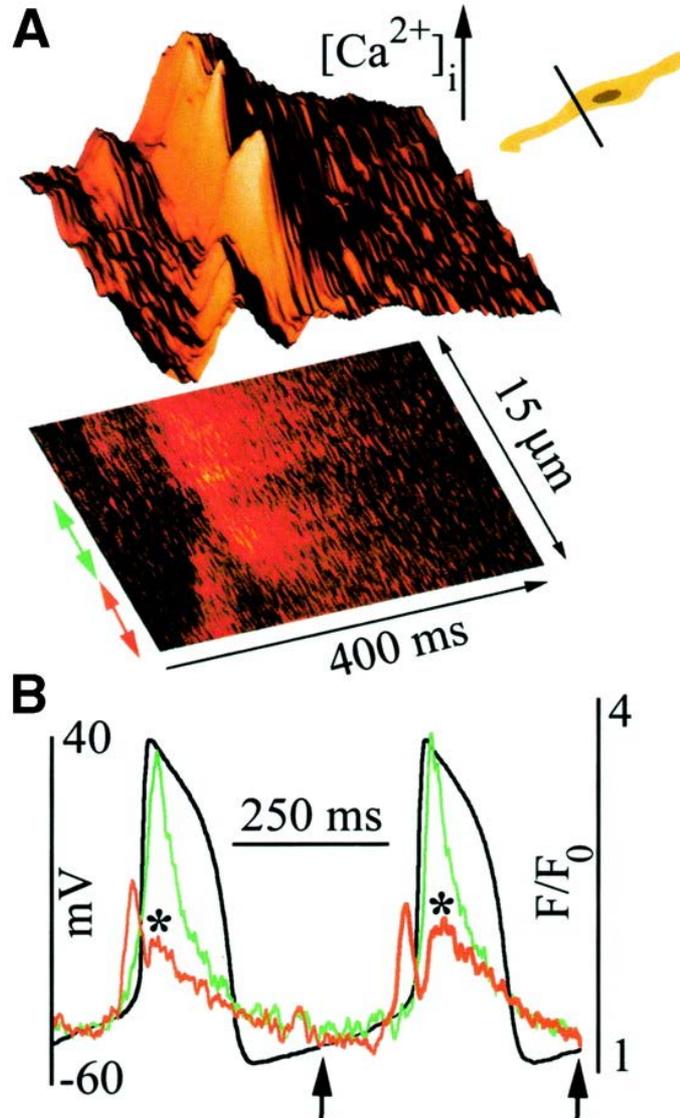


Meccanismi cellulari e molecolari dell'automatismo cardiaco

- K. Y. Bogdanov, T. M. Vinogradova, E. G. Lakatta. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na⁺-Ca²⁺ exchanger. Molecular partners in pacemaker regulation. *Circulation Research* **88**, 1254-1258, 2001.
- T. M. Vinogradova, V. A. Maltsev, K. Y. Bogdanov, A. E. Lyashkov, E. G. Lakatta. Rhythmic Ca²⁺ oscillations drive sinoatrial nodal cell pacemaker function to make the heart tick. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1047**, 138-156, 2005.
- V. A. Maltsev, E. G. Lakatta. Dynamic interactions of an intracellular Ca²⁺ clock and membrane ion channel clock underlie robust initiation and regulation of cardiac pacemaker function. *Cardiovasc. Res.* **77**, 274-284, 2008.
- M.E. Mangoni, J. Nargeot. Genesis and regulation of the heart automaticity. *Physiol. Rev.* **88**, 919-982, 2008.

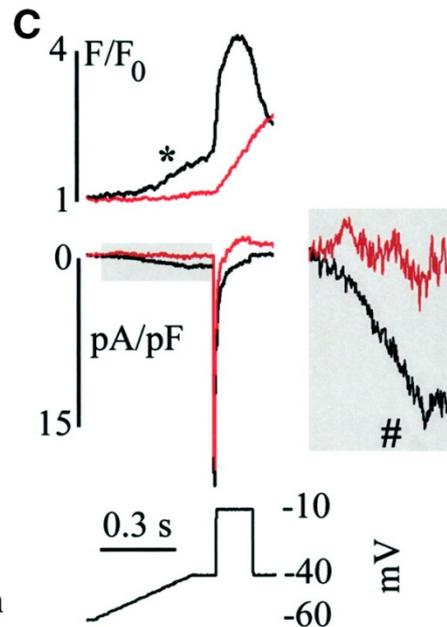
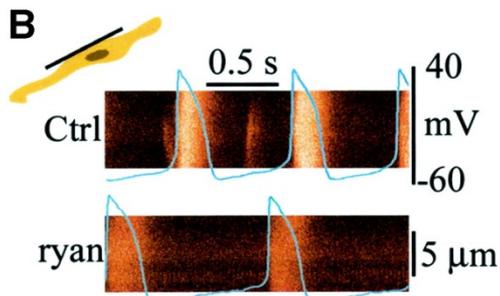
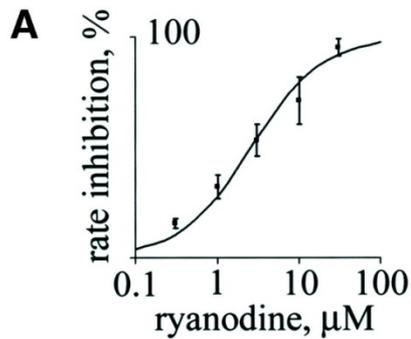
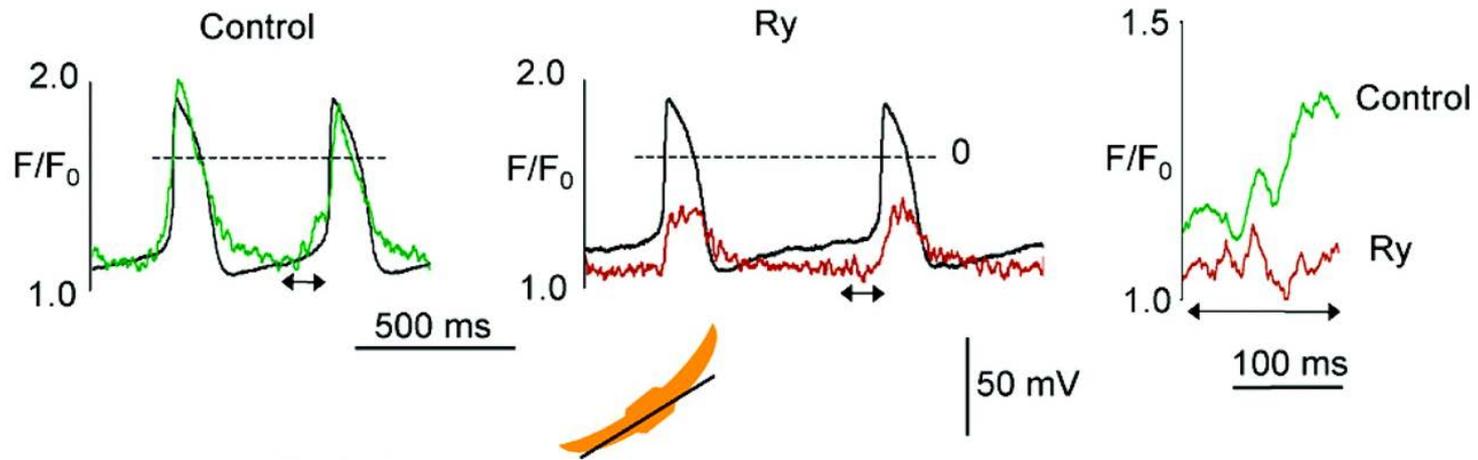
Ruolo del Ca^{2+} nella genesi del potenziale pacemaker

1. Il Ca^{2+} viene liberato in due momenti distinti durante ciascun ciclo di attività



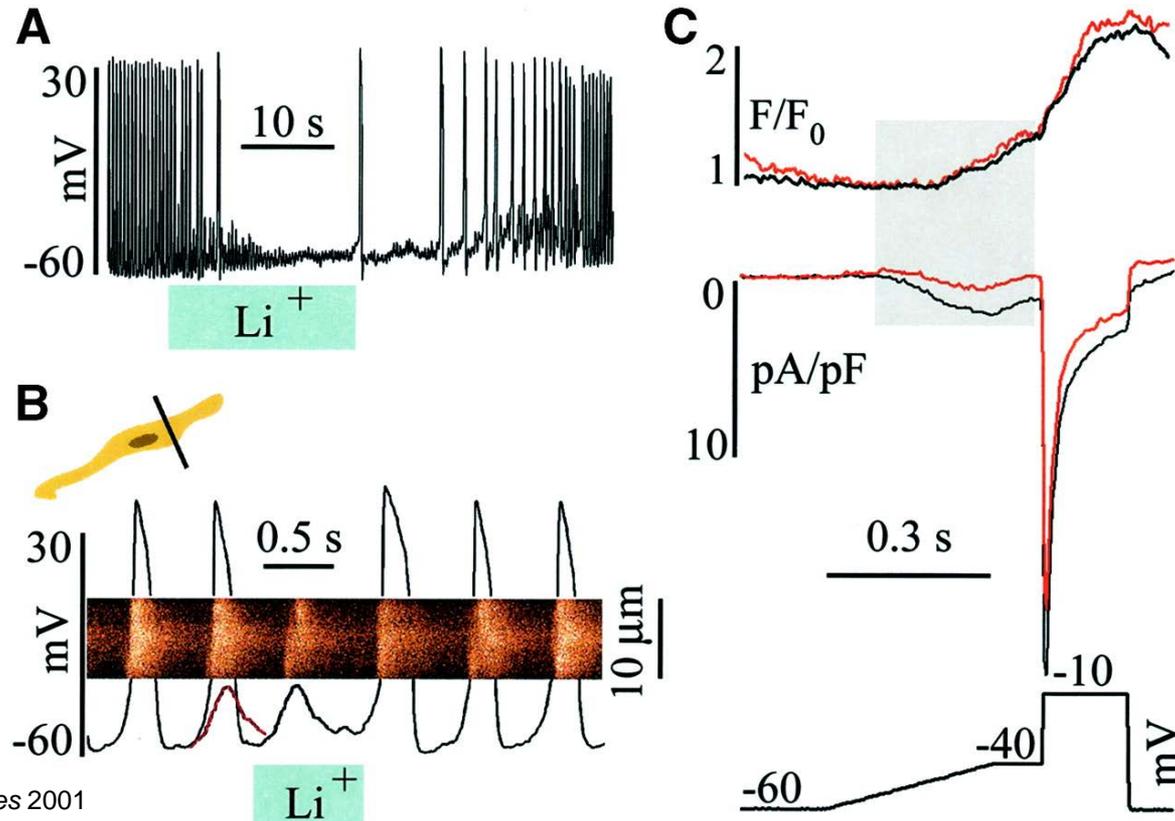
Durante la fase finale della depolarizzazione diastolica (DD) nelle cellule del nodo seno-atriale si osserva liberazione localizzata di Ca^{2+} (LCR) presumibilmente dai recettori della rianodina (RyR) posti sul reticolo subito al di sotto del sarcolemma. La LCR precede la liberazione massiva di Ca^{2+} durante il PdA.

2. La LCR controlla la frequenza spontanea delle cellule del nodo seno-atriale



Il trattamento con rianodina rallenta, in maniera dose-dipendente, la frequenza atriale, riduce la LCR e la corrente in ingresso associata con la DD, lasciando inalterata l'ampiezza della i_{Ca} durante il PdA. Questo dimostra che la liberazione di Ca^{2+} attraverso i RyR del reticolo sarcoplasmatico è cruciale per l'aumento della corrente inward durante la DD.

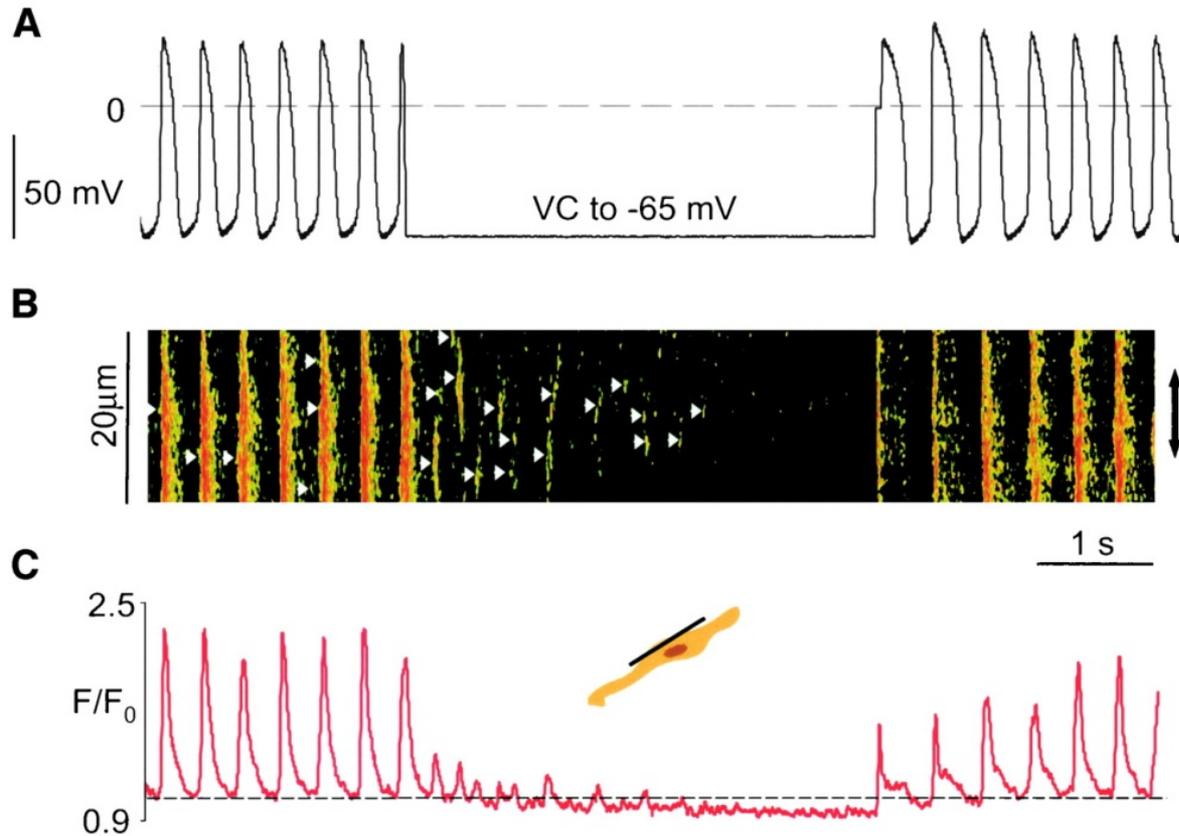
3. Lo scambiatore Na/Ca genera la corrente in ingresso responsabile del superamento della soglia



Bogdanov et al. *Circ Res* 2001

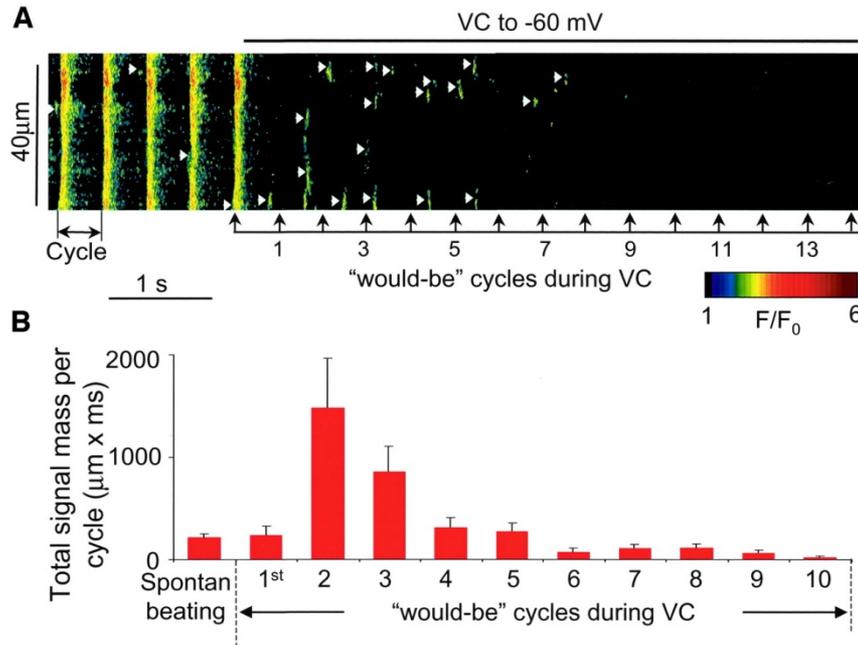
La sostituzione del Na^+ extracellulare con Li^+ , che blocca l'azione dello scambiatore Na/Ca (NCX), abolisce l'attività spontanea attraverso la riduzione della corrente inward durante la DD. La LCR e la i_{Ca} rimangono inalterate. La corrente inward durante la DD è quindi attribuibile all'attivazione dello scambio Na/Ca conseguente all'aumento localizzato della $[\text{Ca}^{2+}]$. Questa corrente viene detta i_{NCX} .

4. La LCR avviene indipendentemente dalla depolarizzazione della membrana

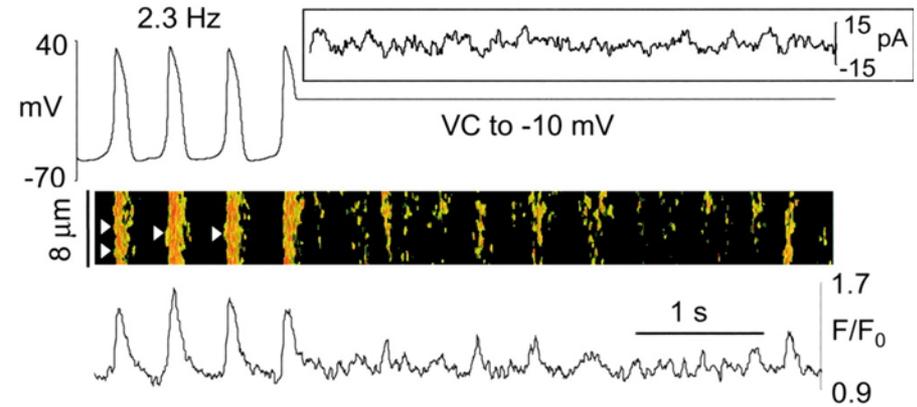


Il blocco del voltaggio impedisce la nascita dei PdA spontanei (A), ma non blocca la LCR, che è presente anche in assenza della depolarizzazione della membrana (B, C)

5. La LCR avviene in maniera ciclica, con un periodo simile a quello dei potenziali spontanei

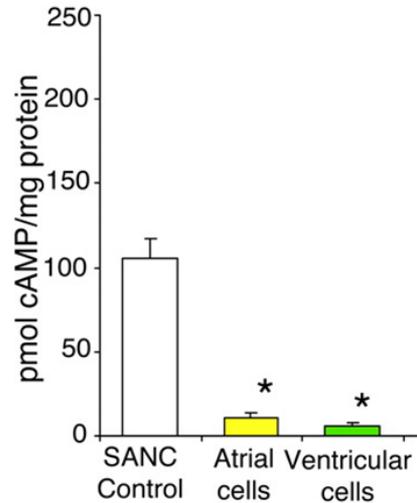


La quantità di Ca^{2+} liberata durante il blocco subito dopo l'ultimo PdA è la stessa di quella liberata in condizioni di controllo (B). L'aumento della LCR nel secondo ciclo "would be" e la sua riduzione nei cicli successivi è spiegabile con i cambiamenti tempo-dipendenti del grado di inattivazione dei RyR e dell'accumulo di Ca^{2+} nel reticolo: la mancata liberazione massiva di Ca^{2+} con il PdA riduce il grado di inattivazione dei RyR e rende meno efficace l'azione di SERCA nel riportare il Ca^{2+} all'interno del reticolo. Il SR si svuota di Ca^{2+} come conseguenza dell'espulsione dello ione da parte di NCX.

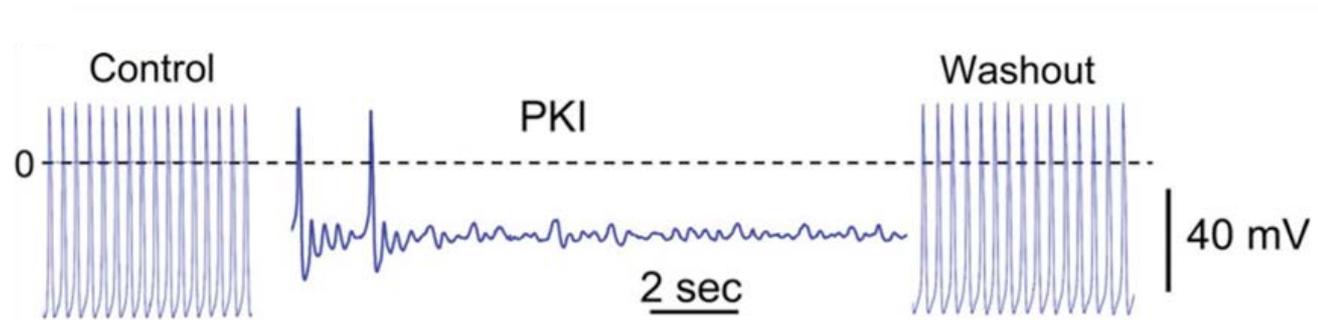


Se la membrana viene bloccata a -10 mV, un potenziale vicino al potenziale di inversione di NCX, l'efflusso di Ca^{2+} durante il blocco è ridotto. Conseguentemente anche lo svuotamento del SR si riduce. In queste condizioni si osserva che la LCR permane per tutta la durata del blocco. Ne riquadro in alto sono mostrate le fluttuazioni di corrente che accompagnano la LCR e sono attribuibili all'attivazione di i_{NCX} .

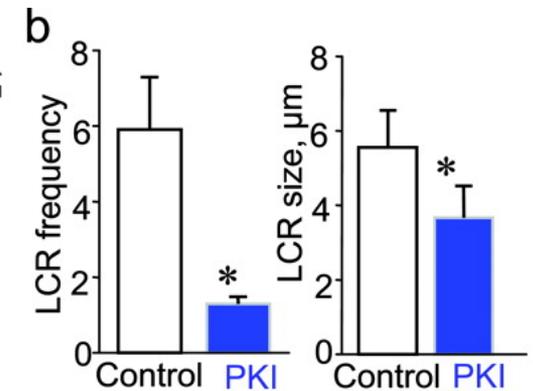
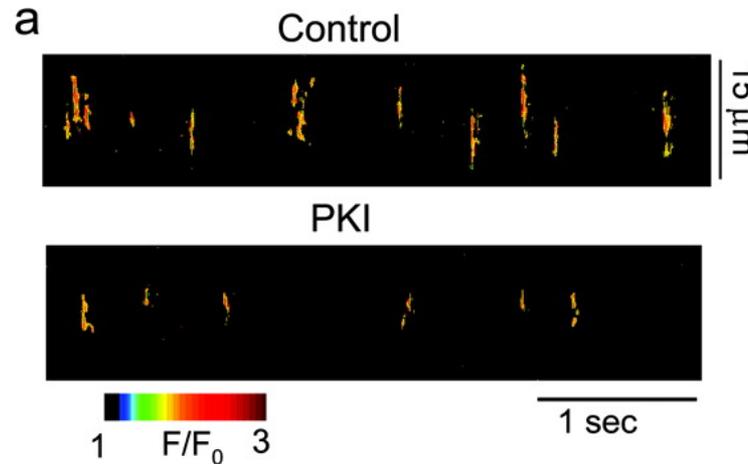
6. La LCR dipende dall'elevato livello basale di cAMP e di attività della PKA nelle SANC



La [cAMP] basale è più alta nelle cellule SAN rispetto a quelle atriali e ventricolari



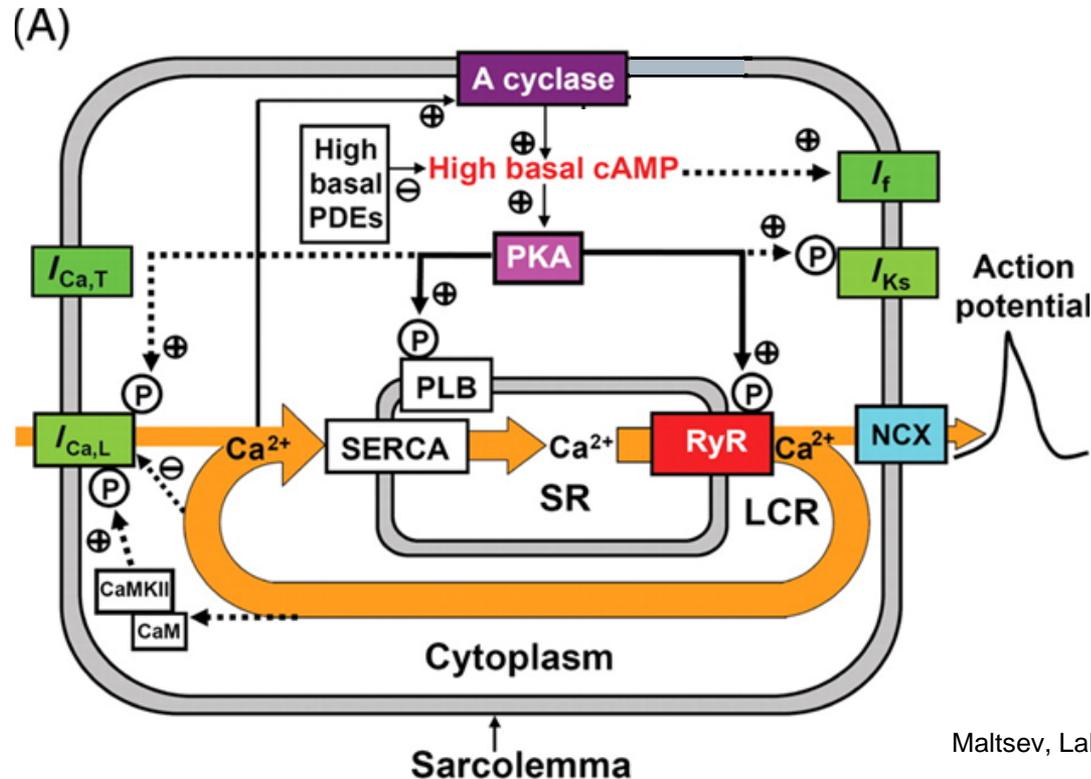
Il trattamento con un inibitore della PKA (PKI, 15 μ M) blocca l'attività spontanea



Mangoni, Nargeot, *Physiol Rev* 2008

Il trattamento con PKI riduce l'ampiezza e la frequenza della LCR. La PKA fosforila proteine bersaglio (RyR, fosfolambano, canali L del Ca²⁺) implicate nel controllo della variazione ciclica della [Ca²⁺].

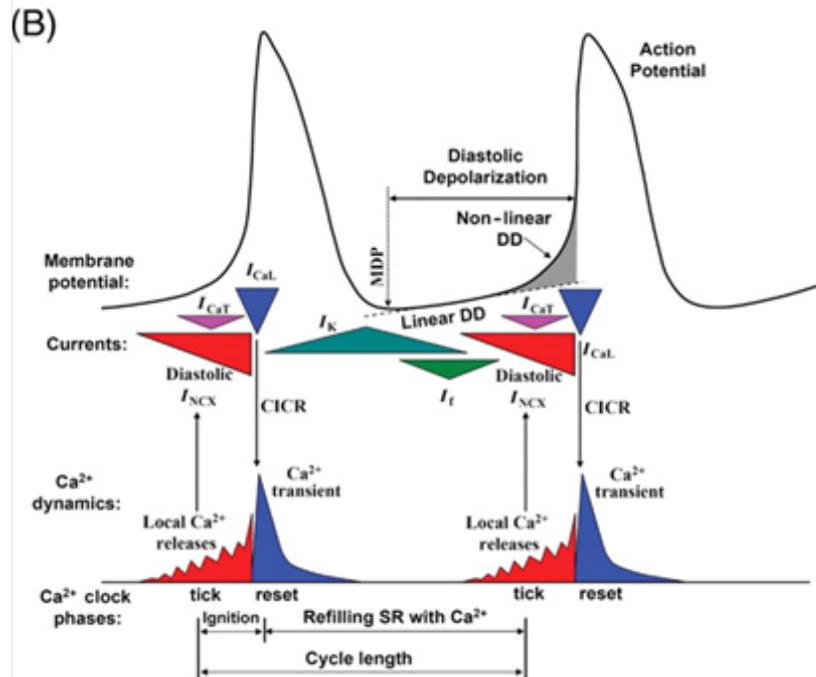
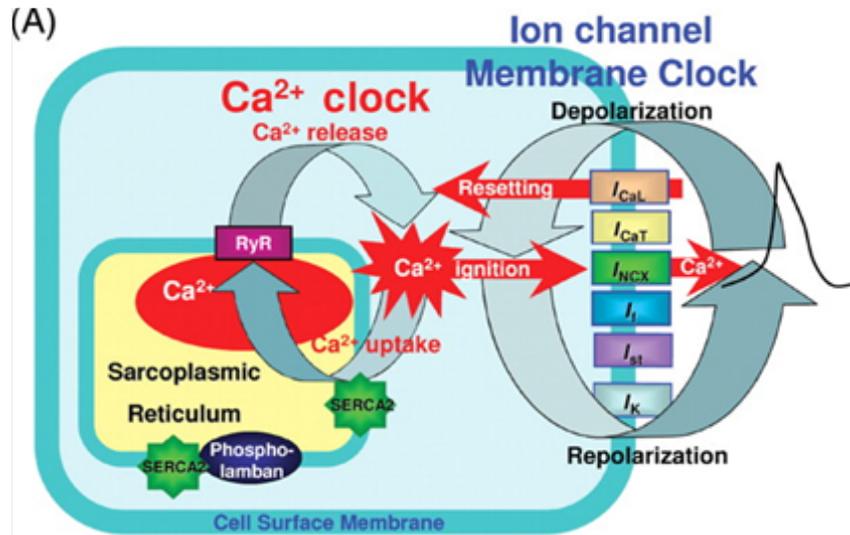
Schema dei meccanismi che contribuiscono alla DD nelle SANC



Maltsev, Lakatta. *Cardiovasc Res* 2008

Il ciclo spontaneo di liberazione e ingresso del Ca (in arancio) nel SR dipende da un'elevata [cAMP]_i, controllata da un'elevata attività adenilato ciclasica e fosfodiesterasica. L'elevato livello basale di cAMP determina l'attivazione dei canali HCN e un elevato livello basale di PKA. L'attività fosforilante della PKA permette il mantenimento di un'adeguata attività dei RyR, dei canali VOC del Ca²⁺ e della SERCA. La LCR attraverso i RyR attiva NCX promuovendo la corrente che accelera la fase finale della DD fino alla soglia, l'ingresso di Ca²⁺ attraverso i VOC contribuisce al mantenimento di un'adeguata [Ca²⁺]_i nel SR, la fosforilazione del PLB mantiene attiva la SERCA.

Schema del meccanismo pacemaker nelle SANC

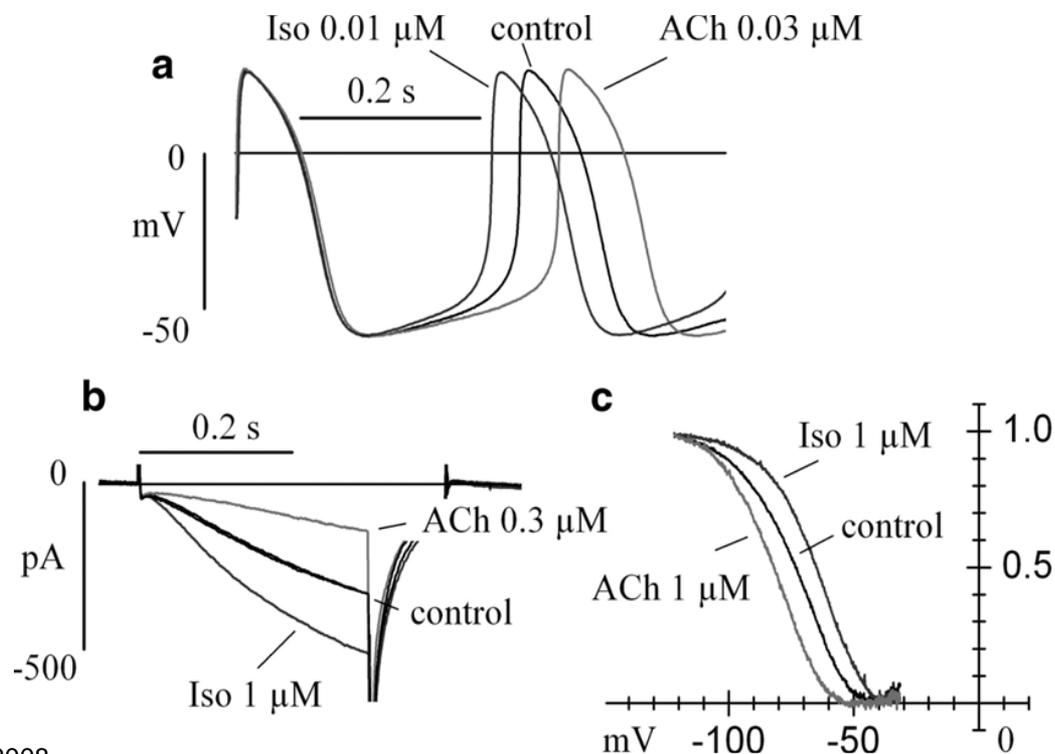


L'attività spontanea nelle cellule pacemaker del nodo seno-atriale è il risultato dell'interazione dinamica di due "orologi": l'**orologio di membrana**, costituito dai canali ionici presenti sul sarcolemma, e l'**orologio del Ca²⁺**, costituito dal SR e dai RyR. L'orologio del Ca²⁺, mediante la liberazione localizzata di Ca²⁺ al di sotto del sarcolemma e lo scambiatore Na/Ca, attiva l'eccitazione della membrana e l'orologio di membrana, attraverso il "calcium induced calcium release", resetta l'orologio del Ca²⁺. Il SR, dopo la liberazione massiva di Ca²⁺, riacquista la capacità di liberare Ca²⁺ grazie all'azione di re-uptake della SERCA.

La DD è pertanto il risultato dell'azione di più fattori che agiscono in concerto per promuovere il raggiungimento della soglia per l'eccitazione della membrana delle SANC. La fase finale, di variazione esponenziale del Vm, è dominata dal processo LCR.

Regolazione nervosa dell'attività pacemaker

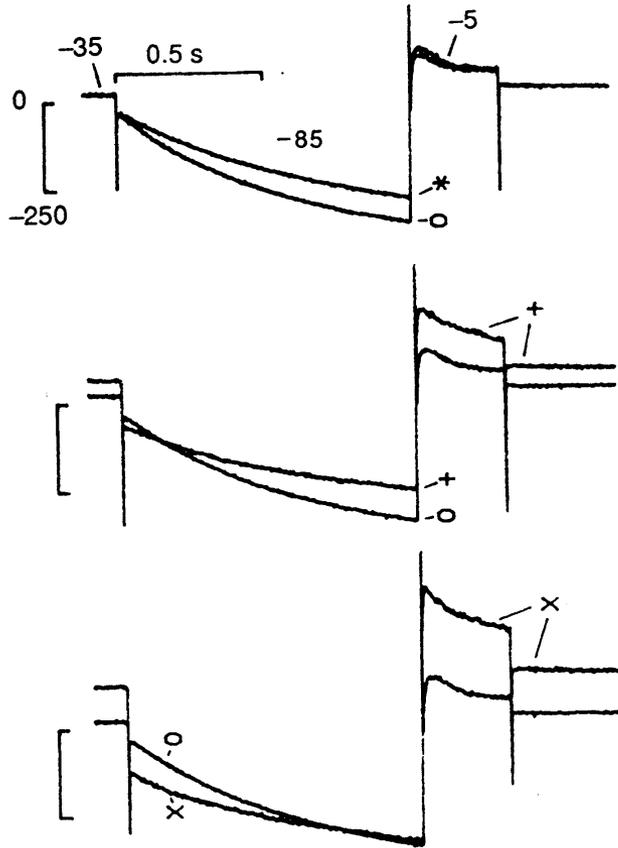
1. Effetti sui canali HCN



Mangoni, Nargeot, *Physiol Rev* 2008

Nel cuore adulto la branca **simpatica** del sistema nervoso autonomo **accelera** la frequenza cardiaca, mentre quella **parasimpatica** la **rallenta**. L'**attivazione dei recettori β -adrenergici** con isoprenalina **aumenta la pendenza della DD (a) e l'ampiezza della corrente i_f (b) e sposta la curva di attivazione dei canali HCN verso potenziali meno negativi (c)**, implicando una i_f piú intensa ad ogni potenziale, durante la DD. L'**attivazione dei recettori muscarinici dell'ACh** determina effetti opposti: **riduzione della pendenza della DD (a), diminuzione dell'ampiezza della i_f (b) e spostamento della curva di attivazione della i_f verso potenziali piú negativi (c)**.

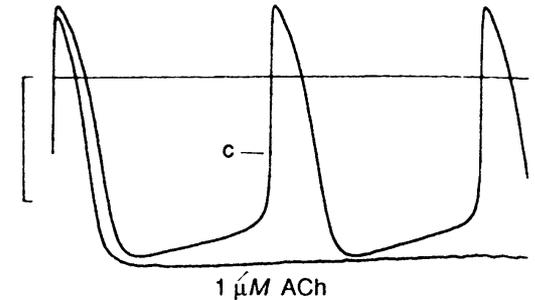
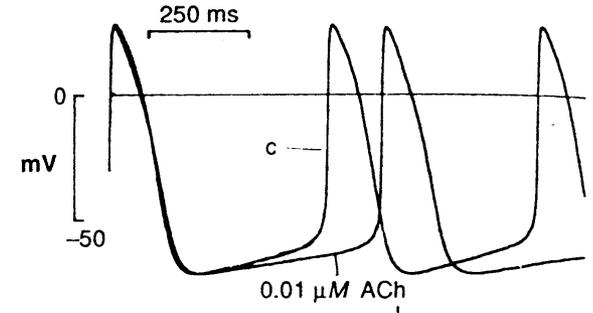
2. Separazione degli effetti dell'ACh sui canali HCN e sui canali del K⁺



L'aggiunta di $0.01 \mu\text{M}$ di ACh (*) provoca la riduzione di i_f in accordo con lo spostamento della curva di attivazione della corrente verso potenziali più negativi.

La corrente è ulteriormente ridotta con ACh $0.1 \mu\text{M}$ (+). In questo caso si osserva anche una variazione nella corrente necessaria per mantenere il V_m a -35 mV (corrente holding) e nel salto di corrente durante lo step da -35 a -85 mV (aumento di g_K).

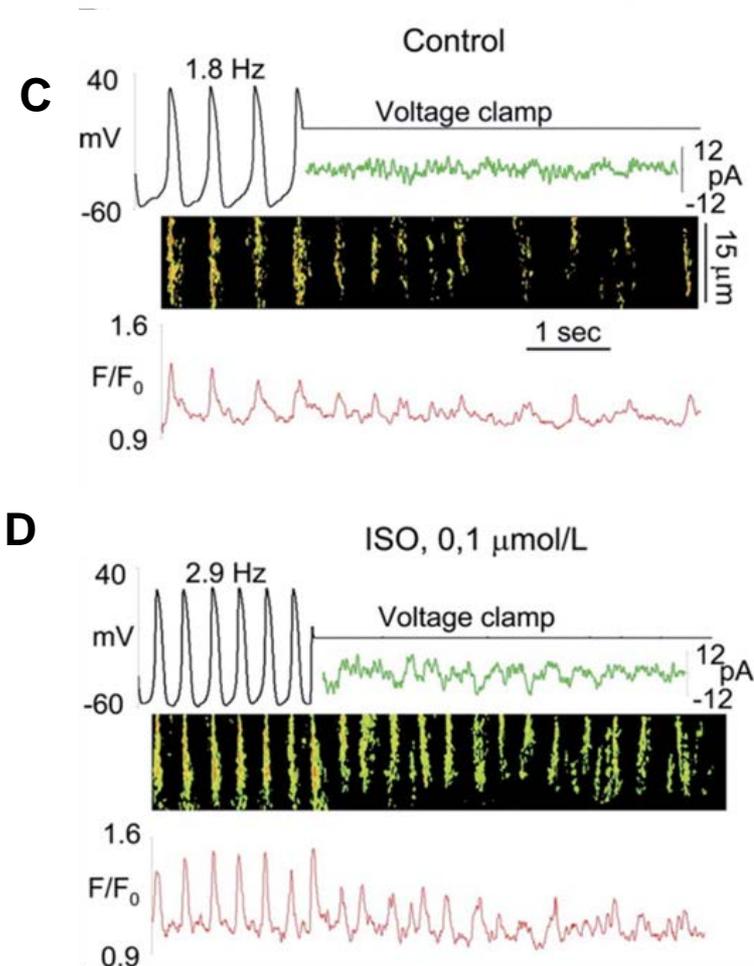
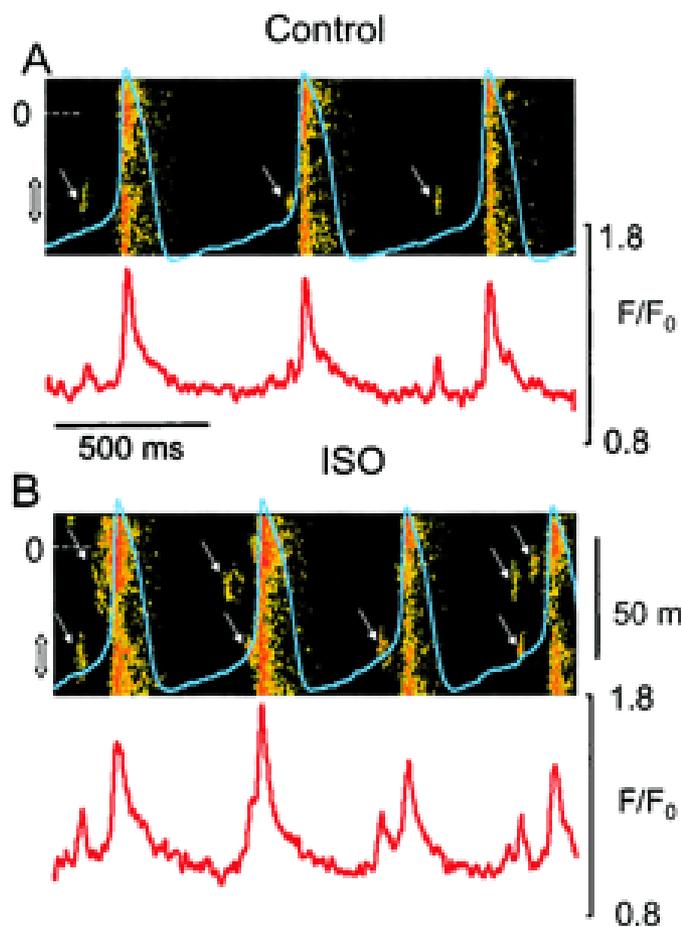
Aumentando ulteriormente [ACh] a $1 \mu\text{M}$ (x) si osserva che i_f rimane pressochè invariata, mentre sia la corrente holding che il salto durante lo step di voltaggio aumentano.



[ACh] = $0.01 \mu\text{M}$ ha effetto solo sulla pendenza della DD, [ACh] = $1 \mu\text{M}$ cambia anche la durata del PdA e iperpolarizza la membrana, in accordo con l'aumento di g_K .

Basse [ACh], $< 0.1 \mu\text{M}$, hanno effetto solamente sulla i_f , mentre concentrazioni più elevate aumentano la g_K attraverso l'attivazione diretta dei canali del K⁺ da parte del complesso $\beta\gamma$ della proteina G.

3.1 Effetti della stimolazione β -adrenergica sulla LCR

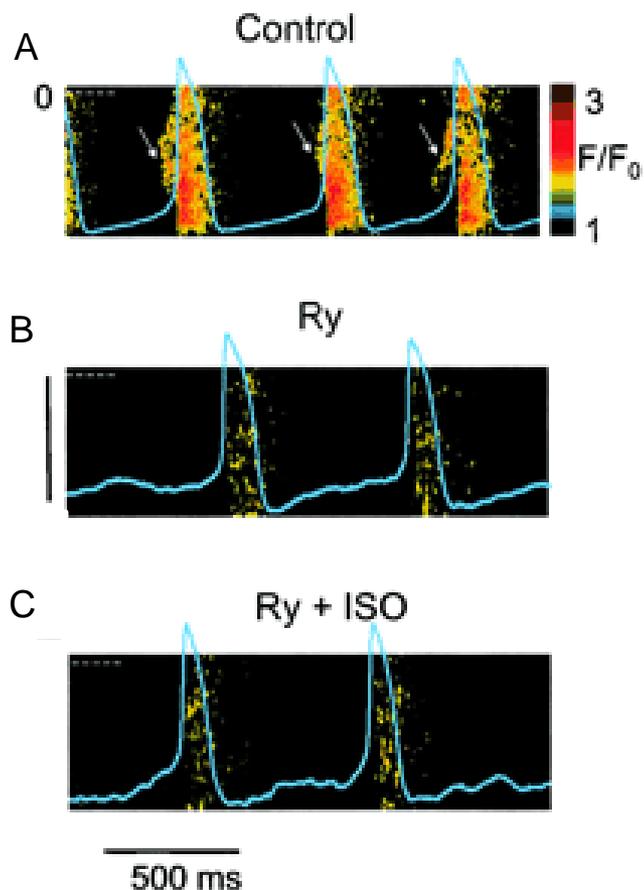


Vinogradova et al. *Ann NY Acad Sci* 2005

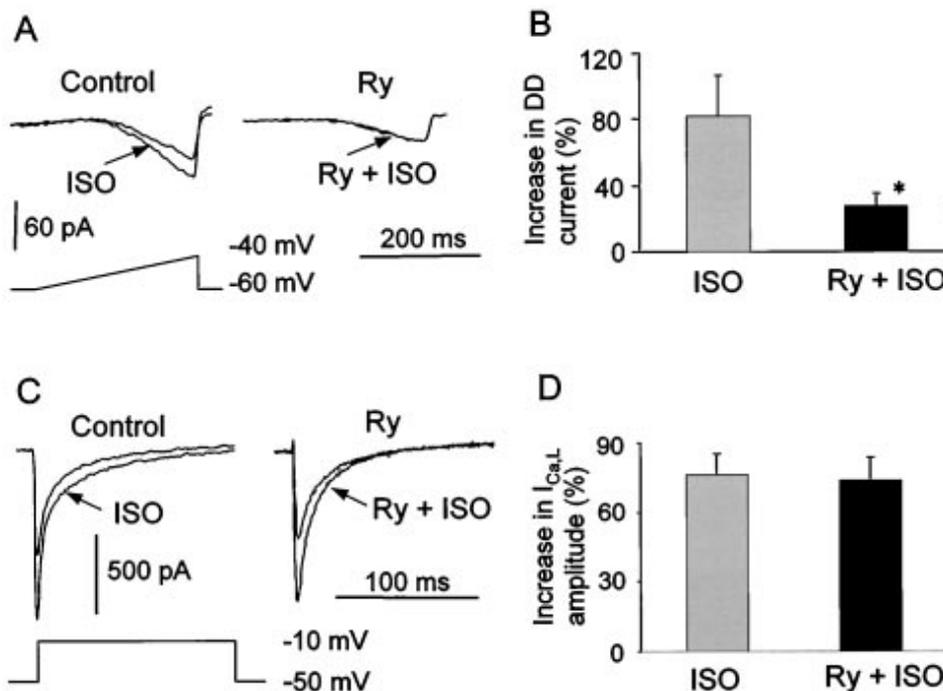
Mangoni, Nargeot, *Physiol Rev* 2008

La stimolazione β -adrenergica aumenta la probabilità e l'ampiezza della liberazione localizzata di Ca^{2+} durante la DD (B). Con il blocco del voltaggio si mette in evidenza l'aumento della LCR indotto dall'isoprenalina. L'aumento delle fluttuazioni di corrente durante il blocco è attribuibile all'aumento della i_{NCX} .

3.2 Effetti della stimolazione β -adrenergica sulla i_{NCX}



Il trattamento con rianodina annulla l'effetto dell'isoprenalina sull'attività pacemaker



Con il blocco del voltaggio si mostra che l'isoprenalina aumenta la i_{NCX} e questo aumento non si osserva in presenza di rianodina. La rianodina non altera la corrente attraverso i canali L del Ca^{2+} indicando che **la stimolazione β -adrenergica ha un'azione diretta sui RyR**. Questo risultato implica anche che **l'effetto cronotropo positivo della stimolazione β -adrenergica dipende dall'aumentata LCR**.