza media di attività spontanea risulta quindi essere funzione crescente dell'intensità dello shock, così come la letalità.

Il risultato principale di questo studio è che qualitativamente la stimolazione con forma d'onda esponenziale troncata appare meno lesiva della stimolazione con forma d'onda bifasica rettangolare.

La curva dose-risposta mostra infatti uno spostamento verso destra e un abbassamento dell'asintoto massimo della sigmoide; ovvero dato un certo valore di campo elettrico, la stimolazione esponenziale troncata genera meno attività spontanea della stimolazione con onda rettangolare: può essere quindi considerata meno lesiva.

Il fatto che l'analisi statistica non abbia mostrato una differenza significativa tra le due tipologie di stimolazione è legato probabilmente allo scarso numero di cellule studiate.

Inoltre, a conferma del fatto che è preferibile la stimolazione con onda bifasica esponenziale troncata, nessuna delle cellule è giunta a morte con questo tipo di shock, mentre 6 cellule su 8 sono morte con onda bifasica rettangolare: solo 2 delle quali sono giunte fino all'ultimo step di stimolazione, le altre sono morte già allo step 5 o 6.

L'interpretazione di questo risultato deriva dalla letteratura; difatti la lesione cellulare dovuta all'applicazione di uno shock elettrico ad alta intensità è deputata all'originarsi dell'elettroporazione.

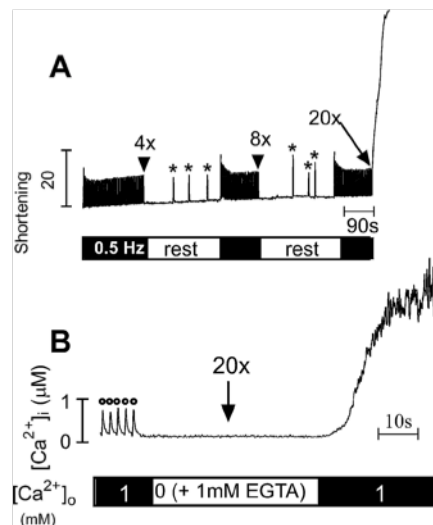
Il campo elettrico ad alta intensità genera un gradiente di potenziale transmembrana che, se supera il potenziale soglia di elettroporazione, crea pori sulla membrana cellulare attraverso i quali si genera un flusso di materiale cellulare che altera l'elettrofisiologia della cellula [12, 13, 58].

A seguito di uno shock che supera la soglia di elettroporazione, i pori che si sono generati sulla membrana non permettono al potenziale di membrana di tornare a riposo, si verifica quindi un aumento del potenziale di membrana e un aumento di conduttività.

Se questa variazione di potenziale rende la membrana più depolarizzata, in questa regione è possibile che si generino potenziali d'azione disordinati. Allo stesso tempo la presenza di pori aperti, ovvero una maggiore conduttività, determina uno scambio di materiale cellulare che può essere verso lo spazio intracellulare o verso lo spazio extracellulare.

La perdita di componenti intracellulari vitali, come metaboliti o acqua, può rallentare il meccanismo di autoriparazione che si attiva in seguito elettroporazione, difatti maggiore è l'entità della lesione maggiore è il tempo di recupero necessario.

Negli esperimenti condotti in questo studio è risultato difatti che a partire dal quarto step di stimolazione i tempi di recupero aumentavano; mentre nei primi step era necessario circa 1 minuto per permettere alla cellula di recuperare il suo stato di quiescenza, negli ultimi step l'attività spontanea cessava dopo più di 5 minuti.

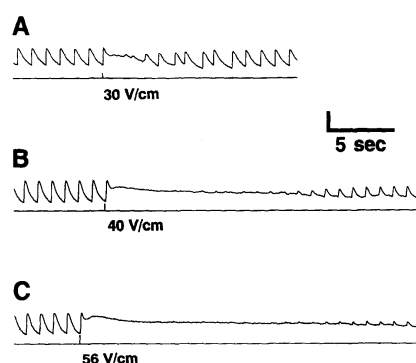


**Figura 21** Risposta elettrica di cardiomiocita sottoposta a stimolazione ad alta intensità. [41] In figura A sono rappresentati gli accorciamenti della cellula, ovvero le attività spontanee dopo l'applicazione di shock di 4,8,20 volte l'intensità del campo elettrico soglia, a seguito di una stimolazione a 5Hz. Lo shock letale di 20x provoca una ipercontrazione, distinguibile dall'elevato accorciamento della cellula. In figura B vengono riportati le variazioni di concentrazione di calcio intracellulare: i primi spike sono legati alla stimolazione a 5Hz, l'assenza di calcio intracellulare durante l'applicazione dello shock ad alta intensità è dovuta al fatto che la cellula è stata perfusa con soluzione  $Ca^{2+}$ -free, ma non appena viene aumentato la quantità di calcio extracellulare ( $[Ca^{2+}]_o$ ) si ha un elevato aumento di calcio intracellulare che corrisponde all'ipercontrazione letale.

Evidenze sperimentali dichiarano che la morte della cellula a seguito di shock elettrico è caratterizzata da un'elevata perdita di materiale cellulare e da un'ipercontrazione, riconoscibile in figura 21 [41,47,48,55-57].

Un'altra conseguenza dell'elevata conduttività di membrana è la nascita di un flusso ionico di calcio verso lo spazio intracellulare, guidato probabilmente da un gradiente elettrochimico, che porta ad un accumulo di calcio.

Come è noto dalla fisiologia delle cellule cardiache, un'elevata concentrazione di calcio intracellulare innesca la contrazione muscolare; per questo motivo ad alte intensità di shock elettrico si genera una ipercontrazione letale (Fig. 21-22).



**Figura 22** *Variazione di concentrazione di calcio in seguito a shock elettrico con forma d'onda bifasica rettangolare asimmetrica di intensità crescente. Immagine ottenuta tramite mappatura ottica di cellule isolate trattate con fluorescenti calcio-sensibili. [53]*

In figura 22 è riportato l'aumento di concentrazione di calcio monitorato utilizzando mappatura ottica con fluorescenti [53].

A seguito dell'applicazione di shock con intensità crescente, si può osservare un aumento del tempo di recupero con il crescere dell'intensità dello shock.

L'entrata eccessiva di calcio non solo è responsabile dell'ipercontrazione che porta alla morte della cellula, ma nei casi in cui non si raggiunge l'intensità di shock letale, è la causa della rigenerazione di aritmie post-shock, in quanto provoca contrazioni aritmiche in seguito all'applicazione dello shock. Inoltre un'alterazione eccessiva di contenuto ionico di calcio genera ulteriori alterazioni nello spazio intracellulare (come ad esempio

aggregazione proteica o proteolisi) che contribuiscono a generare un danno cellulare che può diventare irreversibile.

L'aumento di frequenza media di attività spontanea che risulta da questo studio è imputabile a una lesione irreversibile che si accumula con l'aumento dell'intensità di shock. A conferma di ciò, è stato osservato durante gli esperimenti che negli ultimi step le cellule sottoposte a stimolazione bifasica rettangolare maggiormente rispetto le cellule sottoposte a shock esponenziali troncati, diminuivano in lunghezza a seguito di shock ad alta intensità: indice del fatto che l'accumulo di calcio era stato talmente elevato da generare contratture irreversibili alle estremità del miocita.

Per questo motivo la minore lesività della stimolazione con forma d'onda bifasica esponenziale troncata può essere interpretata, in base a quanto trovato in letteratura, ad una minore generazione di elettroporazione.

## 6. Conclusioni e sviluppi futuri

L'obiettivo di questo studio era valutare gli effetti delle due forme d'onda di stimolazione, bifasica rettangolare e bifasica esponenziale troncata, in termini di minor lesività e maggior efficacia.

Il protocollo di stimolazione è stato scelto in modo tale da analizzare la relazione tra intensità di shock crescente e frequenza media di attività spontanea generata in seguito alla stimolazione.

L'attività spontanea della cellula stimolata viene considerata come indicativa di un'alterazione dell'equilibrio elettrofisiologico dovuta alla lesione che uno shock ad alta intensità può creare alla membrana cellulare, ovvero l'elettroporazione. Con una stimolazione ad intensità crescente si è voluto valutare l'accumulo di danno che si genera a seguito di ogni shock elettrico.

È stata costruita infine una curva dose-risposta per ogni tipologia di forma d'onda di stimolazione con lo scopo di confrontare la lesività (risposta) generata in seguito all'applicazione dello shock ad alta intensità (dose).

Tuttavia i risultati statistici non hanno mostrato una differenza statisticamente significativa tra la stimolazione con onda bifasica rettangolare e la stimolazione con forma d'onda bifasica esponenziale troncata, a causa probabilmente del numero scarso di cellule studiate. Il suggerimento proposto per un eventuale futura esecuzione è quello di effettuare questo protocollo sperimentale su un numero maggiore di campioni cellulare e di valutare ulteriori parametri per ottenere un'indicazione più rigorosa sulla efficacia della stimolazione.

La proposta per uno sviluppo futuro è pertanto di esaminare oltre alla frequenza di attività spontanea generata, anche il tempo necessario alla cellula per il recupero del proprio stato di quiescenza, che corrisponde alla frequenza di attività spontanea basale della cellula che non ha ancora ricevuto alcuno shock elettrico.

Difatti l'elettroporazione è un fenomeno che può essere reversibile in base all'entità della lesione creatasi, e il tempo di recupero aumenta all'aumentare della lesione generata della membrana cellulare, ovvero dal numero di pori, dalla dimensione di essi e dall'estensione della membrana danneggiata dall'elettroporazione.

Un'ulteriore proposta per investigare l'entità dell'elettroporazione e le conseguenze che scaturiscono da essa è quella di abbinare il protocollo sperimentale con tecniche di mappatura ottica con coloranti sensibili al calcio e agli altri ioni che governano l'attività elettrica nel miocita, ovvero sodio e potassio, in modo tale che analizzare più dettagliatamente il disequilibrio ionico della cellula che deriva dall'elettroporazione.

## 7. Bibliografia

1. Bern R. M., Levy M. N., Koeppen B. M., Stanton B. A. *Fisiologia*. Casa Editrice Ambrosiana. 2009; 300-353
2. Pfeiffer E. R., Tangney J. R., Omens J. H., McCulloch A. D. *Biomechanics of Cardiac Electromechanical Coupling and Mechanoelectric Feedback*. Journal of Biomechanical Engineering. 2014; 136:1 -11.
3. Grines, C. L., Bashore, T. M., Boudoulas, H., Olson, S., Shafer, P., Wooley, C. F., *Functional Abnormalities in Isolated Left Bundle Branch Block. The Effect of Interventricular Asynchrony*, Circulation, 1989;79(4):845–853.
4. Uusimaa, P., Risteli, J., Niemelä, M., Lumme, J., Ikäheimo, M., Jounela, A., Peukhurinen, K., *Collagen Scar Formation After Acute Myocardial Infarction: Relationships to Infarct Size, Left Ventricular Function, and Coronary Artery Patency*, Circulation, 1997; 96: 2565–2572.
5. Ghio, S., Constantin, C., Klersy, C., Serio, A., Fontana, A., Campana, C., Tavazzi, L., *Interventricular and Intraventricular Dyssynchrony Are Common in Heart Failure Patients, Regardless of QRS Duration*, Eur. Heart J., 2004; 25(7): 571–578.
6. Arevalo, H, Rodriguez, B, Trayanova, N. *Arrhythmogenesis in the heart: multiscale modeling of the effects of defibrillation shocks and the role of electrophysiological heterogeneity*. Chaos. 2007; 17: 015103.
7. **American heart association**  
[http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Arrhythmia/AboutArrhythmia/About-Arrhythmia\\_UCM\\_002010\\_Article.jsp#.Vugl8seONrM](http://www.heart.org/HEARTORG/Conditions/Arrhythmia/AboutArrhythmia/About-Arrhythmia_UCM_002010_Article.jsp#.Vugl8seONrM)
8. Prevost JL, Battelli F. *Sur quelques effets des décharges électriques sur le coeur des Mammifères*. C R Acad Sci. 1899; 129: 1267–68.

9. Dossdall D. J., Fast V. G., Ideker R. E. *Mechanisms of Defibrillation*. Annu Rev Biomed Eng. 2010; 12: 233-258.
10. <http://www.insalutenews.it/in-salute/morte-cardiaca-improvvisa-50mila-morti-allanno-in-italia-da-londra-le-nuove-linee-guida-2015-della-societa-europea-di-cardiologia/>
11. Sowell B., Fast V.G., *Ionic Mechanism of Shock-Induced Arrhythmias: Role of Intracellular Calcium*. Hearst Rhythm. 2012: 1-16.
12. Fedorov VV, Nikolski VP, Efimov IR. *Effect of electroporation on cardiac electrophysiology*. Methods Mol Biol. 2008; 423:433–448.
13. Ivorra A. *Tissue Electroporation as a Bioelectric Phenomenon: Basic Concepts* B. Rubinsky-Irreversible Electroporation, BIOMED, 2010: 23–61.
14. Fast VG, Cheek ER. *Optical mapping of arrhythmias induced by strong electrical shocks in myocyte cultures*. Circ Res. 2002; 90: 664–670.
15. Krauthamer V, Jones JL. *Calcium dynamics in cultured heart cells exposed to defibrillator-type electric shocks*. Life Sciences. 1997; 60: 1977–1985.
16. <http://superagatoide.altervista.org/cardiaco.html>
17. Redaelli A., Montevicchi F., *Biomeccanica: analisi multiscala di tessuti biologici*. Collana di Ingegneria Biomedica 13. Pàtron Editore, 2007. 259-261
18. <http://www.soccorritori.ch/?p=792>
19. Mainardi L., Ravazzani P., *Principi di bioelettricità e bioelettromagnetismo*. Collana di Ingegneria Biomedica 18, Pàtron editore, 2011. 91-95

20. [http://www.med.unipg.it/cc1/Materiale%20Didattico/Fisiologia%20\(Pettorossi\)/2011/Eccitabilitacuore2011.pdf](http://www.med.unipg.it/cc1/Materiale%20Didattico/Fisiologia%20(Pettorossi)/2011/Eccitabilitacuore2011.pdf)
21. Bers D. M. *Cardiac excitation-contraction coupling*. Nature, 2002; 415: 198-205.
22. Winslow R. L., Walker M. A., Greenstein J. L., *Modeling calcium regulation of contraction, energetics, signaling, and transcription in the cardiac myocyte*. WIREs System Biology and Medicine. 2015; 8: 37-67.
23. Scriven D. R. L., Dan P., Moore E. D. W. *Distribution of proteins implicated in excitation-contraction coupling in rat ventricular myocytes*. Biophys. J. 2000; 79: 2682–2691.
24. Bers D. M. *Excitation–Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force* Kluwer Academic Publishers, 2001.
25. Zühlke R. D., Pitt G. S., Deisseroth K., Tsien R. W., Reuter H. *Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels*. Nature 1999; 399: 159–162.
26. Fruen B. R., Bardy J. M., Byrem T. M., Strasburg G. M., Louis C. F. *Differential  $Ca^{2+}$  sensitivity of skeletal and cardiac muscle ryanodine receptors in the presence of calmodulin*. Am. J. Physiol. 2000; 279: C724–C733.
27. Sham J. S., Song L. S., Chen Y., Deng L. H., Stern M. D., Lakatta E. G., Cheng H. *Termination of  $Ca^{2+}$  release by a local inactivation of ryanodine receptors in cardiac myocytes*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 1998; 95: 15096–15101.
28. Bassani J. W. M., Yuan W., Bers D. M. *Fractional SR Ca release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes*. Am. J. Physiol. 268, 1995; C1313–C1319.

29. Reeves J. P., Hale C. C. *The stoichiometry of the cardiac sodium-calcium exchange system*. J. Biol. Chem. 1984; 259:7733 – 7739.
30. Bassani R. A., Bassani J. W., Bers D. M. *Mitochondrial and sarcolemmal Ca<sup>2+</sup> transport reduce [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> during caffeine contractures in rabbit cardiac myocytes*. J. Physiol. 1992; 453: 591–608.
31. Stern M. D. *Theory of excitation-contraction coupling in cardiac muscle*. Biophys. J., 1992; 63: 497–517.
32. Sobie E. A., Dilly K. W., dos Santos C. J., Lederer W. J., Jafri M. S. *Termination of cardiac Ca(2+) sparks: an investigative mathematical model of calcium-induced calcium release*. Biophys. J. 2002; 83:59–78.
33. Walker M. A., Williams G. S., Kohl T., Lehnart S. E., Jafri M. S., Greenstein J. L., Lederer W. J., Winslow R. L. *Super-resolution modeling of calcium release in the heart*. Biophys. J. 2014; 107: 3018 – 3029.
34. Cannell M. B., Kong C. H., Imtiaz M. S., Laver D. R. *Control of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release by stochastic RyR gating within a 3D model of the cardiac dyad and importance of induction decay for CICR termination*. Biophys. J. 2013; 104: 2149–2159.
35. Brittsan A. G., Kranias E. G. *Phospholamban and cardiac contractile function*. J. Mol. Cell. Cardiol. 2000; 32: 2131–2139.
36. Mainardi L., Ravazzani P., *Principi di bioelettricità e bioelettromagnetismo*. Collana di Ingegneria Biomedica 18, Pàtron editore, 2011. 113-119.
37. Klee M., Plonsey R. *Stimulation of spheroidal cells-the role of cell shape*. IEEE Trans. Biomed. Eng. 1976 **23**, 347–354

38. Knisley S. B., Blitchington T. F., Hill B. C., Grant A. O., Smith W. M., Pilkington T. C., Ideker R. E. *Optical measurements of transmembrane potential changes during electric field stimulation of ventricular cells*. Circ Res. 1993; 72:255–70.
39. Windisch H, Ahammer H, Schaffer P, et al. *Optical multisite monitoring of cell excitation phenomenon in isolated cardiomyocytes*. Pflug Arch. 1995; 430:508–18.
40. Gillis AM, Fast VG, Rohr S, Kleber AG. *Mechanism of ventricular defibrillation. The role of tissue geometry in the changes in transmembrane potential in patterned myocyte cultures*. Circulation. 2000; 101:2438–45.
41. Oliveira P. X. de, Bassani R. A., Bassani J. W. *Lethal effect of electric fields on isolated ventricular myocytes*. IEEE Trans. Biomed. Eng. 2008; 55: 2635–2642
42. Goulart J. T., Oliveira P. X., Bassani J. W. M., Bassani R. A. *The influence of cell dimensions on the vulnerability of ventricular myocytes to lethal injury by high-intensity electrical fields*. Rev. Bras. Eng. Bioméd. 2012; 28: 337–345.
43. Krassowska W., Neu J. C. *Response of a single cell to an external electric field*. Biophys. J. 1994; 66: 1768–76.
44. Yabe S., Smith W. M., Daubert J. P., Wolf P. D., Rollins D. L., Ideker R. E., *Conduction disturbances caused by high current density electric fields*, Circ. Res. 1990; 66: 1191–1203.
45. Fishler M. G., Vepa K. *Spatiotemporal effects of syncytial heterogeneities on cardiac far-field excitations during monophasic and biphasic shocks*. J. Cardiovasc. Electrophysiol. 1998; 9:1310– 24.
46. Tung L., Borderies J. R., *Analysis of electric field stimulation of single cardiac muscle cells*. Biophys. J. 1992; 63: 371-386

47. Tovar O., Tung L., *Electroporation and recovery of cardiac cell membrane with rectangular voltage pulses*, Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 1992; 263: H1128–H1136.
48. Tung L., *Detrimental effects of electrical fields on cardiac muscle*, Proc. IEEE 1996; 84(3): 366–378.
49. Teissie J., Rols M.P. *An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation*. Biophys. J. 1993; 65: 409–413.
50. Jones J. L., Lepeschkin E., Jones R. E., Rush S., “*Response of cultured myocardial cells to countershock-type electric field stimulation*,” Amer. J. Physiol., 1978; 235: 214-222.
51. Fleckenstein A., Janke J., Doring H. J., Leder O., “*Myocardial fiber necrosis due to intracellular Ca overload-A new principle in cardiac pathophysiology*,” Recent Adv. Cardiac. Struc. Metab. 1974; 4: 563-580.
52. Tung L., Sliz N., Mulligan M. R. *Influence of electrical axis of stimulation on excitation of cardiac muscle cells*. Circ. Res. 1991; 69: 722–30.
53. Krauthamer V., Jones J. L., *Calcium dynamics in cultured heart cells exposed to defibrillator-type electric shock*. Life Sciences, 1997; 60(22):1977-1985.
54. Delmar M., Ibarra J., Davidenko J., Lorente P., Jalife J. *Dynamics of the background outward current of single guinea pig ventricular myocytes. Ionic mechanism of hysteresis in cardiac cells*. Circ. Res. 1991; 69: 1316-1326.
55. Penna L. B., Bassani R. A. *Increased spontaneous activity and reduced inotropic response to catecholamines in ventricular myocytes from footshock-stressed rats*. Stress. 2010; 13: 73-82.

56. Bassani R. A., Lima K. A., Gomes P. A. P., Oliveira P. X., Bassani J. W. M., *Combining stimulus direction and waveform for optimization of threshold stimulation of isolated ventricular myocytes*, *Physiol. Meas* 2006; 27: 851–863.
57. P. A. P. Gomes, R. A. Bassani, J. W. M. Bassani, *Electric field stimulation of cardiac myocytes during postnatal development*, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2001; 48(6): 630–635.
58. Krasoowska W., Filev P.D., *Modeling electroporation in a single cell*. *Biophys. J.* 2007; 92: 404–417.