

VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ
FAKULTA STROJNÍHO INŽENÝRSTVÍ
ÚSTAV MECHANIKY TĚLES

Ing. Michal Pásek

**Výpočtové modelování fyziologických procesů na srdečních buňkách
(Blokáda membránových kanálů)**

**Computer modelling of physiological processes in cardiac cells
(Block of membrane channels)**

PhD Theses

pro obor

INŽENÝRSKÁ MECHANIKA

Školitelé:

**Prof. Ing. Přemysl Janíček, DrSc.
Doc. RNDr. Ing. Jiří Šimurda, CSc.**

Oponenti:

**Prof. Ing. František Pochylý, CSc.
Prof. Ing. František Maršík, DrSc.
Doc. MUDr. Josef Šumbera, CSc.**

Datum obhajoby: 27. 11. 2000

© 2001 M. Pásek
ISBN 80-214-1831-1

Obsah

1. ÚVOD	5
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	5
2.1 Současné modely blokády membránových kanálů	6
2.1.1 Modely blokády I_{Na} -kanálů propafenonem	6
2.1.2 Modely blokády I_{Kto} -kanálů 4-aminopyridinem	7
3. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE	7
4. EXPERIMENTÁLNÍ ZÁKLAD	8
4.1 Metodika	8
4.2 Výsledky experimentálních prací	8
4.2.1 Blokáda I_{Na} -kanálů propafenonem během a po ukončení depolarizace	9
4.2.2 Blokáda I_{Kto} -kanálů 4-aminopyridinem během a po ukončení depolarizace	10
5. METODIKA SESTAVENÍ VÝPOČTOVÝCH MODELŮ	11
6. VÝPOČTOVÉ MODELOVÁNÍ	12
6.1 Model buňky pracovní části myokardu	12
6.2 Simulace	13
7. VÝPOČTOVÉ MODELOVÁNÍ BLOKÁDY MEMBRÁNOVÝCH KANÁLŮ	15
7.1 Blokáda I_{Na} -kanálů propafenonem	15
7.1.1 Hypotetický výklad procesu blokády	15
7.1.2 Sestavení matematického modelu	16
7.1.3 Simulace průběhu blokády během a po ukončení depolarizace	18
7.1.3 Simulace antiarytmických účinků propafenonu	19
7.2 Blokáda I_{Kto} -kanálů 4-aminopyridinem	20
7.2.1 Hypotetický výklad procesu blokády	20
7.2.2 Sestavení matematického modelu	22
7.2.3 Simulace průběhu blokády během a po ukončení depolarizace	24
7.2.4 Simulace účinku 4-AP na elektrickou aktivitu srdeční buňky	25
8. ZÁVĚR	26
9. LITERATURA	27
AUTOROVY PUBLIKACE SOUVISEJÍCÍ S DISERTAČNÍ PRACÍ	29
SUMMARY	30
ŽIVOTOPIS	32

1. ÚVOD

Srdeční onemocnění jsou dnes jednou z nejčastějších příčin úmrtí a významným faktorem zkracujícím délku života.

Pro zajištění jejich účinné a selektivní léčby je nezbytné hledat hlavní příčiny poruch srdeční funkce především na buněčné úrovni, kde se odehrává série procesů započatých vznikem elektrického vzruchu a končících buněčnou kontrakcí. Právě zde dochází za určitých podmínek k nepříznivému ovlivnění buněčných dějů, které svými důsledky narušuje základní buněčné funkce a finálně i funkci celého srdečního svalu.

Důležitou součástí výzkumu podstaty těchto procesů stejně jako mechanismu účinku farmak je výpočtové modelování. Přispívá k vysvětlení experimentálně získaných výsledků, ověření navržených hypotéz a v neposlední řadě také k pochopení komplexnosti a vzájemných vztahů mezi jednotlivými ději, které na srdečních buňkách probíhají.

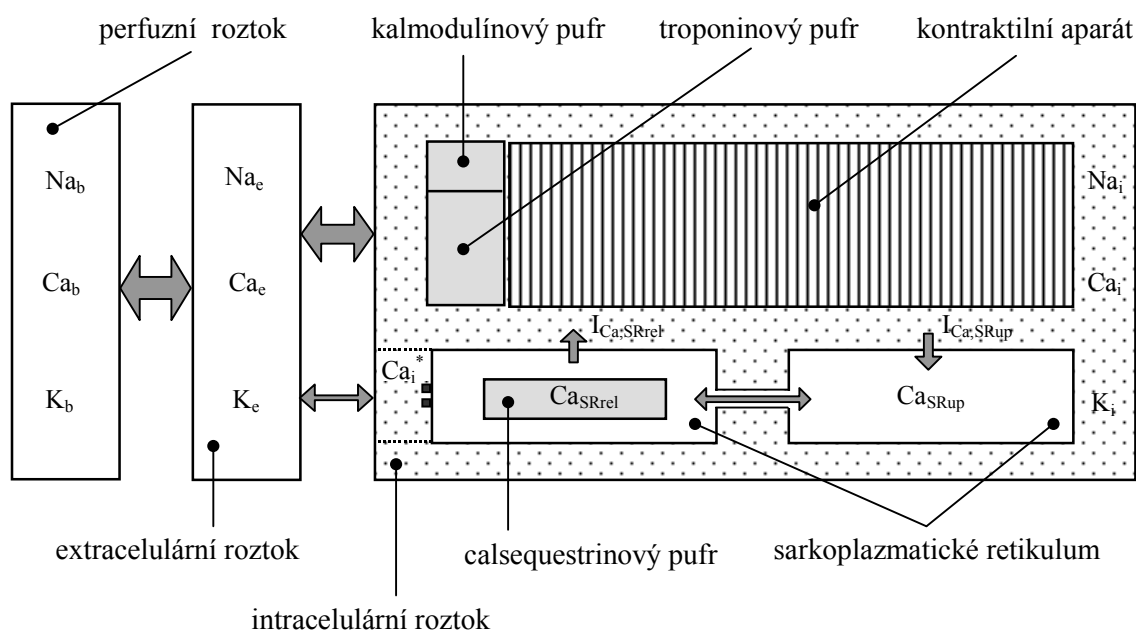
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Charakteristikou současných modelů funkce srdečních buněk je snaha o detailní popis všech mechanismů, které se přímo či nepřímo podílejí na jejich elektrické a mechanické aktivitě. Podstatnými strukturálními prvky buňky z hlediska tohoto popisu jsou:

- **sarkolema** (buněčná membrána) oddělující vnitřní prostředí buňky od okolního mezibuněčného prostoru a zajišťující transportní funkce. Je opatřena *transverzálními tubuly* zprostředkovávajícími přenos vzruchu do nitra buňky.
- **cytoplazma** obsahující intracelulární roztok biologicky aktivních látek (ionty, organické kyseliny, bílkoviny aj.).
- **svazek myofibril** obsahující vlákna myozinových a aktinových makromolekul, které zprostředkovávají buněčnou kontrakci.
- **sarkoplazmatické retikulum (SR)** skladující ionty Ca^{2+} pro buněčnou kontrakci.
- **mitochondrie** vytvářející adenosintrifosfát (*ATP*), který je nezbytný jak pro kontrakci a relaxaci buňky tak i pro funkci aktivních transportních mechanismů.

Mezi průkopnické práce, které jsou základem většiny dnes vytvářených modelů, patří především kvantitativní popis elektrických dějů na buňkách Purkyňových vláken (DiFrancesco a Noble [6]) a popis vazby mezi excitací a kontrakcí u síňových buněk králíka (Hilgemann a Noble [9]). Zdokonalování těchto modelů je úzce spojeno zejména s přesnějším kvantitativním vyjádřením buněčných mechanismů řídících transport iontů Ca^{2+} a jejich interakci s bílkovinami kontraktálního aparátu. Ukazuje se také nutnost dalšího vymezení buněčných kompartmentů, ve kterých dochází k významným iontově-koncentračním změnám ovlivňujícím řetězec

dějů zakončených buněčnou kontrakcí. Příklad schematické reprezentace modelu buňky srdečního svalu, který vystihuje současnou úroveň kompartmentizace, je ilustrován na obr. 1.



Obr. 1 Schematická reprezentace současných modelů srdeční buňky

V oblasti výzkumu účinku farmak na funkci srdečních buněk má nepostradatelný význam také sestavování matematických modelů popisujících interakce specifických látek s membránovými transportními bílkovinami. Velkou skupinou těchto látek využívaných při léčbě srdečních arytmií jsou blokátory membránových kanálů (propafenon, verapamil, trimekain atd.).

2.1 Současné modely blokády membránových kanálů

Matematické modely blokády membránových kanálů jsou dnes sestavovány na základě kinetických schémat, které jsou odvozeny z experimentálních dat a vystihují jednotlivé předpokládané stavy, kterými kanály při interakci s blokátory procházejí. Vzhledem k zaměření této práce je v následujících podkapitolách věnována pozornost výhradně analýze současného stavu modelů popisujících blokádu I_{Na} -kanálů propafenonem a blokádu I_{Kto} -kanálů 4-aminopyridinem.

2.1.1 Modely blokády I_{Na} -kanálů propafenonem

Propafenon je látka s antiarytmickými účinky, která u srdečních buněk blokuje sodíkové kanály zprostředkovávající membránový depolarizační proud I_{Na} . Podle klasifikace navržené autory Sicilského Gambitu v roce 1992 patří mezi blokátory, které se k I_{Na} -kanálu vážou v jeho otevřeném stavu a uvolňují v jeho zavřeném stavu. Přestože výzkum interakce propafenonu se sodíkovými kanály je předmětem řady publikovaných zahraničních prací [11, 14, 15, 16, 22], nebyla doposud podána

jednoznačná a plně přijatelná interpretace mechanismu jeho účinku zakončená kvantitativním popisem.

2.1.2 Modely blokády $I_{K_{to}}$ -kanálů 4-aminopyridinem

4-aminopyridin (*4-AP*) je organická látka, která selektivně blokuje draslíkové kanály zprostředkovávající membránový repolarizační proud $I_{K_{to}}$. V důsledku potlačení tohoto proudu dochází k prodloužení tzv. refrakterní fáze buňky, během které je podstatně snížena citlivost buněčné membrány na vnější podráždění.

Současnou interpretaci mechanismu této blokády lze ve stručnosti shrnout do následujících bodů:

- Blokáda narůstá při klidovém membránovém napětí a to v důsledku vysoké afinity *4-AP* k receptorům plně zavřených $I_{K_{to}}$ -kanálů. Její pozvolný pokles po depolarizaci membrány je naopak podmíněn snižováním vazebné afinity pro *4-AP* během kanálové aktivace [4, 5].
- Blokáda v otevřeném stavu kanálu je nevýznamná [4, 5].
- Blokáda a inaktivace kanálu se vzájemně vylučují [4, 5].

Vzhledem k tomu, že však tato navržená interpretace blokády a z ní vycházející modely nepodávají uspokojivé vysvětlení všech našich experimentálních výsledků byla navržena alternativní hypotéza blokády, která je základem nového matematického modelu představeného v kapitole 7.2.

3. CÍL DISERTAČNÍ PRÁCE

V návaznosti na dostupné experimentální údaje z našich a zahraničních publikací (citováno v textu) je hlavním cílem této práce:

1. Sestavení výpočtových modelů s matematickým popisem procesů probíhajících na buňkách srdeční převodní soustavy a pracovní části myokardu savců. S jejich využitím jsou v práci provedeny simulace charakterizující příčiny vzniku a průběh membránových proudů, akčního napětí, iontově-koncentračních změn (v buněčných a mimobuněčných kompartmentech), buněčné kontrakce a v neposlední řadě i restitučních procesů následujících po každé buněčné excitaci.
2. Sestavení matematického modelu funkce sodíkového kanálu (zkráceně I_{Na} -kanálu) blokováného propafenonem a modelu funkce draslíkového kanálu pro přechodný proud z buňky (zkráceně $I_{K_{to}}$ -kanálu) blokováného 4-aminopyridinem. Ověření správnosti navržených modelů je provedeno na základě srovnání výsledků výpočtového modelování s výsledky experimentů. V závěrečné fázi jsou provedeny simulace charakterizující účinek uvedených blokad na potlačení srdečních arytmií.

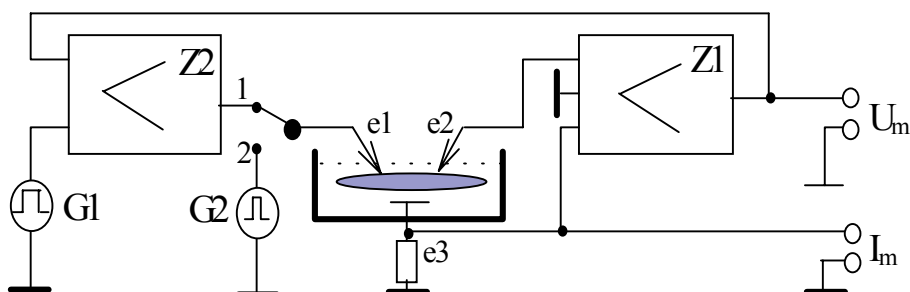
4. EXPERIMENTÁLNÍ ZÁKLAD

Základem výzkumu funkce srdečního svalu na buněčné úrovni jsou experimentální práce zkoumající příčiny odezev buněk (změny membránového napětí, membránových proudů, iontových koncentrací a kontrakce buňky) na elektrické podráždění za fyziologických a farmakologicky ovlivněných podmínek.

4.1 Metodika

Mezi základní metody, které se používají při měření napětí a proudů na membránách izolovaných srdečních buněk, patří metoda vnuceného napětí a metoda vnuceného proudu. Hlavním problémem při měření membránového napětí je získání elektrického kontaktu s intracelulárním prostorem bez funkčního poškození buňky. Tento proces se uskutečňuje prostřednictvím speciálních mikroelektrod (e_1 , e_2 viz obr. 2) naplněných vhodným elektrolytem, které se z jedné strany kuželovitě zužují až na průměr řádově 100 nm .

Obvykle se membrána připojuje ke zdroji pravoúhlých (méně často pilových) napěťových impulsů a registrují se proudové odezvy (*metoda vnuceného napětí*). Testují-li se naopak vlastnosti membrány impulsy z proudového zdroje za současného sledování odezvy membránového napětí, jedná se o *metodu vnuceného proudu*. Možné uspořádání měřicího obvodu pro získání experimentálních dat ilustruje obr. 2.



Obr. 2 El. obvod pro měření proudové (poloha př. 1) a napěťové (poloha př. 2) odezvy

4.2 Výsledky experimentálních prací

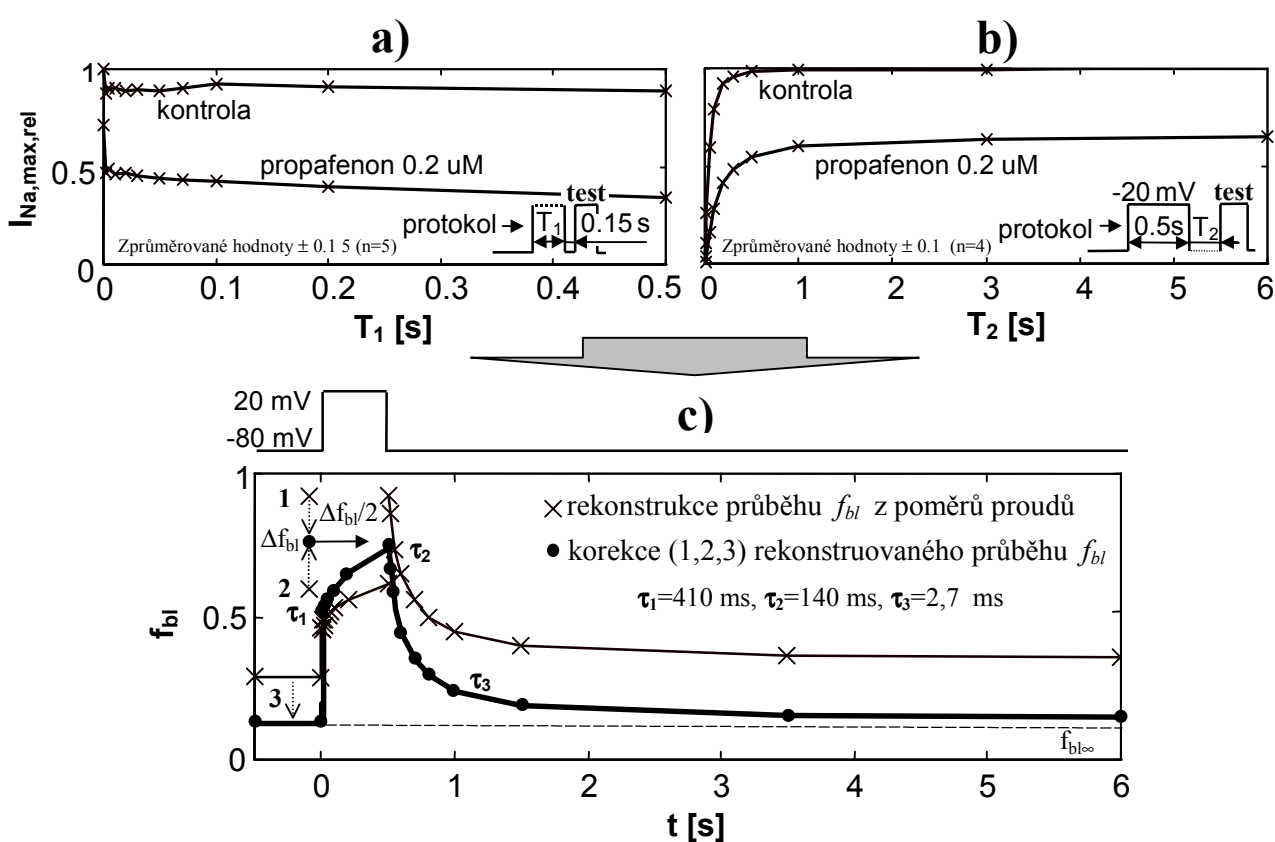
V této kapitole jsou zobrazeny výsledky experimentálních prací nezbytné pro sestavení matematického modelu funkce I_{Na} -kanálu blokováného propafenonem a modelu funkce I_{Kto} -kanálu blokováného 4-aminopyridinem. Jedná se o průběhy vystihující normalizované maximální velikosti membránových proudů I_{Na} a I_{Kto} dosažené během testovacích impulsů speciálně navržených stimulačních protokolů v podmínkách absence (kontrola) a přítomnosti příslušného blokátoru. Z poměrů hodnot těchto průběhů (blokátor/kontrola) lze pak vyjádřit přibližnou úroveň blokady uvedených kanálů (frakci blokováných kanálů) během a po ukončení depolarizace buněčné membrány.

4.2.1 Blokáda I_{Na} -kanálů propafenonem během a po ukončení depolarizace

Blokáda I_{Na} -kanálů propafenonem byla experimentálně vyšetřována na izolovaných komorových buňkách laboratorních potkanů [25, 26]. Stimulační protokoly s intervaly T_1 a T_2 (obr. 3a,b) byly navrženy tak, aby vzájemné poměry proudů $I_{Na,max,rel(propafenon)}$ a $I_{Na,max,rel(kontrola)}$ (viz průběhy na obr. 3a,b) měřených během testovacích impulsů charakterizovaly velikost blokády I_{Na} -kanálů (za působení $0.2 \mu M$ propafenonu) během a po ukončení $0.5 s$ trvající depolarizace na hladině $-20 mV$. Výsledná rekonstrukce průběhu blokády (f_{bl}) daná vztahem:

$$f_{bl} = 1 - I_{Na,max,rel(propafenon)} / I_{Na,max,rel(kontrola)},$$

je společně s korekcí chyby této metody vykreslena na obr. 3c.



Obr. 3a,b,c Rekonstrukce průběhu blokády I_{Na} -kanálů propafenonem během a po ukončení $0.5 s$ trvající depolarizace

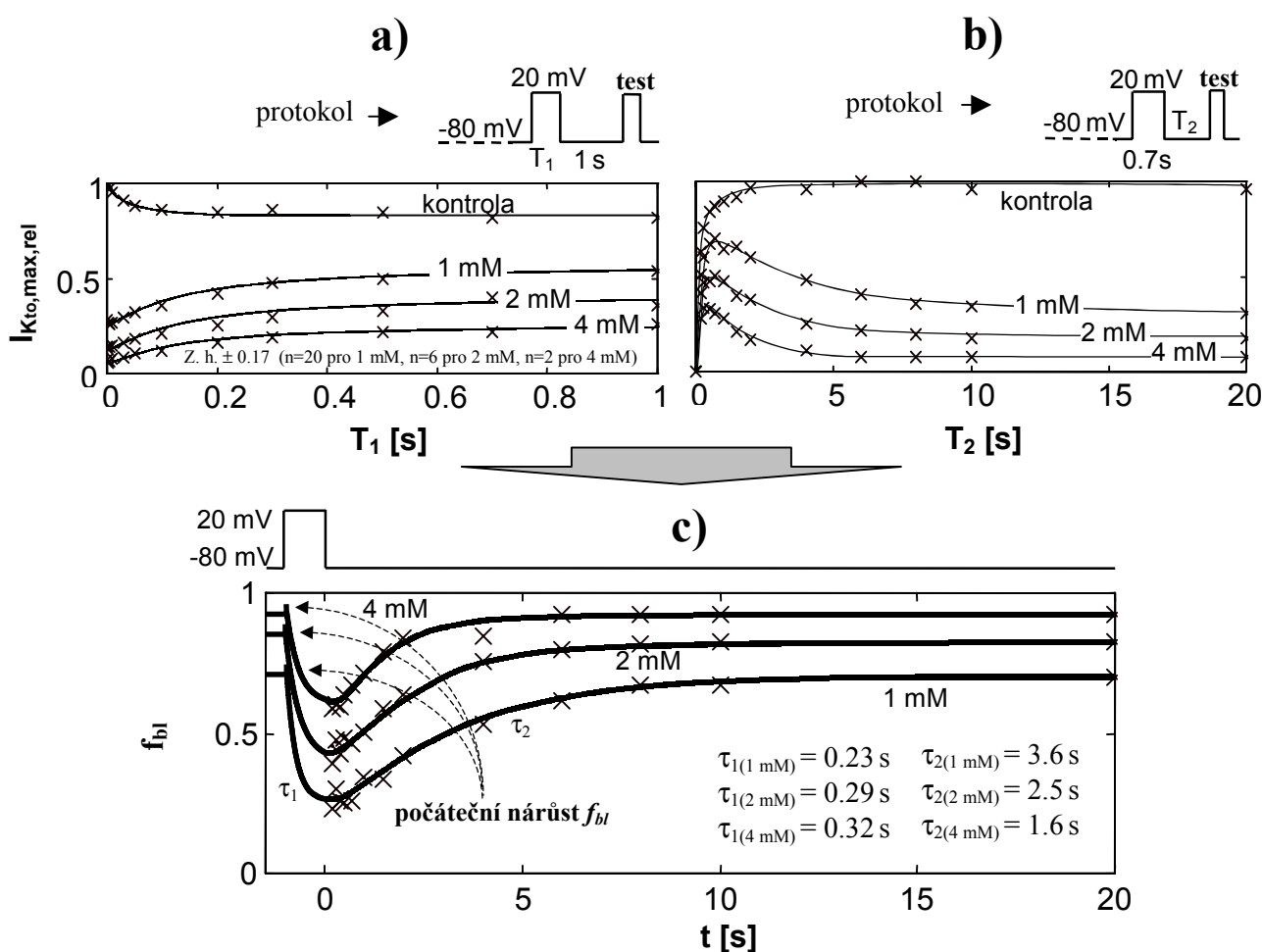
Z dané experimentální rekonstrukce časového průběhu blokády vyplývá, že:

- během depolarizace buněčné membrány (při napětí $-20 mV$) je afinita kanálových receptorů k vazbě s propafenonem vysoká, zatímco při klidovém napětí ($U_o = -80 mV$) nízká.
- rychlost vývoje blokády během depolarizace má dvoufázový charakter. Počáteční rychlý nárůst probíhá během otevření kanálů, zatímco následující exponenciální nárůst (s časovou konstantou τ_1) během inaktivace kanálů.

■ dvouexponenciální průběh zotavení z blokády po ukončení depolarizace (časové konstanty τ_2 a τ_3) patrně souvisí s různou rychlostí uvolnění propafenonu z vazebných míst inaktivovaných a neinaktivovaných blokováných kanálů.

4.2.2 Blokáda I_{Kto} -kanálů 4-aminopyridinem

Blokáda I_{Kto} -kanálů 4-aminopyridinem (4-AP) byla experimentálně vyšetřována na psích papilárních svalech a trabekulách [23, 24]. Rekonstrukce průběhu blokády (obr. 4c) byla v tomto případě provedena během a po ukončení I_s trvající depolarizace na hladině 20 mV a to na základě průběhů hodnot $I_{Kto,max,rel}$ (kontrola, 4-AP) měřených během testovacích pulsů (obr. 4a a 4b).



Obr. 4a,b,c Rekonstrukce průběhů blokády I_{Kto} -kanálů 4-aminopyridinem během a po ukončení I_s trvající depolarizace

Z provedené rekonstrukce časových průběhů blokády vyplývá, že:

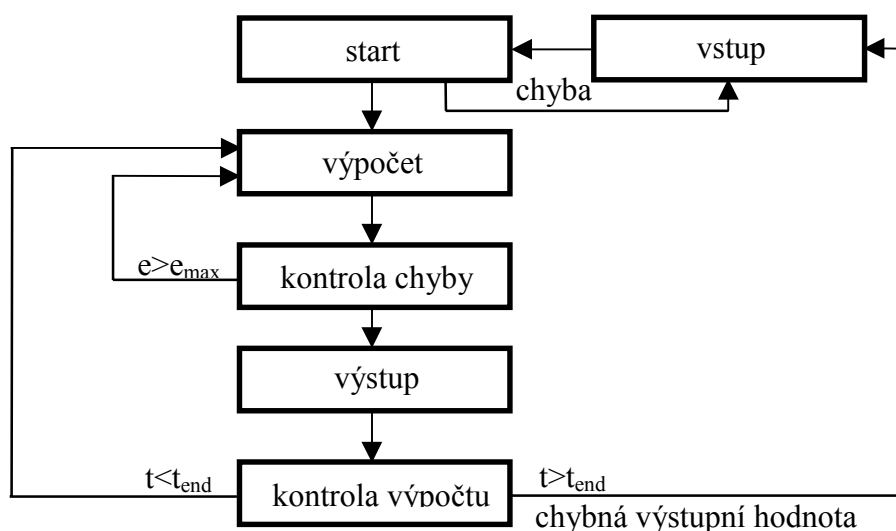
■ při klidovém napětí (-80 mV) je afinita receptorů I_{Kto} -kanálů k vazbě se 4-AP vysoká ($f_{bl\infty} = \sim 70\%$ pro 1 mM 4-AP, $\sim 85\%$ pro 2 mM 4-AP a $\sim 90\%$ pro 4 mM 4-AP) zatímco po depolarizaci (na napětí 20 mV) nízká. Tento efekt je charakteristický pro tzv. reverzní napěťovou závislost blokády.

- rychlost vývoje blokády při klidovém napětí je několikanásobně nižší ($\tau_{2(1\text{ mM})} = 3.6\text{ s}$, $\tau_{2(2\text{ mM})} = 2.5\text{ s}$, $\tau_{2(4\text{ mM})} = 1.6\text{ s}$) než rychlost zotavení z blokády během depolarizace ($\tau_{1(1\text{ mM})} = 0.23\text{ s}$, $\tau_{1(2\text{ mM})} = 0.29\text{ s}$, $\tau_{1(4\text{ mM})} = 0.32\text{ s}$).
- vzrůst blokády (o $\sim 3\%$) v počáteční fázi depolarizace naznačuje, že vazba 4-AP k receptorům I_{Kto} -kanálů probíhá nejen v jejich zavřených stavech, ale i v otevřeném stavu.
- pokles blokády při prodloužené depolarizaci nasvědčuje tomu, že afinita 4-AP k vazebným receptorům inaktivovaných I_{Kto} -kanálů je zanedbatelná, nebo že blokáda a inaktivace kanálu se vzájemně vylučují.

5. METODIKA SESTAVENÍ VÝPOČTOVÝCH MODELŮ

Numerické řešení matematického popisu elektrických, chemických a mechanických procesů na buňce myokardu je provedeno prostřednictvím výpočtového modelu (obr. 5) sestaveného v jazyce Turbo Pascal 7.0. Tento model je rozdělen do jednotlivých bloků, které slouží pro:

- zadání vstupních údajů,
- kontrolu vstupních údajů a spuštění výpočtu,
- řešení soustavy diferenciálních a algebraických rovnic,
- kontrolu chyby aproximace a změnu integračního kroku,
- kontrolu výstupních údajů a doby výpočtu,
- grafický výstup a výpis vypočtených hodnot.



Obr. 5 Bloková struktura výpočtového modelu

Řešení soustavy diferenciálních rovnic (matematický model) je provedeno dle Mersonovy formule, která umožňuje přímý odhad chyby aproximace, a tedy i změnu integračního kroku během výpočtu.

6. VÝPOČTOVÉ MODELOVÁNÍ

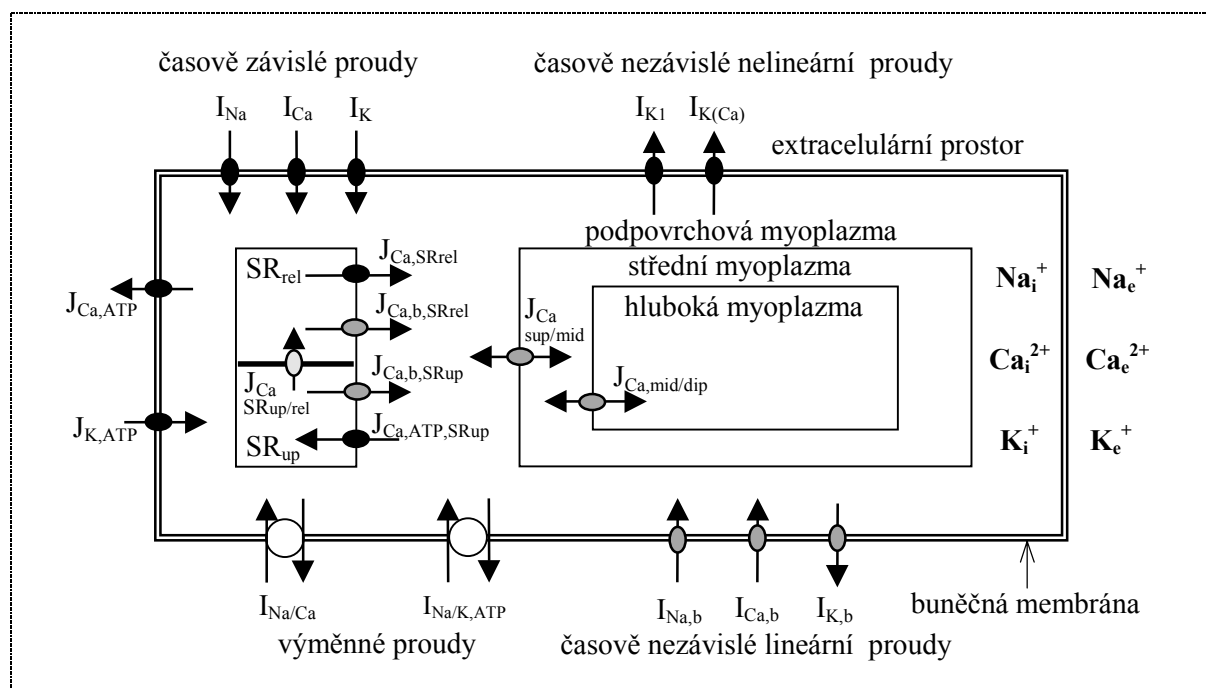
Výpočtové modelování fyziologických procesů na buňkách srdečního svalu je významným nástrojem přispívajícím k hlubšímu pochopení:

- **autonomních vlastností srdce (řízení srdeční funkce i nezávisle na CNS).**
- **mechanismu vzniku vzruchu na buňkách myokardu.**
- **vazby mezi excitací a kontrakcí.**

Za tímto účelem byly sestaveny matematické modely popisující elektrické, chemické a mechanické děje, které probíhají na buňkách srdeční převodní soustavy a na buňkách pracovní části myokardu. Matematické formulace jednotlivých buněčných mechanismů byly odvozeny z experimentálních výsledků v souladu teoriemi a hypotézami uvedenými v disertační práci. V následující podkapitole je stručně popsáno sestavení modelu pro případ buňky pracovní části myokardu, na kterém byly provedeny základní simulace buněčné funkce (kap.6.2).

6.1 Model buňky pracovní části myokardu

Cílem matematického popisu a simulace dějů na buňce pracovní části myokardu bylo přispět k objasnění základních fyziologických procesů, které vedou ke vzniku elektrického vzruchu a iontově - koncentračním změnám v jednotlivých buněčných kompartmentech. Matematický model byl sestaven na základě experimentálních prací na izolovaných srdečních buňkách morčat [7, 8, 12, 18, 19] s využitím kvantitativního popisu uvedeného v publikaci [20]. Schéma struktury matematického modelu je znázorněno na obr. 6.



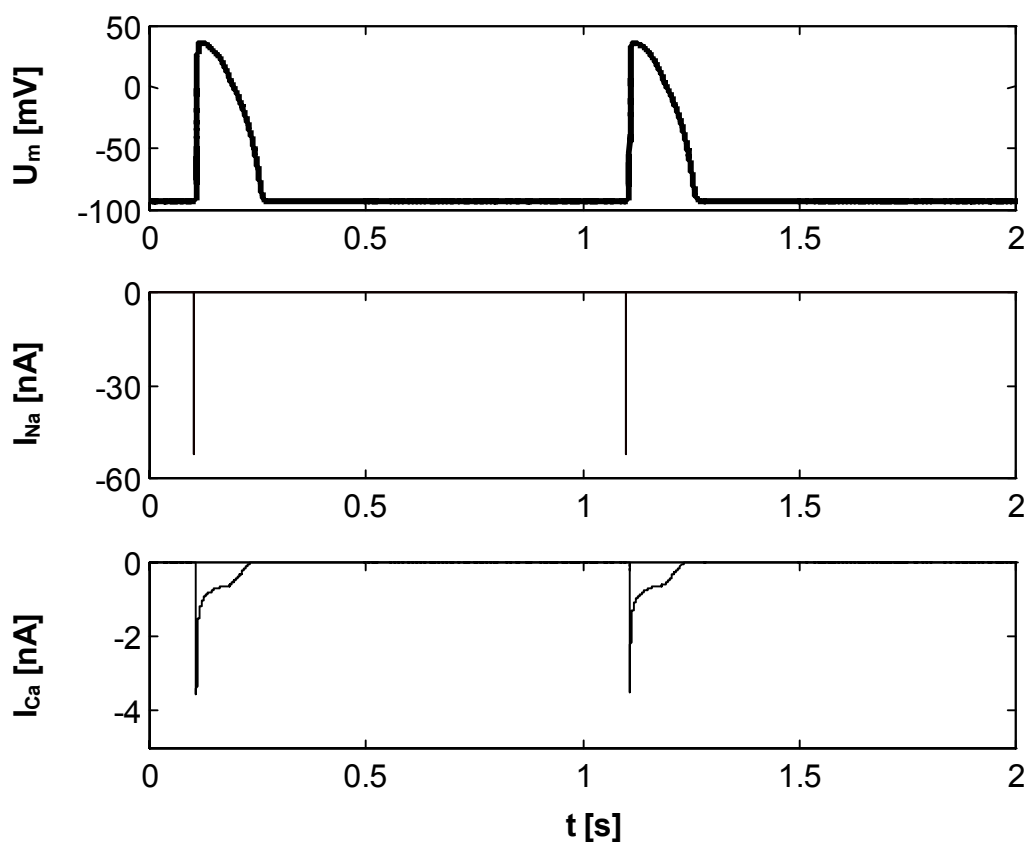
Obr. 6 Schéma struktury matematického modelu buňky pracovní části myokardu

6.2 Simulace

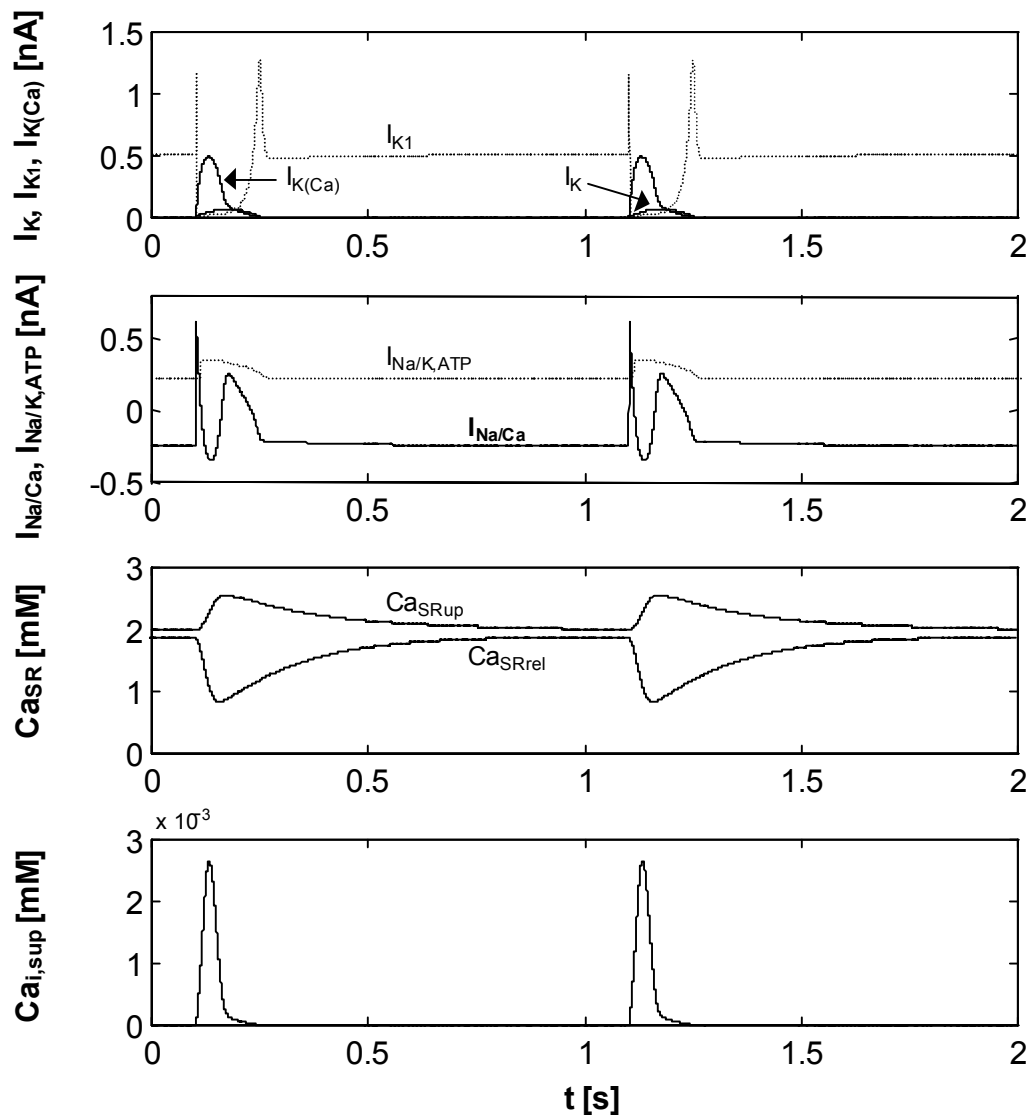
Následující grafy (obr. 7a,b) zobrazují výsledky simulací na matematickém modelu sestaveném podle obr. 6. Jedná se o veličiny, které se významně podílí na bioelektrické aktivitě uvedených buněk.

Seznam zobrazených veličin

U_m	membránové napětí
I_{Na}	sodíkový přechodný proud
I_{Ca}	vápníkový přechodný proud
I_K	draslíkový zpožděný proud
$I_{K(Ca)}$	draslíkový okamžitý proud (Ca-senzitivní)
I_{K1}	draslíkový okamžitý proud (Ca a K-senzitivní)
$I_{Na/Ca}$	sodíko-vápníkový výměnný proud
$I_{Na/K,ATP}$	sodíko-draslíkový výměnný proud
Ca_{SRup}	koncentrace Ca^{2+} v nabírací části SR
Ca_{SRrel}	koncentrace Ca^{2+} v uvolňovací části SR
$Ca_{i,sup}$	koncentrace Ca^{2+} v intracelulárním prostoru



Obr. 7a Simulace dějů na buňce pracovní části myokardu



Obr. 7b Simulace dějů na buňce pracovní části myokardu

Zhodnocení

- Elektrické podráždění membrány buňky myokardu aktivuje rychlý sodíkový proud I_{Na} , který je příčinou její okamžité depolarizace (viz U_m).
- Aktivace vápníkového proudu I_{Ca} v průběhu depolarizace spouští řetězec dějů vedoucí k přechodnému zvýšení intracelulární vápníkové koncentrace $Ca_{i,sup}$ (důsledek vyplavení iontů Ca^{2+} z uvolňovací části sarkoplazmatického retikula ($Ca_{SR,rel}$) a jejich opětovného vychytávání do nabírací části ($Ca_{SR,up}$)) a následně buněčné kontrakci.
- Návrat buněk do rovnovážného stavu charakteristického klidovým membránovým napětím je podmíněn repolarizačním účinkem draslíkových proudů ($I_{K(Ca)}$, I_K , I_{K1}). Rovnováha intracelulární koncentrace iontů Na^+ , Ca^+ a K^+ je zajišťována zejména výměnnými proudy $I_{Na/K,ATP}$ a $I_{Na/Ca}$.

7. Výpočtové modelování blokády membránových kanálů

7.1 Blokáda I_{Na} -kanálů propafenonem

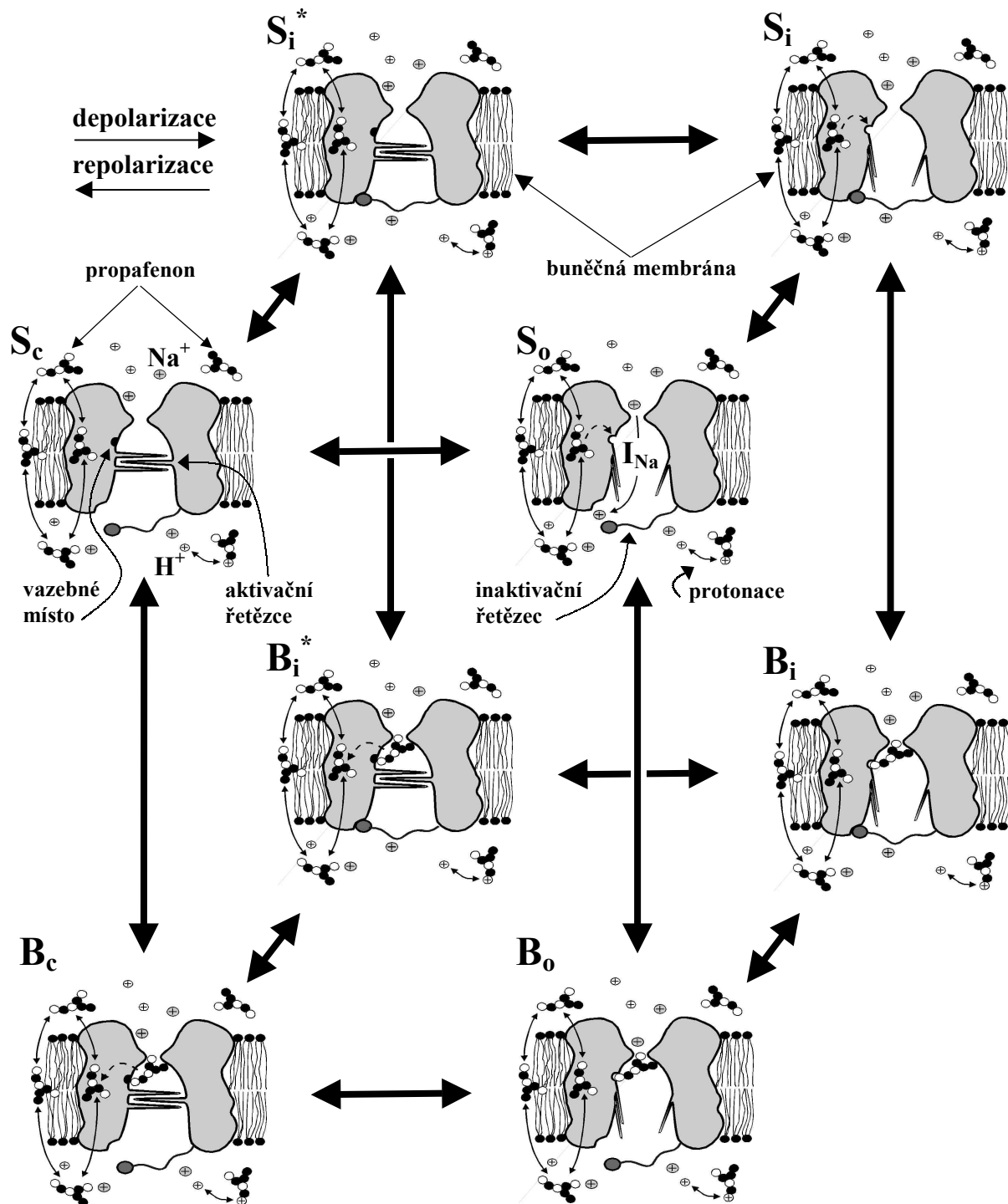
Cílem matematického popisu a simulace blokády I_{Na} -kanálů propafenonem [A2, A3, A8, A10] bylo přispět k detailnímu objasnění interakce propafenonu s vazebnými receptory I_{Na} -kanálů a ke kvantitativnímu vyjádření účinku této interakce na potlačení srdečních arytmií. Jako základ pro sestavení matematického modelu bylo využito experimentálních výsledků získaných v pokusech na srdečních buňkách laboratorních potkanů (kap. 4.2.1) a zahraniční publikace [2].

7.1.1 Hypotetický výklad procesu blokády

V souladu s uvedenými experimentálními výsledky v kap. 4.2.1 lze hypotézu procesu blokády (ilustrováno na obr. 8) shrnout do následujících bodů:

- Vazebné místo pro blokádu propafenonem se nachází uvnitř I_{Na} -kanálu, přičemž jeho afinita k propafenonu se mění v závislosti na konformačních změnách kanálu (hypotéza modulovaného receptoru) během aktivace (přechod $S_c \rightarrow S_o$) a inaktivace (přechod $S_o \rightarrow S_i$). Z experimentálních výsledků vyplývá, že v zavřených stavech (S_c, S_i^*) je tato afinita malá, zatímco v otevřeném (S_o) a otevřeném-inaktivovaném stavu (S_i) velká.
- Z dvoufázového vývoje blokády během depolarizace (obr. 3c) lze vyvodit, že rychlost blokády je největší v otevřeném stavu kanálu (S_o), zatímco během inaktivace (přechod $S_o \rightarrow S_i$) se zmenšuje. Hlavní proces vedoucí k blokádě kanálu v otevřeném stavu probíhá buď prostřednictvím elektroneutrálního propafenonu difundujícího přes membránu přímo k vazebnému místu uvnitř kanálu (přechod $S_o \rightarrow B_o$) a nebo prostřednictvím kladně nabitého (protonovaného) propafenonu přes otevřený kanál. Blokáda inaktivovaných kanálů je napěťově nezávislá.
- Dvoufázový pokles blokády po ukončení depolarizace (obr. 3c) naznačuje, že uvolnění propafenonu z vazebného místa probíhá nejprve větší rychlostí přímo ze zavřeného inaktivovaného stavu kanálu (přechod $B_i^* \rightarrow S_i^*$) a následně po zotavení z inaktivace (přechod $B_i^* \rightarrow B_c$) pomaleji ze zavřeného neinaktivovaného stavu (přechod $B_c \rightarrow S_c$).

Vzhledem k tomu, že doposud provedené (naše) experimentální práce [25] charakterizující blokádu I_{Na} -kanálů propafenonem byly provedeny jen pro jednu hladinu depolarizačního napětí (-20 mV – kap. 4.1.1), nebylo možné kvantifikovat případnou napěťovou závislost blokády. Z tohoto důvodu byl pro prvotní kvantitativní popis navržen model charakterizující výlučně elektroneutrální proces blokády přes buněčnou membránu.



Obr. 8 Schéma předpokládaných základních stavů I_{Na} -kanálu blokováného propafenonem

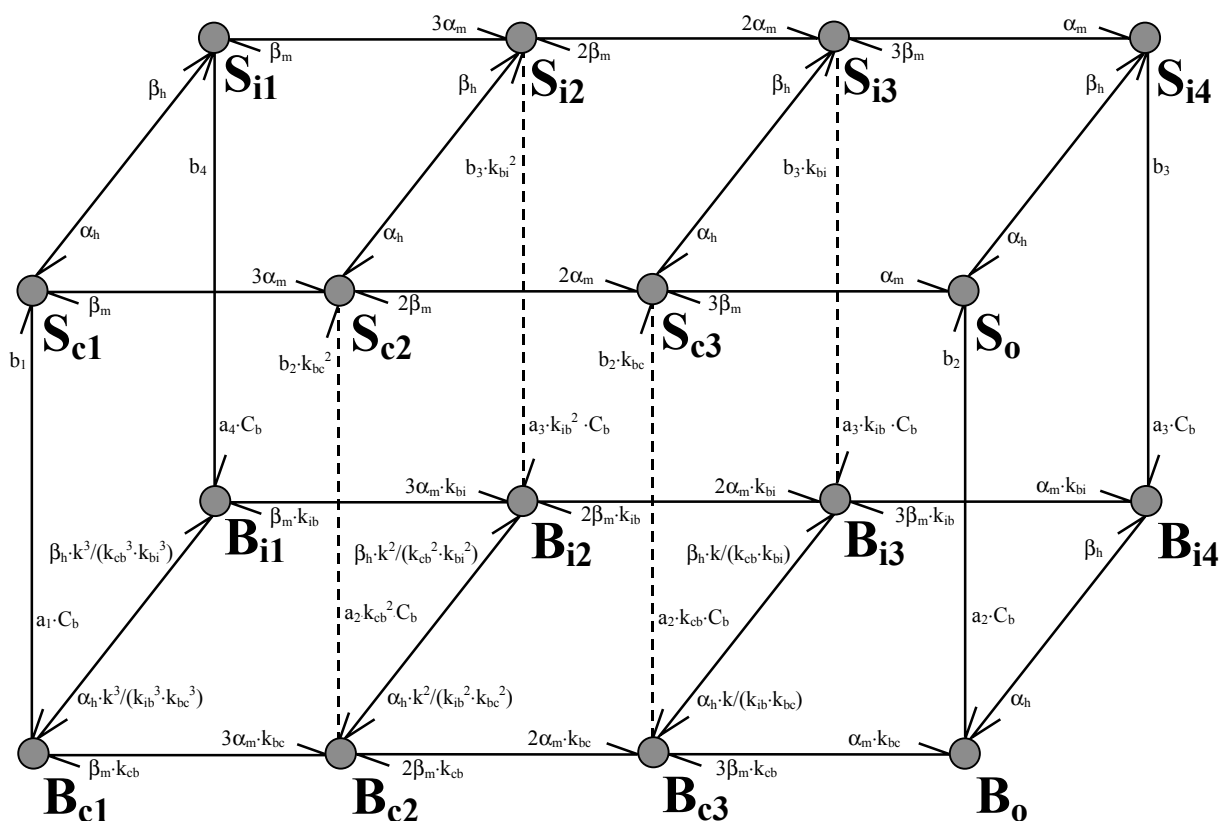
7.1.2 Sestavení matematického modelu

Sestavení matematického modelu procesu blokady zahrnuje dvě části. V první bylo nutné vytvořit matematický model funkce neblokovaného I_{Na} -kanálu (na základě vlastních a zahraničních experimentů [2]) a v druhé tento základní model doplnit o popis přechodů do blokových stavů. Kinetické schéma charakterizující předpokládané kanálové stavy a přechody u výsledného modelu je vykresleno na

obr. 9. Afinita I_{Na} -kanálu k vazbě s propafenonem stejně jako rychlost procesu vazby (blokády) jsou pro základní neblokované stavy (S_{c1} , S_o , S_{i1} , S_{i4}) určeny rychlostními konstantami a_1 , b_1 , a_2 , b_2 , a_3 , b_3 , a_4 , b_4 a koncentrací propafenonu (C_b) v extracelulárním roztoku. Parametr k vyjadřuje ovlivnění rychlosti inaktivace a zotavení z inaktivace u blokovaných kanálů.

Uvedené rychlostní konstanty a parametr k byly nejprve přibližně odhadnuty z experimentální rekonstrukce časového vývoje blokády (obr. 3c) a následně optimalizovány prostřednictvím opakovaných simulací s využitím **genetického algoritmu**. Kritériem pro ukončení optimalizace byla přibližná shoda ($>95\%$) simulovaných a experimentálně získaných průběhů hodnot $I_{Na,max}$ (obr. 3a,b) charakterizujících velikost blokády I_{Na} -kanálů během a po ukončení 0.5 s trvající depolarizace (na hladině -20 mV) při koncentraci propafenonu $0.2\text{ }\mu\text{M}$.

Po nalezení základních rychlostních konstant vzniku a zotavení z blokády byly odvozeny také zbývající rychlostní konstanty charakterizující vazbu propafenonu na přechodné stavy (S_{c2} , S_{c3} , S_{i2} , S_{i3} - přechody jsou vyznačeny čárkovaně na obr. 9). Dodržení **podmínky detailní mezistavové rovnováhy** v každé smyčce kinetického schématu si vyžádalo zavedení čtyř parametrů (k_{cb} , k_{bc} , k_{ib} , k_{bi}) vyjadřujících jak změnu rychlosti blokády a vazebné afinity v těchto přechodných stavech, tak i změnu rychlosti aktivace a deaktivace u blokovaných kanálů.



Obr. 9 Výsledné kinetické schéma I_{Na} -kanálu blokovaného propafenonem

Matematický popis mezistavových přechodů u I_{Na} -kanálu blokováného propafenonem

■ Rychlostní konstanty kanálové aktivace

$$\alpha_m = \frac{117.26 \cdot (U_m + 59.25)}{1 - \exp(-0.55 \cdot (U_m + 59.25))},$$

$$\beta_m = 3800 \cdot \exp(-0.0723 \cdot (U_m + 61)),$$

■ Rychlostní konstanty kanálové inaktivace

$$\alpha_h = \frac{15.518}{1 + \exp(0.188 \cdot (U_m + 68.2))},$$

$$\beta_h = \frac{18.77 \cdot (U_m + 74.4)}{1 - \exp(-0.399 \cdot (U_m + 74.4))}.$$

■ Rychlostní konstanty procesu blokády a zotavení z blokády

$a1 = 1.049 \times 10^{-3}$	$[s^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot l]$	$b1 = 0.202$	$[s^{-1}]$
$a2 = 7179$	$[s^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot l]$	$b2 = 67.64$	$[s^{-1}]$
$a3 = 11.8$	$[s^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot l]$	$b3 = 0.1112$	$[s^{-1}]$
$a4 = 2.68 \times 10^{-2}$	$[s^{-1} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot l]$	$b4 = 5.15$	$[s^{-1}]$

■ Parametry ovlivňující aktivaci a inaktivaci blokováného I_{Na} -kanálu

$k_{cb} = (a1/a2)^{1/3} = 0.00527$	$k_{bc} = (b1/b2)^{1/3} = 0.144$
$k_{ib} = (a4/a3)^{1/3} = 0.131$	$k_{bi} = (b4/b3)^{1/3} = 3.592$

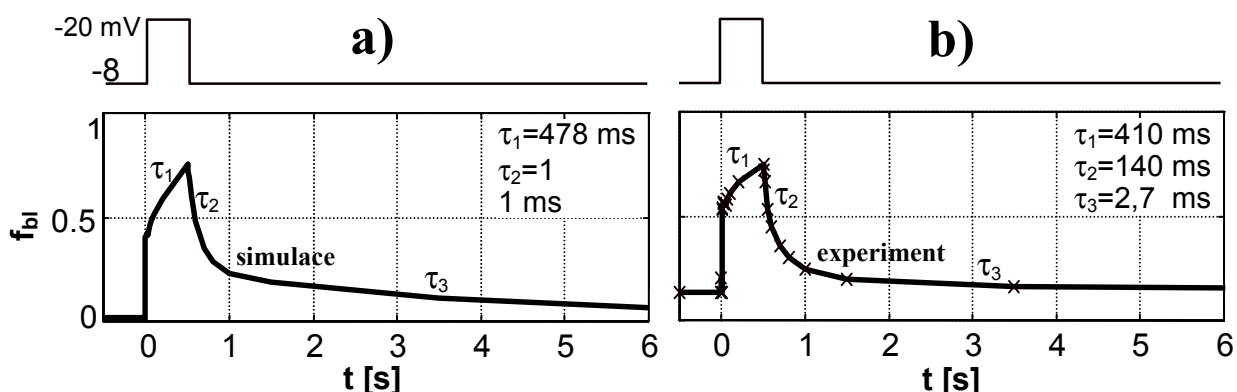
$$k = 0.0092$$

7.1.3 Simulace průběhu blokády během a po ukončení depolarizace

Přímá simulace průběhu blokády I_{Na} -kanálů (při působení $0.2 \mu\text{M}$ propafenonu) během a po ukončení 0.5 s trvající depolarizace na hladině -20 mV je vykreslena na obr. 10a. Velikost blokády (f_{bl}) je v tomto případě dána součtem pravděpodobností výskytu kanálu ve všech blokováných stavech ($\Sigma B_c + \Sigma B_i + B_o$) v kterémkoliv okamžiku během vyšetřovaných intervalů. Na obr. 10b je vykreslena také experimentální

rekonstrukce f_{bl} provedená v kap. 4.2.1. Ze srovnání obou průběhů vyplývá, že matematický model je schopen reprodukovat experimentálně zjištěný dvoufázový vývoj blokády během depolarizace (rychlý skok během otevření kanálů následovaný exponenciálním růstem během inaktivace kanálů - τ_1) a dvoufázový pokles blokády (τ_2 a τ_3) po návratu membránového napětí na klidovou hodnotu -80 mV .

Příčina rozdílu v úrovních ustálené blokády při klidovém napětí -80 mV je dána chybou vznikající při experimentální rekonstrukci blokády. Výpočtová analýza této chyby je provedena v disertační práci.

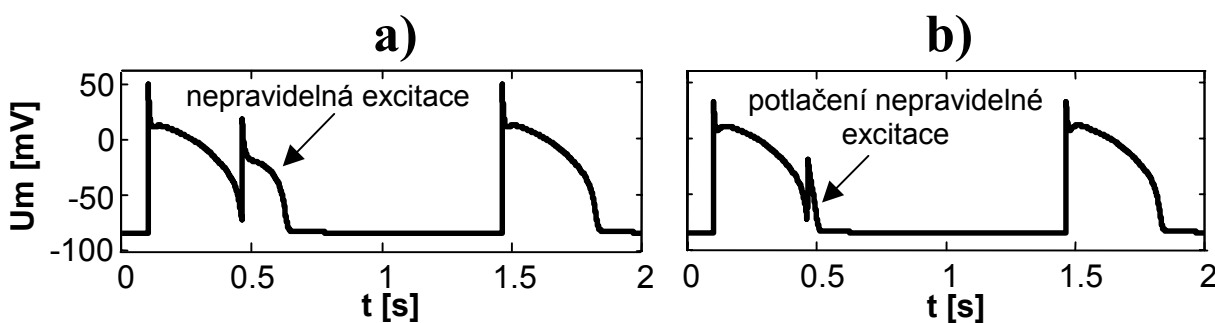


Obr. 10a,b Průběh blokády během a po ukončení depolarizace (simulace, experiment)

7.1.4 Simulace antiarytmických účinků propafenonu

Vlivem vazby propafenonu na receptory I_{Na} -kanálů během pravidelné excitace dochází při následující předčasné stimulaci k blokování proudu I_{Na} , a tím k potlačení nepravidelné depolarizace buňky. V důsledku tohoto potlačení pak nemůže dojít k plnému rozvinutí proudu I_{Ca} , a proto také ani k významnému zvýšení volné intracelulární koncentrace iontů Ca^{2+} , která spouští buněčnou kontrakci.

Příklad simulací vystihujících tyto antiarytmické účinky propafenonu je vykreslen na obr. 11a,b. Z uvedených grafů vyplývá, že při nepravidelné stimulaci buněčné membrány v podmínkách absence propafenonu (v extracelulárním roztoku) nastává rozvinutí nepravidelné excitace (obr.11a), zatímco za působení $0.2\ \mu\text{M}$ propafenonu dochází k jejímu výraznému potlačení (obr.11b). Takto potlačená excitace již zpravidla není schopná dalšího šíření na okolní buňky.



Obr. 11a,b Simulace účinku propafenonu na potlačení extrasystol

7.2 Blokáda $I_{K_{to}}$ -kanálů 4-aminopyridinem

Cílem matematického popisu a následných simulací 4-aminopyridinem vyvolané blokády $I_{K_{to}}$ -kanálů bylo přispět k detailnímu vysvětlení experimentálních výsledků uvedených v kap. 4.2.2 a k vyšetření účinku této blokády na modulaci průběhu akčního napětí.

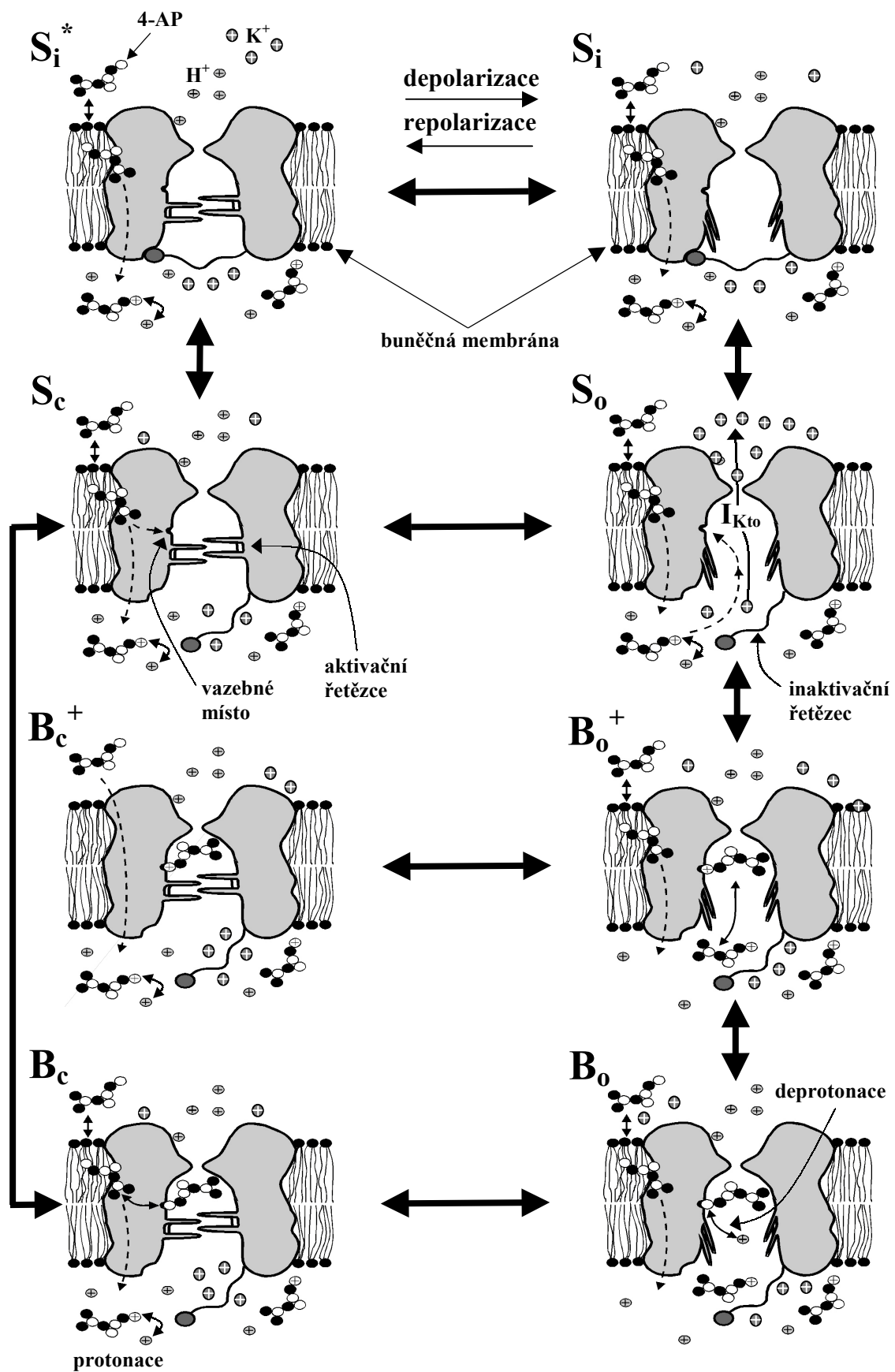
7.2.1 Hypotetický výklad procesu blokády

Jak již bylo zmíněno v kap. 2.1.2, vychází současná interpretace procesu blokády z předpokladu, že vazba 4-AP k receptorům $I_{K_{to}}$ -kanálů je napět'ově nezávislá a probíhá především v zavřených stavech kanálů s afinitou modulovanou jejich konformačními změnami [4, 5]. Protože však tato interpretace neposkytuje přijatelné vysvětlení všech našich experimentálně získaných průběhů blokády (zejména přechodný nárůst f_{bl} na začátku depolarizace - viz obr. 4c), byla pro matematický popis navržena alternativní hypotéza [A11], která zahrnuje i napět'ově závislou blokádu $I_{K_{to}}$ -kanálů v jejich otevřených stavech (viz obr. 12).

Pro jeden $I_{K_{to}}$ -kanál lze tuto hypotézu shrnout do následujících bodů:

- Blokáda kanálu nastává nejen v jeho zavřených stavech (přechod $S_c \rightarrow B_c$), ale i v otevřeném stavu (přechod $S_o \rightarrow B_o^+$).
- V zavřených stavech dochází k blokáde prostřednictvím elektroneutrálních (deprotonovaných) molekul 4-AP [4, 5].
- V otevřeném stavu kanálu je blokáda napět'ově závislá. Probíhá prostřednictvím kladně nabitých (protonovaných) molekul 4-AP⁺, které se skrze otevřený kanál vážou na jeho vnitřní receptory (pravděpodobná příčina vzrůstu f_{bl} na začátku depolarizace – viz obr. 4c).
- Inaktivace kanálu (přechody $S_o \rightarrow S_i$, $S_c \rightarrow S_i^*$) a jeho blokáda se vzájemně vylučují [4, 5] (pravděpodobná příčina poklesu f_{bl} během delšího trvání depolarizace – viz obr. 4c).
- Po navázání kladně nabitého 4-AP⁺ na otevřený kanál (stav B_o^+) může dojít k jeho deprotonaci na neutrální 4-AP (přechod $B_o^+ \rightarrow B_o$).
- Blokováný kanál se může deaktivovat jak s navázaným 4-AP v protonovaném stavu (přechod $B_o^+ \rightarrow B_c^+$), tak i v deprotonovaném stavu (přechod $B_o \rightarrow B_c$). Kinetika aktivace a deaktivace kanálu je přitom v blokováných stavech stejná jako v neblokováných stavech.

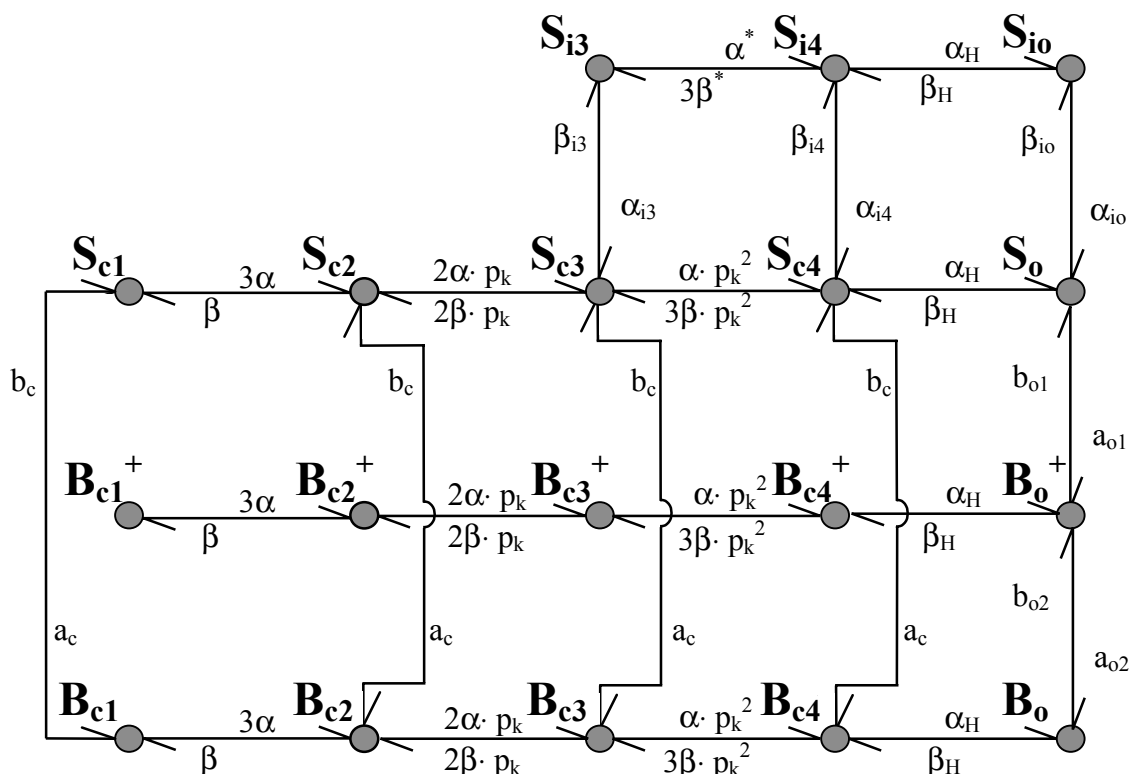
Mnohé experimentální práce také naznačují, že aktivační subjednotky kanálu se vzájemně ovlivňují (kooperativní aktivace-[1, 21]), přičemž poslední přechod do otevřeného stavu kanálu je velmi rychlý a napět'ově nezávislý [3, 17, 27].



Obr. 12 Předpokládané základní stavy I_{Kto} -kanálu blokovaného 4-aminopyridinem

7.2.2 Sestavení matematického modelu

Obdobně jako v kap. 7.1.2 je sestavení matematického modelu funkce I_{Kto} -kanálu blokováného 4-aminopyridinem rozděleno na dvě části. V první byl navržen matematický model neblokovaného I_{Kto} -kanálu a v druhé tento základní model doplněn o popis přechodů do blokováných stavů. Výsledné kinetické schéma navrženého modelu blokováného kanálu je vykresleno na obr. 13.



Obr. 13 Kinetické schéma I_{Kto} -kanálu blokováného 4-aminopyridinem

Rychlostní konstanty řídící elektroneutrální proces blokády (a_c , b_c) byly odvozeny z rychlosti vývoje blokády (τ_2) a z ustálené velikosti blokády během repolarizační fáze průběhů f_{bl} (obr. 4c) rekonstruovaných pro koncentrace (C_b) 1, 2 a 4 mM 4-AP.

Rychlostní konstanty řídící napětově závislý proces blokády (a_{o1} , b_{o1} , a_{o2} , b_{o1}) byly formulovány na základě teorie absolutních reakčních rychlostí ve tvaru:

$$a_{o1} = C_b \cdot k_{C_b^+} \cdot k_{a1} \cdot \exp\left(\delta \cdot F \cdot \frac{U_m}{R \cdot T}\right),$$

$$b_{o1} = k_{b1} \cdot \exp\left(-\delta \cdot F \cdot \frac{U_m}{R \cdot T}\right),$$

$$a_{o2} = k_{a2} \cdot \exp\left(-\delta \cdot F \cdot \frac{U_m}{R \cdot T}\right),$$

$$b_{o2} = k_{b2} \cdot \exp\left(\delta \cdot F \cdot \frac{U_m}{R \cdot T}\right).$$

Konstanta k_{Cb}^+ vyjadřuje podíl protonovaných molekul $4-AP^+$ (zodpovědných za napěťově závislou blokádu) v intracelulárním a extracelulárním buněčném roztoku vztažený k celkové koncentraci $4-AP$ (C_b). Její velikost $k_{Cb}^+ = 0.987$ byla převzata z publikací [4, 13].

Parametr δ charakterizuje umístění energetické bariéry v buněčné membráně a byl stanoven na hodnotu 0.25 , která odpovídá předpokládanému umístění energetické bariéry v $1/4$ šířky membrány z intracelulární strany.

Konstanty (k_{a1} , k_{b1} , k_{a2}) byly nejprve přibližně odhadnuty a následně optimalizovány [A14] prostřednictvím genetického algoritmu. Zbylá konstanta k_{b2} byla počítána v průběhu optimalizace (po každém návrhu k_{a1} , k_{b1} a k_{a2}) z podmínky detailní mezistavové rovnováhy v příslušné smyčce kinetického schématu:

$$b_c \cdot a_{o1} \cdot a_{o2} = a_c \cdot b_{o1} \cdot b_{o2}.$$

Do optimalizace byl také začleněn parametr kooperativní aktivace p_k a rychlostní konstanty zotavení z inaktivace (α_{i3} , α_{i4} , α_{io}), které ovlivňují velikost ustálené blokády při depolarizaci buněčné membrány.

Kritériem pro ukončení optimalizace byla přibližná shoda ($>95\%$) výpočtové a experimentální rekonstrukce průběhů f_{bl} (pro koncentraci 1 , 2 a 4 mM $4-AP$) charakterizujících pokles frakce blokováných I_{Kto} -kanálů během $1s$ trvající depolarizace na hladině 20 mV.

Matematický popis mezistavových přechodů u I_{Kto} -kanálu blokováného 4-aminopyridinem

■ Rychlostní konstanty kanálové aktivace

$$\alpha = 2150.7 \cdot \frac{\exp((U - 12.51)/18.166)}{1 + 2.313 \cdot \exp((U - 12.51)/18.166)},$$

$$\alpha^* = \alpha, \quad \alpha_H = 3800 \text{ [s}^{-1}\text{]},$$

$$p_k = 3 \text{ až } 7.$$

$$\beta = 38.042 \cdot \frac{1 + 0.11661 \cdot \exp((U - 12.51)/14.135)}{\exp((U - 12.51)/14.135)},$$

$$\beta^* = 0.1 \cdot \beta, \quad \beta_H = 100 \text{ [s}^{-1}\text{]}.$$

■ Rychlostní konstanty kanálové inaktivace

$$\alpha_{i0} = 2.1052 \text{ [s}^{-1}\text{]}, \quad \alpha_{i4} = 2.1052 \text{ [s}^{-1}\text{]}, \quad \alpha_{i3} = 2.1052 \text{ [s}^{-1}\text{]},$$

$$\beta_{i0} = 40 \text{ [s}^{-1}\text{]}, \quad \beta_{i4} = 40 \text{ [s}^{-1}\text{]}, \quad \beta_{i3} = 4 \text{ [s}^{-1}\text{]}.$$

■ Rychlostní konstanty elektroneutrální blokády

$$a_c = 0.15 \cdot C, \quad b_c = 0.068 \text{ [s}^{-1}\text{]}.$$

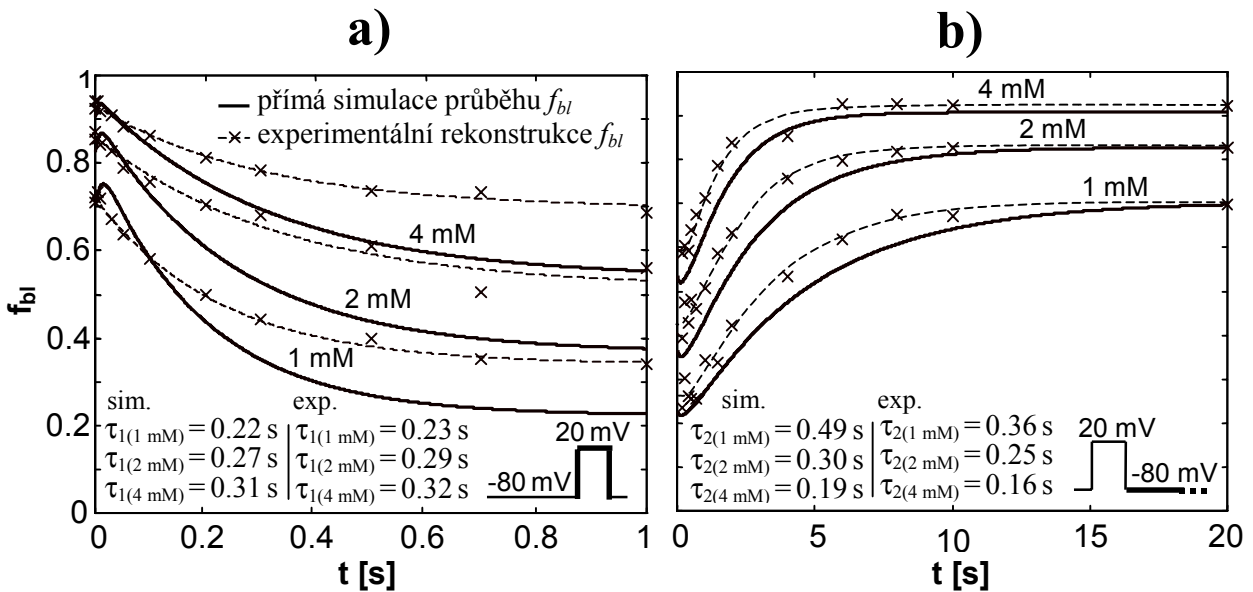
■ Rychlostní konstanty napětově závislé blokády

$$a_{o1} = C \cdot 48.9159 \cdot \exp(0.25 \cdot U/25), \quad b_{o1} = 21 \cdot \exp(-0.25 \cdot U/25),$$

$$a_{o2} = 6004 \cdot \exp(-0.25 \cdot U/25), \quad b_{o2} = 6340 \cdot \exp(0.25 \cdot U/25).$$

7.2.3 Simulace průběhu blokády během a po ukončení depolarizace

Přímá simulace velikosti frakce blokováných I_{Kto} -kanálů (při koncentraci 1, 2 a 4 mM 4-AP) během a po ukončení 1s trvající depolarizace na hladině 20 mV je vykreslena na obr. 14a,b. Její velikost je podobně jako v kap. 7.1.2 dána součtem pravděpodobností výskytu kanálu ve všech blokováných stavech během vyšetřovaných intervalů. Pro porovnání výsledků přímé simulace f_{bl} s výsledky experimentů jsou v grafech na obr. 14a,b vykresleny také průběhy experimentální rekonstrukce blokády provedené v kap. 4.2.2.



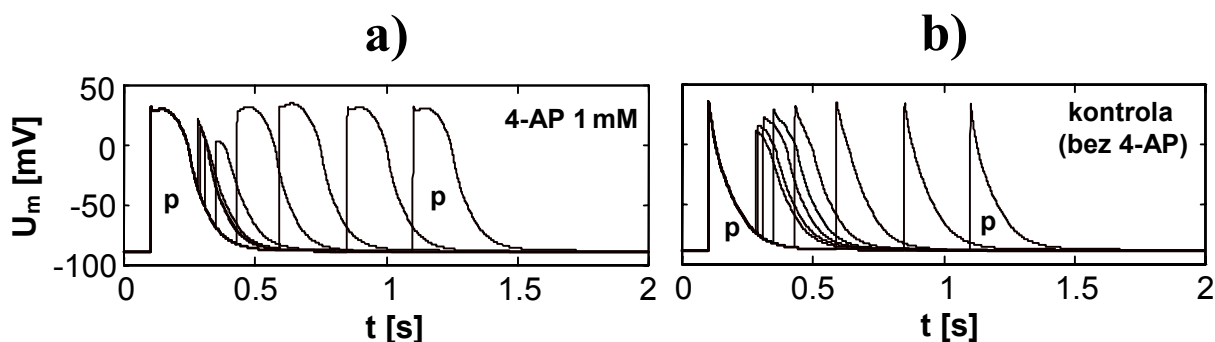
Obr. 14a,b Přímá simulace frakce blokováných kanálů (f_{bl}) během a po ukončení 1s trvající depolarizace na hladině 20 mV (srovnání s experimentální rekonstrukcí f_{bl})

Na základě srovnání těchto průběhů lze konstatovat, že přímá simulace na matematickém modelu pro dané koncentrace spolehlivě reprodukuje ustálenou velikost blokády v klidovém stavu buňky, její krátký přechodný nárůst a exponenciální pokles (τ_1) během depolarizace membrány stejně jako exponenciální vzrůst blokády (τ_2) po návratu membránového napětí na klidovou hodnotu.

Příčina rozdílu úrovní v ustálené blokádě během depolarizace ($f_{bl(U=20mV)}$) je ve všech třech případech (obr. 14a,b) způsobena chybou vznikající při experimentální rekonstrukci blokády a je popsána v disertační práci.

7.2.4 Simulace účinku 4-AP na elektrickou aktivitu srdeční buňky

Významnou součástí vyšetření účinku 4-aminopyriminem vyvolané blokády proudu I_{Kto} na elektrickou aktivitu srdečních buněk jsou simulace vystihující vliv této blokády na modulaci pravidelných a nepravidelných akčních napětí [A19, A20]. Na rozdíl od předcházejícího případu (kap. 7.1.4) byly však tyto simulace (obr. 15a,b) provedeny na modelu síňové srdeční buňky, kde je vliv proudu I_{Kto} podstatně větší než u buněk komorových. Pro zajištění dostatečného efektu blokády byla postačující koncentrace 4-AP 1mM. Interval pravidelné stimulace byl zvolen 1s. Nepravidelné excitace byly vyvolány při předčasné stimulaci buněčné membrány v časech $T_e = 0.18, 0.19, 0.21, 0.25, 0.33, 0.49$ a 0.75 s po začátku první pravidelné excitace (p).



Obr. 15a,b Simulace průběhu akčního napětí po pravidelných a nepravidelných stimulacích (4-AP, kontrola)

Jak je patrné z obr. 15a,b, blokáda proudu I_{Kto} vyvolává značné zvýraznění fáze plató akčního napětí, a tím i jeho rozšíření. Zužování akčního napětí v případě velkého zkrácení stimulačního intervalu (T_e) je naproti tomu způsobeno nedostatečným zotavením vápníkového proudu (I_{Ca}) z inaktivace po předcházející pravidelné excitaci buňky.

Z hlediska potlačení vzniku nepravidelných excitací je podstatným účinkem blokády proudu I_{Kto} právě rozšíření akčního napětí a jeho refrakterní fáze, během které je ztíženo vybavení elektrického vzruchu. Vzhledem k tomu, že však značné rozšíření AN může naopak podnítit vznik srdečních arytmií [10], je pro vymezení podmínek pozitivního působení této blokády nutné provést další simulace a studovat její účinek také na vícebuněčných modelech.

8. ZÁVĚR

Tato práce je výsledkem čtyřletého intenzivního studia a snahy o matematický popis biofyzikálních jevů probíhajících na buněčné úrovni srdečního svalu. Simulace provedené na sestavených matematických modelech objasňují experimentálně získané údaje a ukazují, že:

1. Schopnost buněk srdečního převodního systému vytvářet samostatně elektrické vzruchy je dána především pozvolnou aktivací sodíko-draslíkového depolarizačního proudu I_f v rozsahu záporných hodnot membránového napětí (-70 až -80 mV). Svou významnou roli podporující autonomní depolarizaci těchto buněk zde hraje také velký pokles draslíkových proudů v koncové fázi repolarizace.
2. Hlavní příčinou vzniku vzruchu (depolarizace) na buňkách myokardu (po jejich podráždění) je rychlý vtok iontů Na^+ do buňky (proud I_{Na}). Následující pozvolný výtok draslíkových iontů (prostřednictvím proudů I_{Kto} , I_K , I_{K1} ...) vrací membránové napětí opět na klidovou úroveň (repolarizace). Proud I_{Ca} aktivovaný v průběhu depolarizace spouští řetězec dějů vedoucích k buněčné kontrakci.
3. Vlastní kontrakce buňky je výsledkem interakce mezi kontraktilními bílkoviny (aktin, myozin), ke které dochází po přechodném zvýšení intracelulární koncentrace iontů Ca^{2+} v důsledku jejich vyplavení ze sarkoplazmatického retikula (reakce na proud $I_{Ca,K}$). Po každé excitaci a kontrakci buňky nastává také pozvolné zotavování buněčných transportních mechanismů (elektrická a mechanická restituce), které hraje významnou roli v procesu ochrany buňky před vznikem nepravidelných (předčasných) vzruchů.
4. Propafenonem vyvolaná částečná blokáda I_{Na} -kanálů má významné antiarytmické účinky. Během depolarizace se tato blokáda rozvíjí, zatím co při klidovém napětí dochází k jejímu uvolnění. Důsledkem této vlastnosti blokády je její vzrůst při zvýšení frekvence buněčné stimulace, které doprovází tvorbu srdečních arytmií. Proces blokády lze vysvětlit hypotézou modulovaného receptoru (kap. 7.1.1).
5. 4-aminopyridinem vyvolaná částečná blokáda I_{Kto} -kanálů založená na hypotéze elektroneutrální vazby 4-AP k zavřeným kanálům a napěťově závislé vazby 4-AP k otevřeným kanálům (kap. 7.2.1) je v souladu s experimentálními výsledky získanými na psích komorových preparátech. Tato blokáda vyvolává podstatné rozšíření nejen pravidelných AN, ale i nepravidelných AN téměř v celém rozsahu předčasných intervalů (kap. 7.2.3).

Je zřejmé, že i v biologii má matematické modelování elektrických, chemických a mechanických dějů velký význam a stává se tak důležitým nástrojem experimentálního výzkumu. Naším dalším cílem je využití sestavených modelů pro studium rozvoje arytmií v srdeční tkáni [A15, A21] stejně jako pro výzkum možností jejich potlačení dalšími specifickými blokátory.

LITERATURA

- [1] Bezanilla F., Perozo E., Papazian D. M., Stefani E.: Molecular basis of gating charge immobilization in Shaker potassium channels. *Science* 254:679-683, 1991.
- [2] Brown A. M, Lee K. S., Powell T.: Sodium current in single rat heart muscle cells. *J. Physiol.* 318:479-500, 1981.
- [3] Campbell D. L., Rasmusson R.L., Qu Y., Strauss H. C.: The calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. I. Basic characterisation and kinetic analysis. *J. Gen. Physiol.* 101:571-601, 1993.
- [4] Campbell D. L., Qu Y., Rasmusson R. L., Strauss H.: The Calcium-independent transient outward potassium current in isolated ferret right ventricular myocytes. II. Closed state reverse use-dependent block by 4-aminopyridine. *J. Gen. Physiol.* 101:603-626, 1993.
- [5] Castle N. A., Slawsky M. T.: Characterization of 4-aminopyridine block of the transient outward K⁺ current in adult rat ventricular myocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 264:450-459, 1992.
- [6] Di Francesco D., Noble D.: A model of cardiac electrical activity incorporating ionic pumps and concentration changes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 307:353-398, 1985.
- [7] Egan T. M., Noble D., Noble S. J., Powell T., Spindler A. J., Twist V. W.: Sodium-calcium exchange during the action potential in guinea-pig ventricular cells. *J. Physiol. Lond.* 411:639-661, 1989.
- [8] Gadsby D. C., Nakao M.: Steady-state current-voltage relationship of the Na/K pump current in guinea-pig ventricular myocytes. *J. Gen. Physiol.* 94:511-537, 1989.
- [9] Hilgemann D. W., Noble D.: Excitation-contraction coupling and extracellular calcium transient in rabbit atrium: reconstruction of basic cellular mechanisms. *Proc. R. Soc. Lond. B*320:163-205, 1987.
- [10] Hondeghem L. M., Snyders D. J.: Class III antiarrhythmic agents have a lot of potential but a long way to go. Reduced effectiveness and dangers of reverse use dependence. *Circulation* 81:686-690, 1990.
- [11] Honjo H., Watanabe T., Kamiya K., Kodama I., Toyama J.: Effects of propafenone on electrical and mechanical activities of single ventricular myocytes isolated from guinea-pig hearts. *Br. J. Pharmacol.* 97:731-738, 1989.
- [12] Kimura J., Miyamae S., Noma A.: Identification of sodium-calcium exchange current in single ventricular cells of guinea-pig. *J. Physiol.* 384:199-222, 1987.
- [13] Kirsch G. E., Narahashi T. J.: Site of action and active form of aminopyridines in squid axon membranes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 226:174-179, 1983.

- [14] Kodama I., Suzuki R., Honjo H., Toyama J.: Electrophysiological effects of diprafenone, a dimethyl congener of propafenone on guinea-pig ventricular cells. *Br. J. Pharmacol.* 107:813-820, 1992.
- [15] Kohlhardt M.: Block of sodium currents by antiarrhythmic agents: analysis of the electro- physiologic effects of propafenone in heart muscle. *Am. J. Cardiol.* 54:13D-19D, 1984.
- [16] Kohlhardt M., Fichtner H.: Block of single cardiac Na⁺ channels by antiarrhythmic drugs: the effects of amiodarone, propafenone and diprafenone. *J. Membr. Biol.* 102:105-119, 1988.
- [17] Lee C. Y.: On the activation-inactivation coupling in Shaker potassium channels (Hypothesis), *FEBS Lett.* 306:95-97, 1992.
- [18] Nordin C., Siri F. M., Aronson R. S.: Electrophysiologic characteristics of single myocytes isolated from hypertrophied guinea pig hearts. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 21:728-739, 1989.
- [19] Nordin C., Siri F. M., Aronson R. S.: Calcium current in myocytes isolated from hypertrophied guinea pig hearts (Abstract). *Clin. Res.* 38:49A, 1990.
- [20] Nordin C.: Computer model of membrane current and intracellular Ca²⁺ flux in the isolated guinea pig ventricular myocyte. *Am. J. Physiol.* 265:H2117-H2136, 1993.
- [21] Perozo E, Papazian D. M., Stefani E., Bezanilla F.: Gating currents in Shaker K⁺ channels. Implications for activation and inactivation models. *Biophys. J.* 62:160-171, 1992.
- [22] Schreiber W., Lindner W.: Stereoselective interactions of (R)- and (S)-propafenone with the cardiac sodium channel. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20:324-331, 1992.
- [23] Šimurda J., Šimurdova M., Čupera P.: 4-Aminopyridine sensitive transient outward current in dog ventricular fibres. *Pflügers. Arch.* 411:442-449, 1988.
- [24] Šimurda J., Šimurdová M., Christé G.: Use-dependent effects of 4-aminopyridine on transient outward current in dog ventricular muscle. *Pflügers. Arch.* 415:244-246, 1989.
- [25] Šimurdová M., Nováková M., Nováková Z., Šumbera J., Šimurda J.: Reconstruction of the time course of I_{Na} block induced by antiarrhythmic drugs in ventricular myocytes. In: Proceedings of the conference "Analysis of biomedical signals and images '96" 243-245, Brno.
- [26] Šimurdová M., Nováková Z., Nováková M., Šumbera J., Christé G., Šimurda J.: Kinetics of propafenone-induced block of sodium current in rat ventricular myocytes. *Scripta medica (Brno).* 70:263-275, 1997.
- [27] Zagotta W. N., Aldrich R. W.: Voltage-dependent gating of shaker A-type potassium channels in drosophila muscle. *J. Gen. Physiol.* 95:29-60, 1990.

AUTOROVY PUBLIKACE SOUVISEJÍCÍ S DISERTAČNÍ PRACÍ

- [A1] Pásek M., Šimurda J., Janíček P.: Simulační modelování vlastností a chování srdečního svalu. In: sborník konference "Inženýrská mechanika '96", 3:217-224, Svatka.
- [A2] Pásek M., Šimurda J.: Kvantitativní modelování vazby mezi excitací a kontrakcí u srdečních buněk. In: sborník konference "Biomechanika člověka '96", 143-146, Tichonice.
- [A3] Pásek M., Šimurda J., Šimurdová M.: Interaction of propafenone with sodium channels in the heart. A quantitative model. *Physiol. Res.* 46:9P (abstract), 1997.
- [A4] Pásek M., Šimurda J., Šimurdová M.: Matematický model interakce sodíkových kanálů srdečních buněk s propafenonem (abstrakt). 5. výroční sjezd české kardiologické společnosti, 1997, Brno.
- [A5] Pásek M., Šimurda J.: Výpočtové modelování chování buněk srdečního svalu při elektrických a farmakologických podnětech. In: sborník konference "MOSIS '97", 3:77-82, Hradec nad Moravicí.
- [A6] Pásek M., Šimurda J.: Užití matematického modelování při zpracování dat a optima-lizaci měření účinků farmak na membránové kanály. In: sborník konference "Inženýrská mechanika '97" 3:177-182, Svatka.
- [A7] Pásek M., Šimurda J.: Mathematical model of contraction of cardiac cells (excitation - contraction coupling). In: Proceedings of the conference "Biomechanical modeling & Numerical simulations – Workshop '97" 59-60, Praha.
- [A8] Pásek M., Šimurda J., Šimurdová M.: A quantitative model of interaction of propafenone with sodium current. In: Proceedings of the symposium "New frontiers in basic cardiovascular research '98" 45 (abstract), Obernai, France.
- [A9] Pásek M., Šimurda J.: Matematický model interakce 4-aminopyridinu s draslíkovými kanály. In: sborník konference "Inženýrská mechanika '98", 3:575-576, 1998, Svatka.
- [A10] Pásek M., Šimurda J., Šimurdová M.: Mathematical model of interaction of propafenone with sodium channels in the heart. In: Proceedings of the conference "Analysis of biomedical signals and images '98" 246-248, Brno.
- [A11] Pásek M., Šimurda J.: Matematický model interakce 4-aminopyridinu s draslíkovými kanály II. In: sborník konference "Biomechanika člověka '98", 170-174, 1998, Praha.
- [A12] Pásek M.: Výpočtové modelování fyziologických procesů na buňkách srdečního svalu. In: sborník konference "Aplikovaná mechanika '99", 171-174, Brno.

- [A13] Pásek M., Šimurda J.: Matematické simulace v oblasti buněčné elektrofyzologie srdce. In: sborník konference "Transfer '99", A9-A10, Brno.
- [A14] Pásek M., Šimurda J.: Matematický model interakce 4-aminopyridinu s draslíkovými kanály III. In: sborník konference "Inženýrská mechanika '99", 2:571-572, Svratka.
- [A15] Brožková K., Pásek M.: Výpočtová analýza vzniku arytmií na buňkách srdečního svalu (Vliv změn vodivosti membránových kanálů). In: sborník konference "Inženýrská mechanika '99", 2:483-486, Svratka.
- [A16] Pásek M., Šimurda J., Šimurdová M.: Quantitative modeling of 4-aminopyridine block of transient outward current. *Physiol. Res.* 48:S121 (Abstract of Second FEPS Congress in Prague), 1999.
- [A17] Pásek M.: Po stopách zákonů v lidském srdci. *Technický týdeník* 32:1, 1999.
- [A18] Pásek M., Šimurda J., Šimurdová M., Bahníková M.: ATP sensitive potassium current in rat ventricular myocytes (The effect of antiarrhythmic drugs). In: Proceedings of the conference "Biomechanical Engineering - Workshop '99", 13-14, Prague.
- [A19] Pásek M.: Simulace účinku blokády membránových kanálů na potlačení srdečních arytmií I. In: sborník konference "Aplikovaná mechanika '2000", 337-340, Liberec.
- [A20] Pásek M., Šimurda J.: Effect of block of fast sodium current and transient potassium current on configuration of action voltage in cardiac cells (Computer modeling). In: sborník konference "Inženýrská mechanika '2000", 3:87-90, Svratka.
- [A21] Brožková K., Pásek M.: Computer modeling of origin of arrhythmias in myocardial cells. In: sborník konference "Inženýrská mechanika '2000", 3:77-82, Svratka.
- [A22] Šlichta J., Pásek M.: Mathematical modeling of cardiac cell contraction. In: sborník konference "Inženýrská mechanika '2000", 3:55-58, Svratka.

SUMMARY

The heart diseases are regarded as the most frequent causes of death. Generally, they result from pathophysiological changes in cardiac cells as a consequence of ischemia or hypoxia of cardiac muscle.

Computer modelling appears to be an important research tool in the investigation of basis of heart diseases as well as of the mechanisms of action of drugs. It contributes to the explanation of experimentally observed results, to verification of the hypotheses proposed and also to better understanding of the complex processes in cardiac cells.

The aim of this work was to design quantitative models describing electrical and mechanical activity of mammalian cardiac cells and particularly to propose models

characterising interaction of specific drugs with membrane channels. The final goal was to simulate the effect of drug-channel interactions on regular and irregular action voltage configuration.

The models of electrical and mechanical activity are designed for the cells of cardiac conducting system and of working myocardium. The quantitative description is based mainly on the following publications: Difrancesco and Noble (1985) [14], Hilgemann and Noble (1987) [21] and Nordin (1993) [48]. The simulations carried out on the proposed models make it possible to study the principles of heart automaticity, the processes involved in excitation–contraction coupling and the processes of recovery of cellular transport system as manifested in the modulation of electrical and mechanical activity of the cells.

Two models of function of membrane channels under the effect of specific drugs were designed. They describe the function of I_{Na} -channel in the presence of propafenone and the function of I_{Kto} -channel in the presence of 4-aminopyridine. Data for the quantitative description were obtained from experiments on ventricular preparations, rat isolated myocytes [58, 59] and canine muscle strips [57]. The states the channels get through during depolarization and repolarization of cellular membrane (under conditions of absence and presence of drugs) were characterised by kinetic schemes. The rate constants of transitions among channel states were estimated and then, in the next step, they were optimized by means of repeated simulations using the genetic algorithm.

The model of propafenone induced I_{Na} -channel block is based on the modulated receptor hypothesis (with voltage independent binding of the drug): The affinity of propafenone to its receptor is assumed to be modulated by conformational changes of the channel during its activation and inactivation. The model simulations confirmed that the observed use- dependence of the block is consistent with the idea that the drug affinity to I_{Na} -channel is high in the open and inactivated state and low in the closed resting state.

On the contrary, the model of I_{Kto} -channel block by 4-aminopyridine (*4-AP*) is based on the hypothesis including both voltage independent binding of electroneutral *4-AP* to the closed channel and voltage dependent binding of protonated *4-AP*⁺ to the open channel. The simulations carried out on the model confirmed that the proposed hypothesis comply with the properties of *4-AP* block of I_{to} observed in ventricular canine cells.

It is evident that the models of electromechanical activity of cardiac cells as well as the models of blocked channels play an important role in the investigation of biophysical processes in cardiac muscle. In addition, integration of partial models of drug-channel interaction into a total model of excitation-contraction coupling in cardiac cell provides a valuable tool to analyze conditions of initiation and suppression of cardiac arrhythmias.

ŽIVOTOPIS AUTORA

Ing. Michal Pásek, narozen 20.8.1971

- 2000 Asistent na LF-MU v Brně. Fyziologická praktika
- 1999 Výzkumný pracovník sdruženého pracoviště Ústavu termomechaniky AV ČR a Ústavu mechaniky těles VUT-FSI v Brně. Výzkum v oblasti elektrofyziologie srdečního svalu při farmakologickém ovlivnění.
- 1995 - 1998 Doktorandské studium na VUT-FSI v Brně - specializace: biomechanika. Výpočtové modelování fyziologických procesů na buněčné úrovni srdečního svalu v rámci spolupráce s Fyziologickým ústavem LF-MU v Brně a ústavem U 121 INSERM v Lyonu.
- 1990 - 1995 Inženýrské studium na VUT-FSI v Brně - specializace: mechatronika. Asistent na Ústavu procesního inženýrství VUT-FSI v Brně při řešení projektů spojených s výpočtovým modelováním procesů na rázově zatížených nádržích (MKP).
- 1988 - 1990 Studium na střední elektrotechnické škole Zbrojovky Brno v oboru elektronická zařízení.
Elektronik v Tusculum Rousínov. Vývoj a opravy elektronických zařízení pro dřevozpracující stroje.
- 1985 - 1988 Studium na středním odborném učilišti Metry Blansko v oboru mechanik elektronických zařízení.