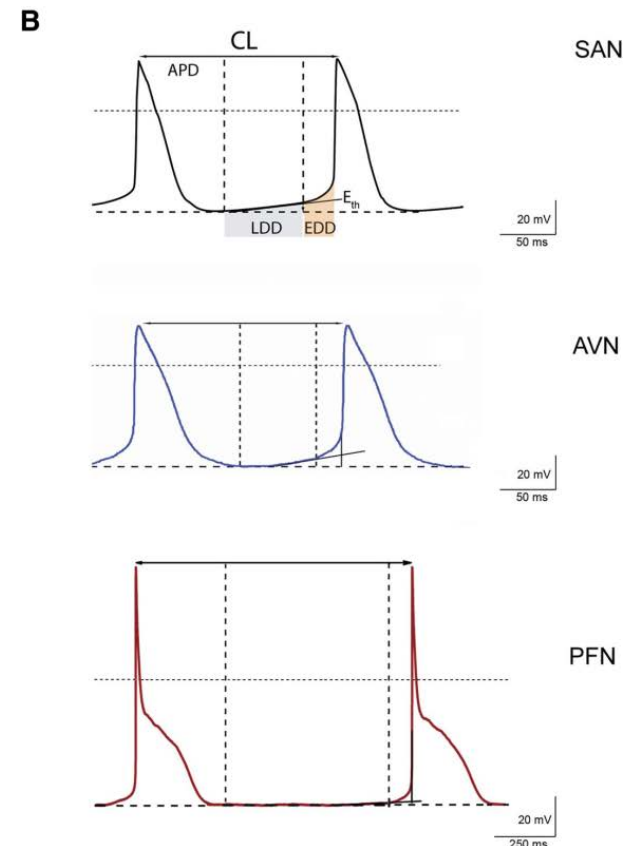
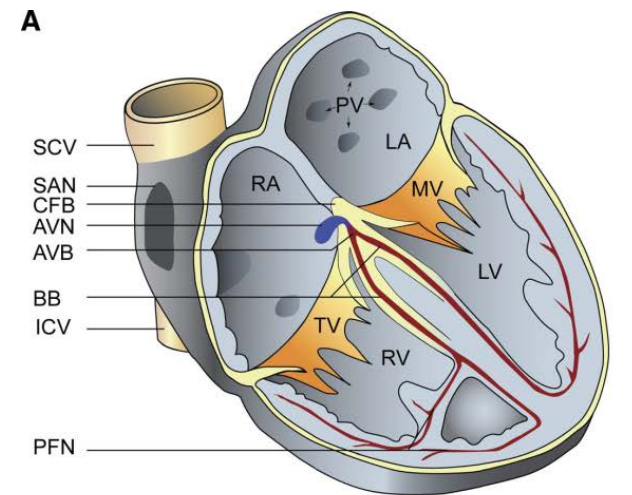


# Meccanismi cellulari e molecolari dell'automatismo cardiaco

- K. Y. Bogdanov, T. M. Vinogradova, E. G. Lakatta. Sinoatrial nodal cell ryanodine receptor and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup> 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.

## Cellule pacemaker cardiache

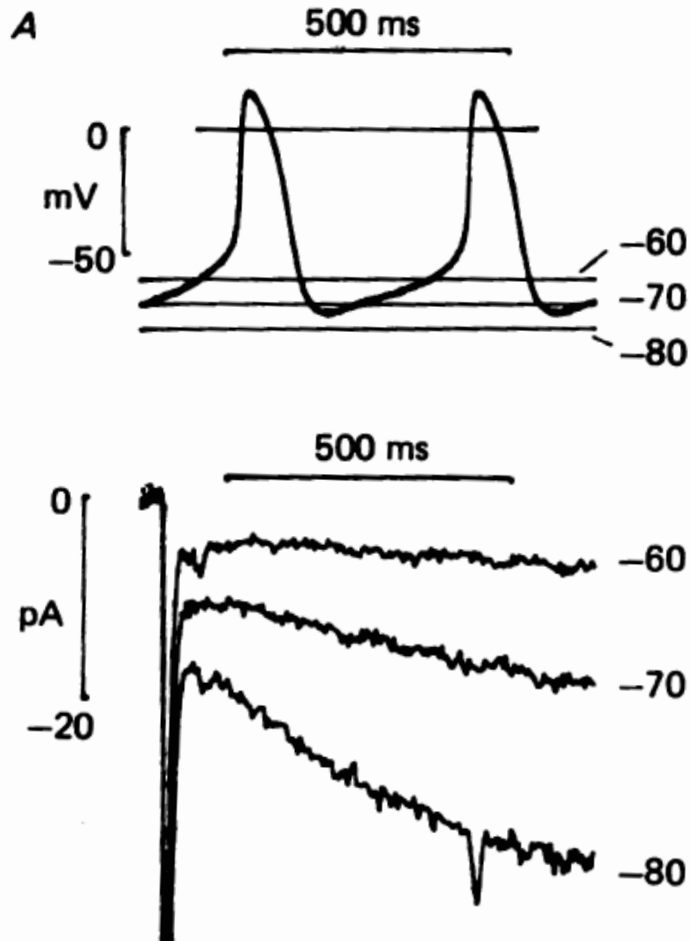
Nel cuore dei vertebrati l'automatismo dipende dall'attività di cellule "pacemaker" specializzate, caratterizzate da bassa contrattilità e dalla capacità di generare oscillazioni periodiche del potenziale di membrana. Le cellule pacemaker, nel cuore di mammifero, sono localizzate nel **nodo senoatriale (SAN)**, nel **nodo atrioventricolare (AVN)** e nelle **fibre di Purkinje (PFN)**. Il potenziale di membrana, durante la diastole, non ha un valore costante, ma diventa progressivamente meno negativo (**depolarizzazione diastolica o potenziale pacemaker**) fino a raggiungere la soglia per la nascita del potenziale d'azione. Nella depolarizzazione diastolica (DD) si distingue una fase lineare (LDD), con pendenza maggiore nelle cellule del SAN (SANC), e una fase esponenziale (EDD) che precede il raggiungimento della soglia.



# Principali canali ionici presenti nelle cellule pacemaker e loro ruolo nella genesi dell'automatismo cardiaco

# Canali f o HCN (1)

Canali voltaggio-dipendenti, attivati da cAMP, permeabili a Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, trasportano una corrente depolarizzante, la  $i_f$ , che si attiva con l'iperpolarizzazione della membrana, tra -50 e -65 mV.



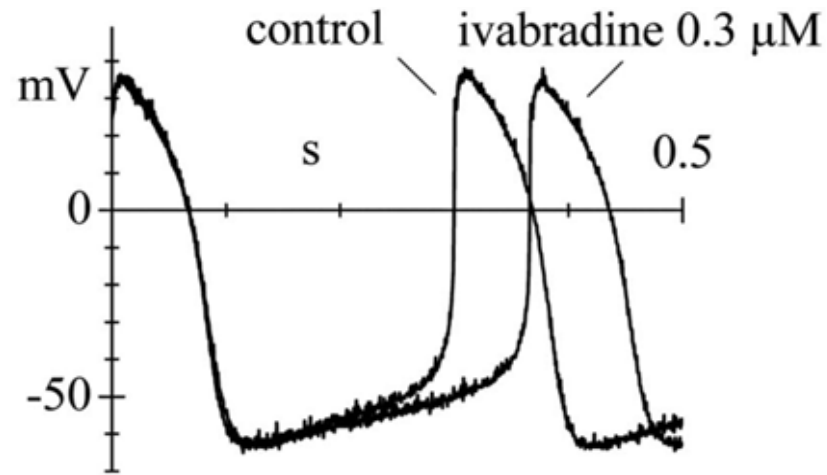
Registrazioni di corrente (pannello inferiore) da cellule SAN isolate in risposta a iperpolarizzazioni di membrana da un potenziale iniziale di -40 mV. Aumentando il grado di iperpolarizzazione da -60 a -80 mV l'ampiezza della corrente inward,  $i_f$ , aumenta.

Nel pannello superiore sono mostrati i potenziali spontanei registrati in assenza di blocco del voltaggio: la DD si verifica a potenziali di membrana ai quali la  $i_f$  è attiva.

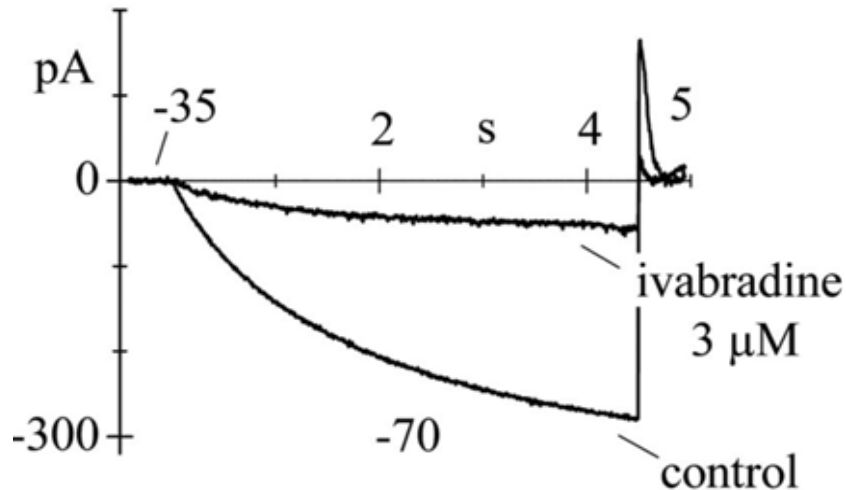
HCN= Hyperpolarization-activated Cyclic Nucleotide-gated channels

## Canali f o HCN (2)

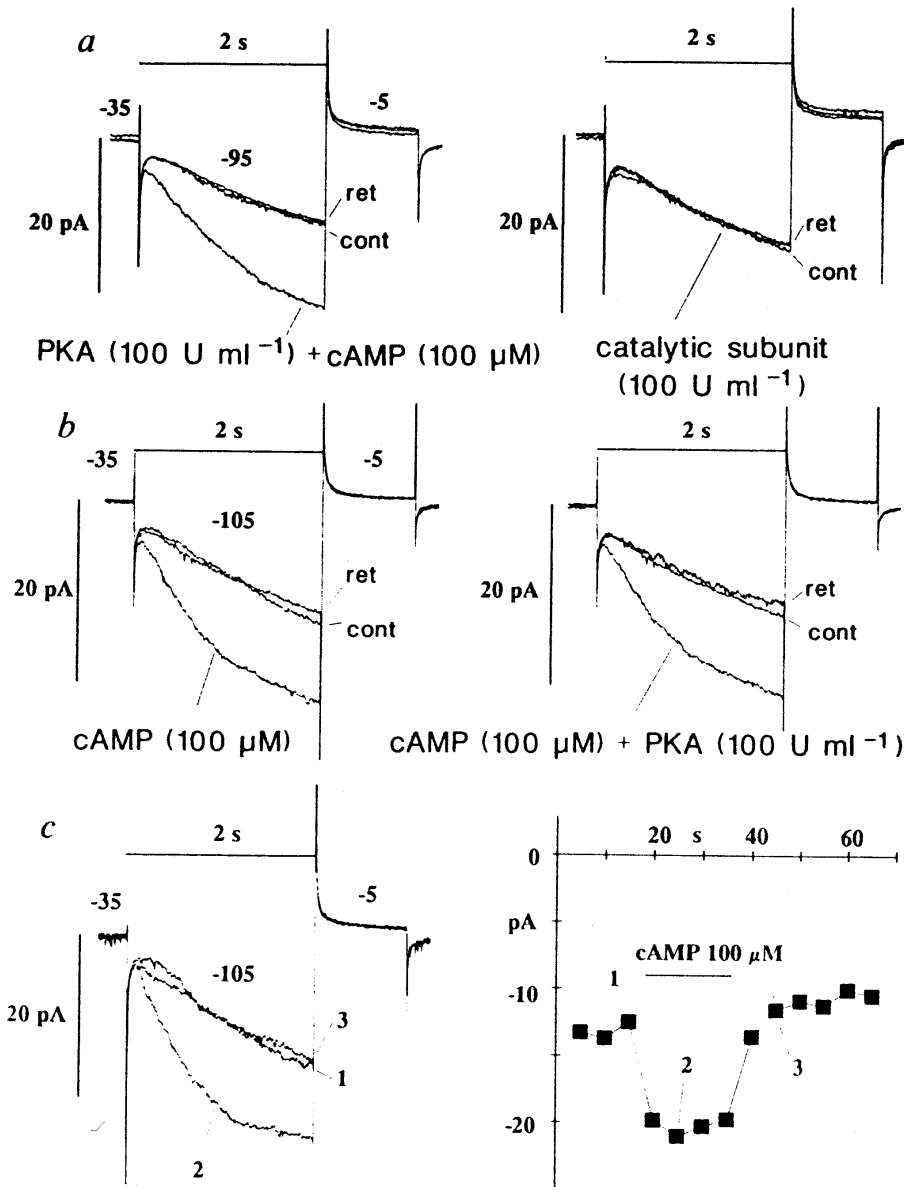
La if è responsabile della fase lineare della DD.



Il trattamento con ivabradina, un farmaco che blocca i canali HCN, riduce la pendenza della fase lineare della DD senza alterare alcun altro parametro del potenziale d'azione



# Canali f o HCN (3)



**Il canale HCN è attivato direttamente dal cAMP**

$i_f$  è registrata da macro patches contenenti centinaia di canali, in configurazione inside out, in risposta a iperpolarizzazioni da -35 a -95 o -105 mV. Pannello **a**: sinistra, l'aggiunta di PKA e cAMP al bagno induce l'aumento di  $i_f$ . Destra: l'aggiunta della sola subunità catalitica della PKA non ha alcun effetto. Pannello **b**: sinistra, l'aumento della  $i_f$  si osserva anche quando viene aggiunto il solo cAMP e l'aggiunta di PKA (destra) non modifica la risposta.

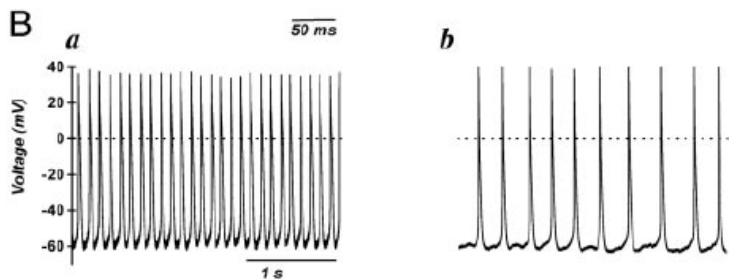
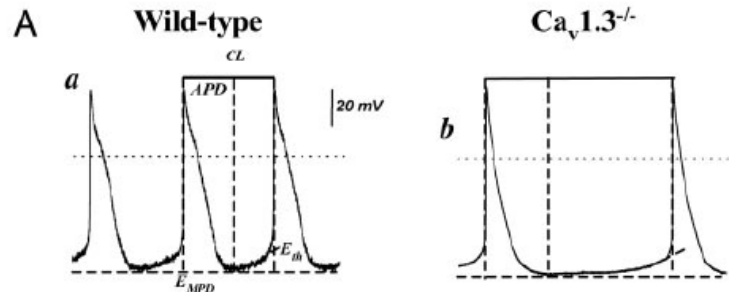
Pannello **c**: sinistra, il cAMP, aggiunto in assenza di ATP, ha ancora un effetto potenziante sulla  $i_f$ . Destra: andamento temporale dell'azione del cAMP.

**Il cAMP agisce direttamente sui canali senza intervento di chinasi.**

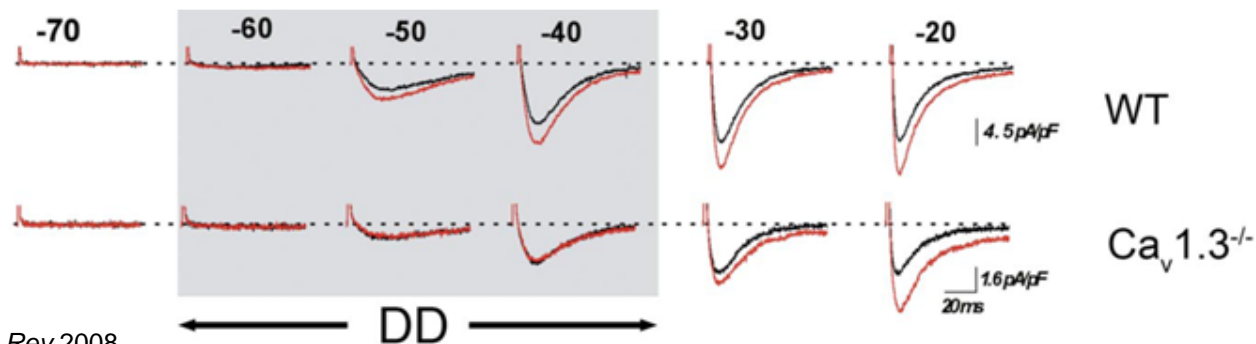
In vivo il cAMP modula la sensibilità del canale al grado di polarizzazione della membrana.

# Canali voltaggio dipendenti del $\text{Ca}^{2+}$ di tipo L

Sensibili alle **diidropiridine** (DHP), si attivano con la depolarizzazione intorno a  $-50$  mV, sono modulati da PKA e CaMKII. Sono coinvolti nella fase di salita del PdA e sembrano implicati anche nella DD.



C



Topi knock out per l'isoforma 1.3 del canale L del  $\text{Ca}^{2+}$  mostrano una riduzione nella frequenza spontanea dei PdA delle SANC rispetto al WT (pannelli A e B).

Nel pannello C sono riportati gli effetti di un attivatore (BayK 8644) della  $i_{\text{Ca,L}}$  (tracce rosse) nei topi WT e  $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$ . Nei topi knock out la corrente di  $\text{Ca}^{2+}$  non è influenzata dall'attivatore per valori di potenziali più negativi di  $-30$  mV, indicando che l'assenza dei canali  $\text{Ca}_v1.3$  abolisce una componente della corrente del  $\text{Ca}^{2+}$  attiva nell'intervallo di potenziali di membrana corrispondenti alla DD.

La risposta che rimane nei topi  $\text{Ca}_v1.3^{-/-}$  è dovuta alla presenza di canali  $\text{Ca}_v1.2$  (canali di tipo L responsabili della fase di salita e di plateau del PdA) e canali  $\text{Ca}_v3$  (canali di tipo T, responsabili di una corrente transiente di Ca a  $V_m$  intorno a  $-50$  mV)

## Canali voltaggio dipendenti del $\text{Ca}^{2+}$ di tipo T

Attivati a voltaggi più negativi rispetto ai canali L, hanno attivazione lenta e inattivazione rapida e possono contribuire alla DD.

## Canali voltaggio dipendenti del $\text{K}^+$

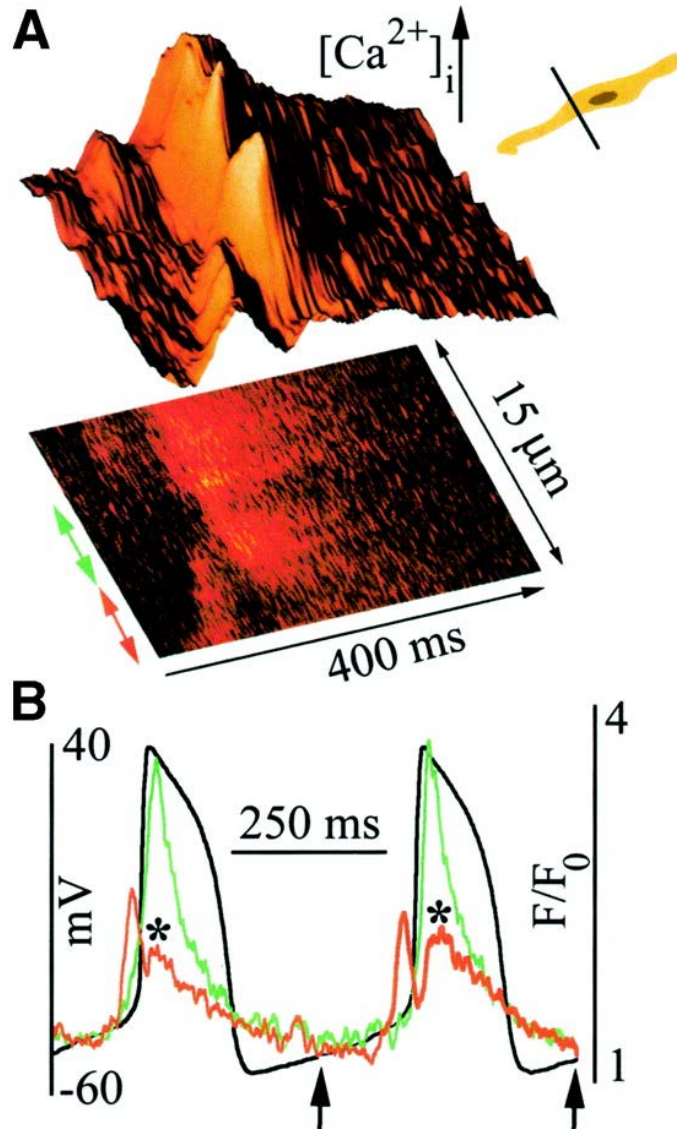
Trasportano correnti iperpolarizzanti di tre tipi: rapida ( $i_{\text{Kr}}$ ), lenta ( $i_{\text{Ks}}$ ) e transiente ( $i_{\text{to}}$ , attivazione rapida seguita da rapida inattivazione).  $i_{\text{Kr}}$  ( $i_{\text{Ks}}$  nelle specie in cui  $i_{\text{Kr}}$  è assente) ha un ruolo significativo nella DD.

$i_{\text{Kr}}$  è principalmente responsabile del valore del massimo potenziale diastolico e della fase di ripolarizzazione del PdA (a cui contribuisce anche  $i_{\text{Ks}}$ ). Poiché i canali Kr hanno rettificazione anomala, durante la ripolarizzazione si osserva una riduzione della resistenza di membrana (la conduttanza di membrana al  $\text{K}^+$  aumenta). La successiva deattivazione dei canali, conseguente alla ripolarizzazione, contribuisce alle fasi iniziali della DD.



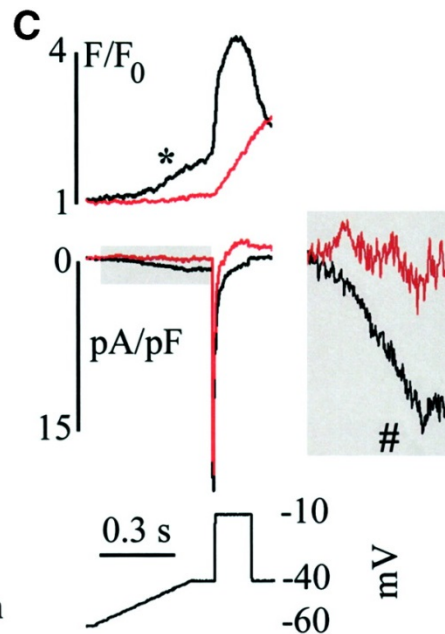
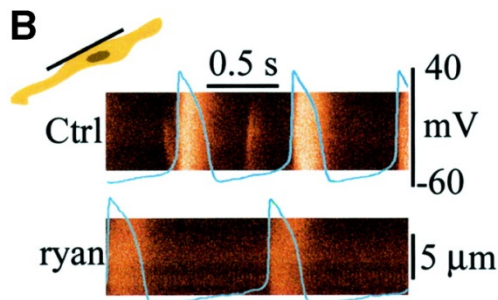
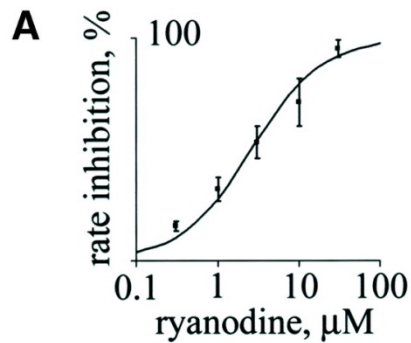
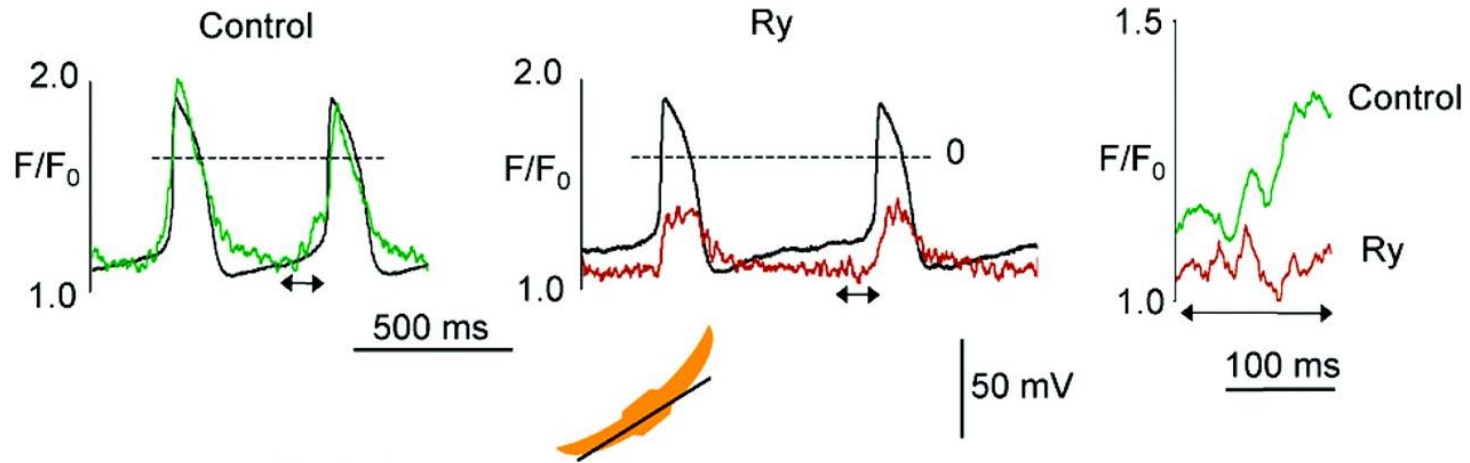
# Ruolo del $\text{Ca}^{2+}$ nella genesi del potenziale pacemaker

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



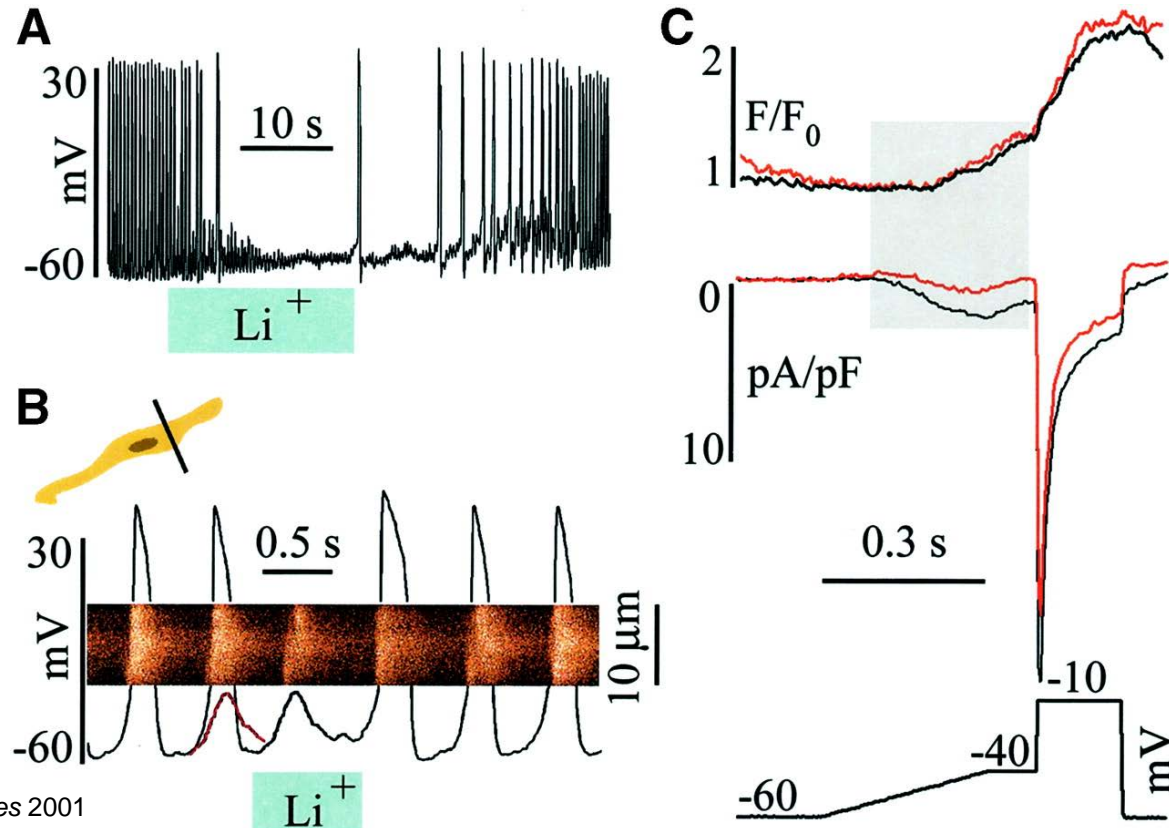
Durante la fase finale della depolarizzazione diastolica (DD) nelle cellule del nodo seno-atriale si osserva liberazione localizzata di  $\text{Ca}^{2+}$  (LCR) presumibilmente dai recettori della rianodina (RyR) posti sul reticolo subito al di sotto del sarcolemma. La LCR precede la liberazione massiva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

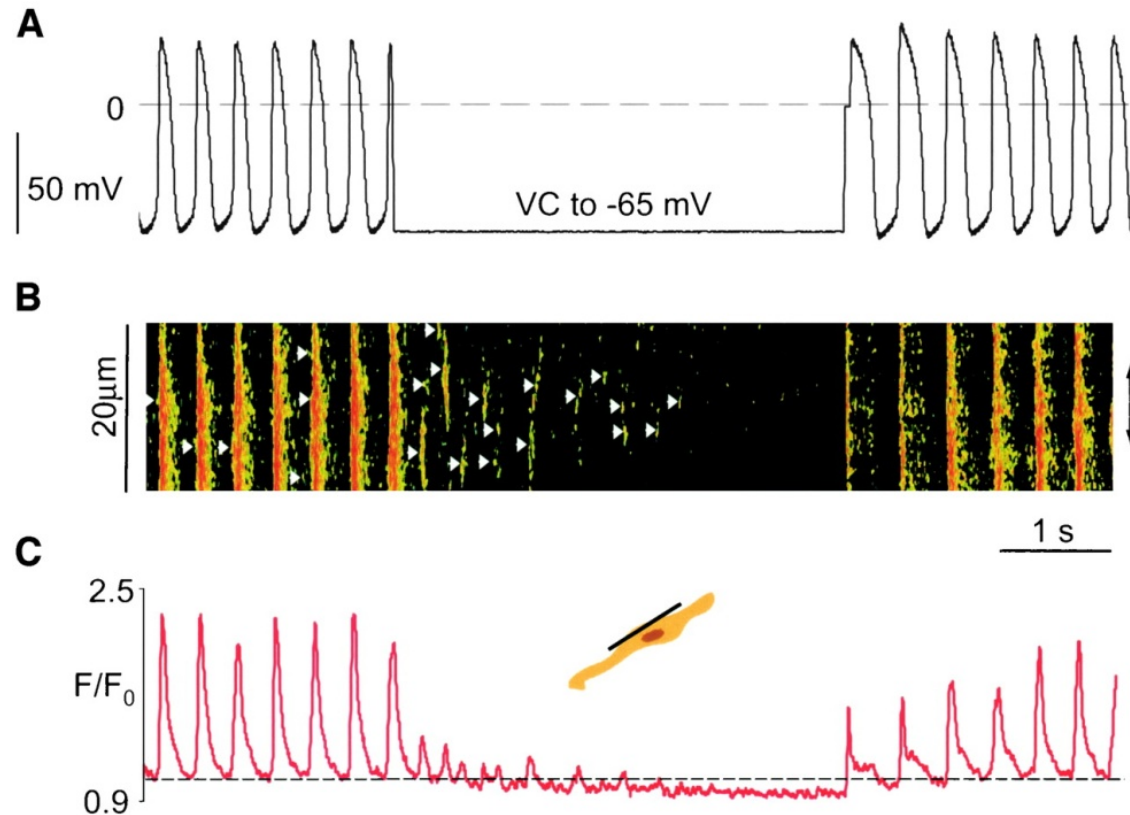
### 3. Lo scambiatore Na/Ca genera la corrente in ingresso responsabile del superamento della soglia



Bogdanov et al. *Circ Res* 2001

La sostituzione del  $\text{Na}^+$  extracellulare con  $\text{Li}^+$ , 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  $i_{\text{Ca}}$  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  $i_{\text{NCX}}$ .

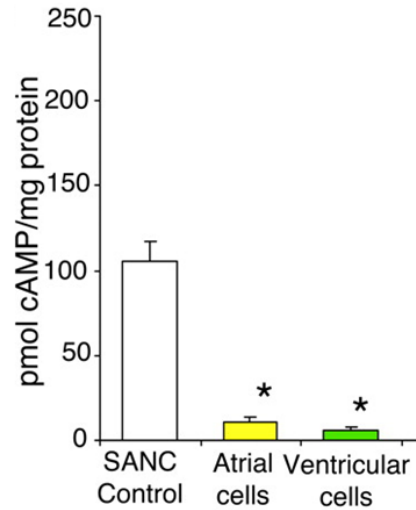
## 4. La LCR avviene indipendentemente dalla depolarizzazione della membrana, in maniera ciclica



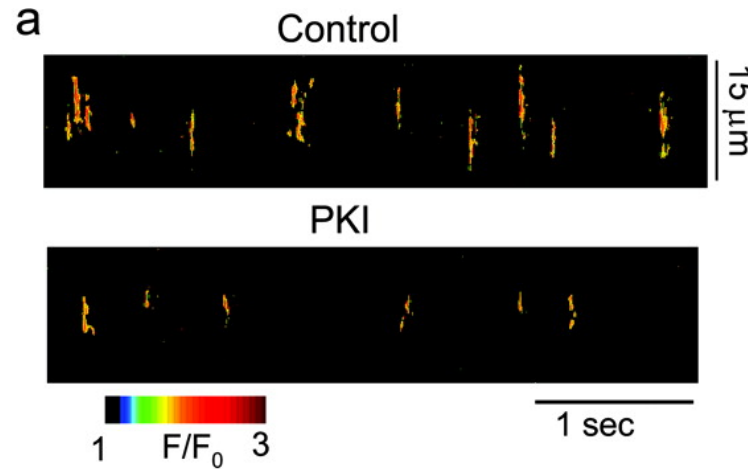
Maltsev, Lakatta. *Cardiovasc Res* 2008

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). La frequenza della LCR è sovrapponibile alla frequenza dei PdA. La scomparsa della LCR con il tempo trascorso dall'inizio del blocco è attribuibile allo svuotamento di  $\text{Ca}^{2+}$  dal reticolo conseguente alla riduzione dell'attività di SERCA (in assenza dei PdA manca la liberazione massiva di  $\text{Ca}^{2+}$  e questo riduce l'efficienza di SERCA nel riportarlo all'interno del reticolo) associata ad una invariata attività dello scambiatore NCX, che espelle  $\text{Ca}^{2+}$  dalla cellula.

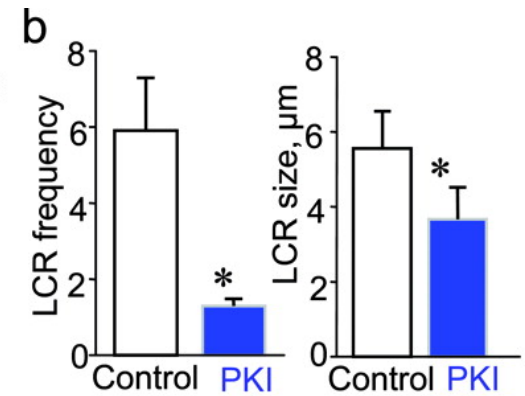
## 5. La LCR dipende dall'elevato livello basale di cAMP e di attività della PKA nelle SANC



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

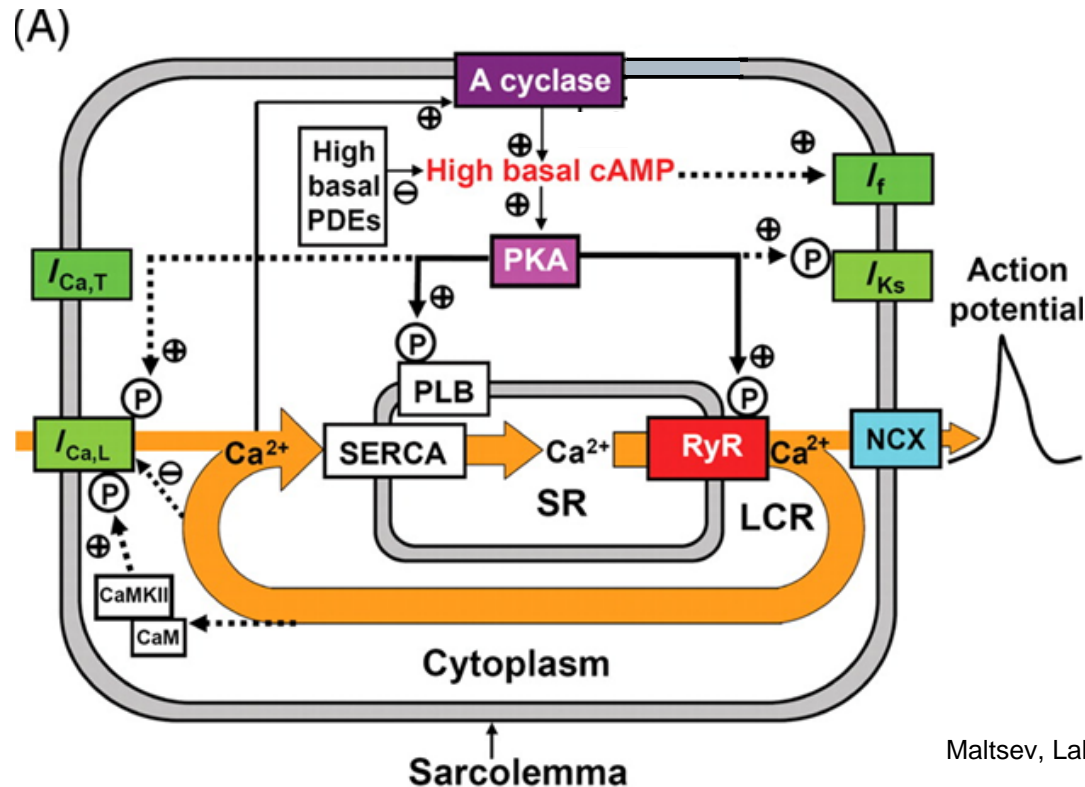


Mangoni, Nargeot, *Physiol Rev* 2008



Il trattamento con un inibitore della PKA (PKI) riduce l'ampiezza e la frequenza della LCR. La PKA fosforila proteine bersaglio (RyR, fosfolambano, canali L del Ca<sup>2+</sup>) implicate nel controllo della variazione ciclica della [Ca<sup>2+</sup>].

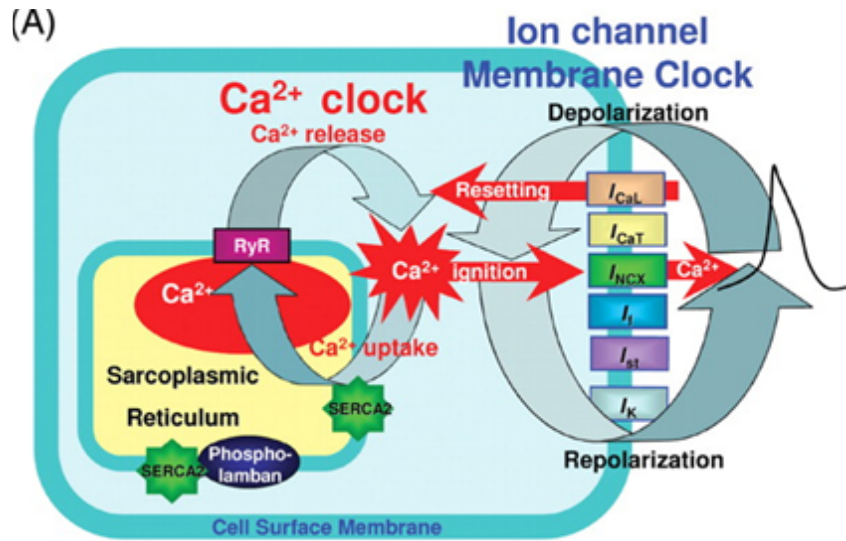
# Schema dei meccanismi che contribuiscono alla DD nelle SANC



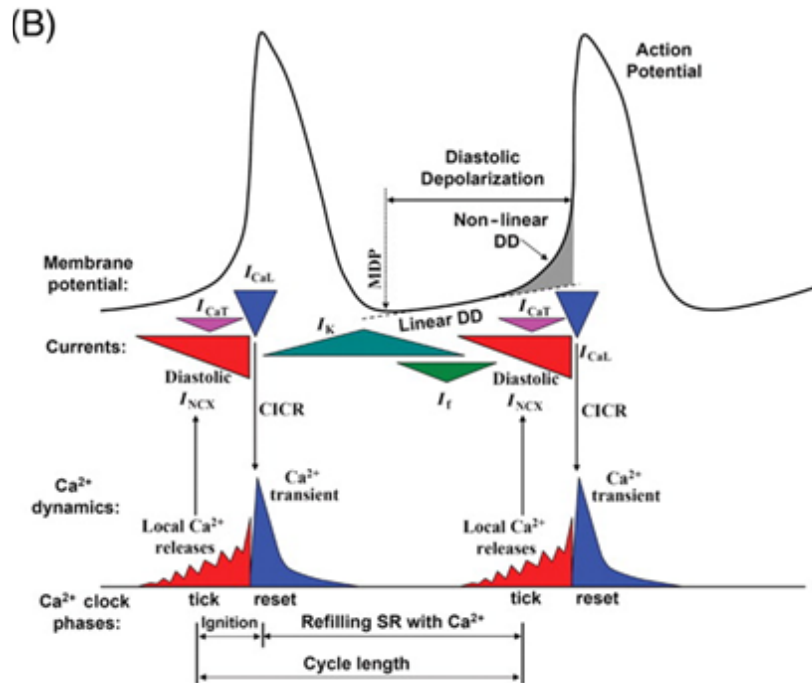
Maltsev, Lakatta. *Cardiovasc Res* 2008

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  $Ca^{2+}$  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  $Ca^{2+}$  attraverso i VOC contribuisce al mantenimento di un'adeguata  $[Ca^{2+}]$  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 Ca<sup>2+</sup>**, costituito dal SR e dai RyR. L'orologio del Ca<sup>2+</sup>, mediante la liberazione localizzata di Ca<sup>2+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup>. Il SR, dopo la liberazione massiva di Ca<sup>2+</sup>, riacquista la capacità di liberare Ca<sup>2+</sup> grazie all'azione di re-uptake della SERCA.

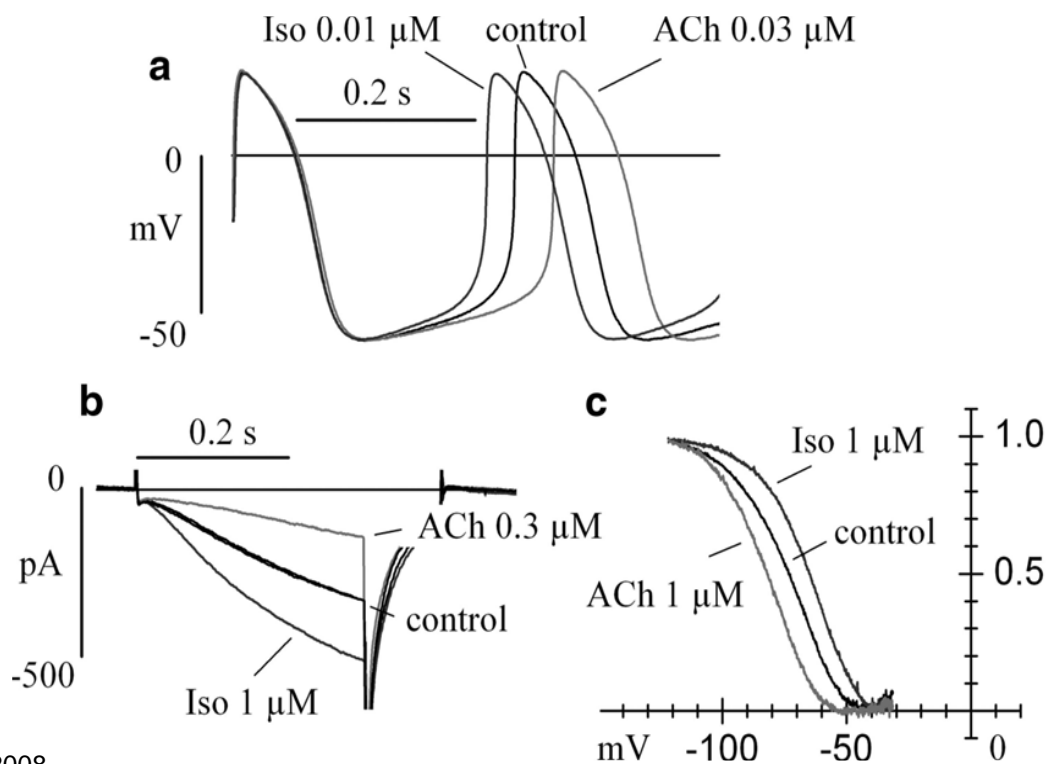


La DD è pertanto il risultato dell'azione di più fattori che agiscono in concerto per promuovere il raggiungimento della soglia per l'eccitazione della membrana delle SANC. La fase finale, di variazione esponenziale del V<sub>m</sub>, è dominata dal processo LCR.



# Regolazione nervosa dell'attività pacemaker

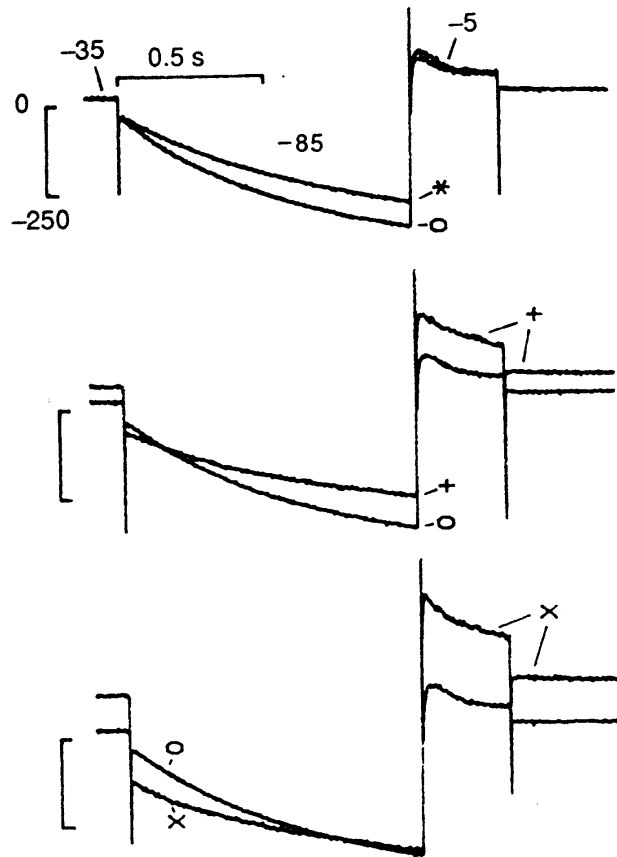
# 1. Effetti sui canali HCN



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  $\beta$ -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)**.

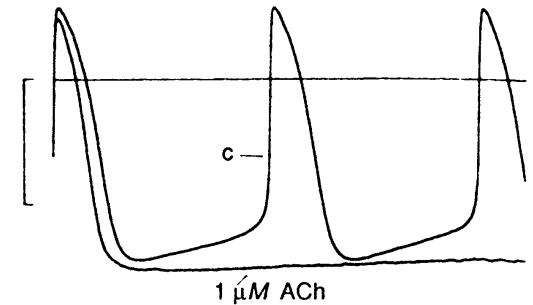
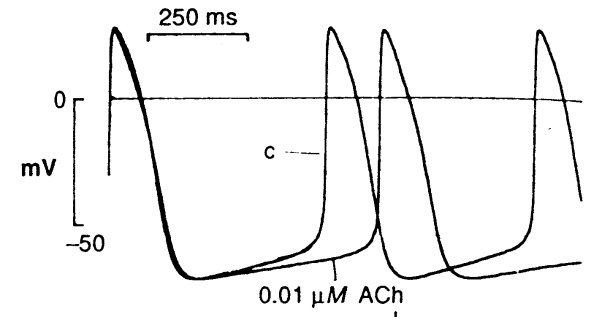
## 2. Separazione degli effetti dell'ACh sui canali HCN e sui canali del K<sup>+</sup>



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  $-35 \text{ mV}$  (corrente holding) e nel salto di corrente durante lo step da  $-35$  a  $-85 \text{ mV}$  (aumento di  $g_K$ ).

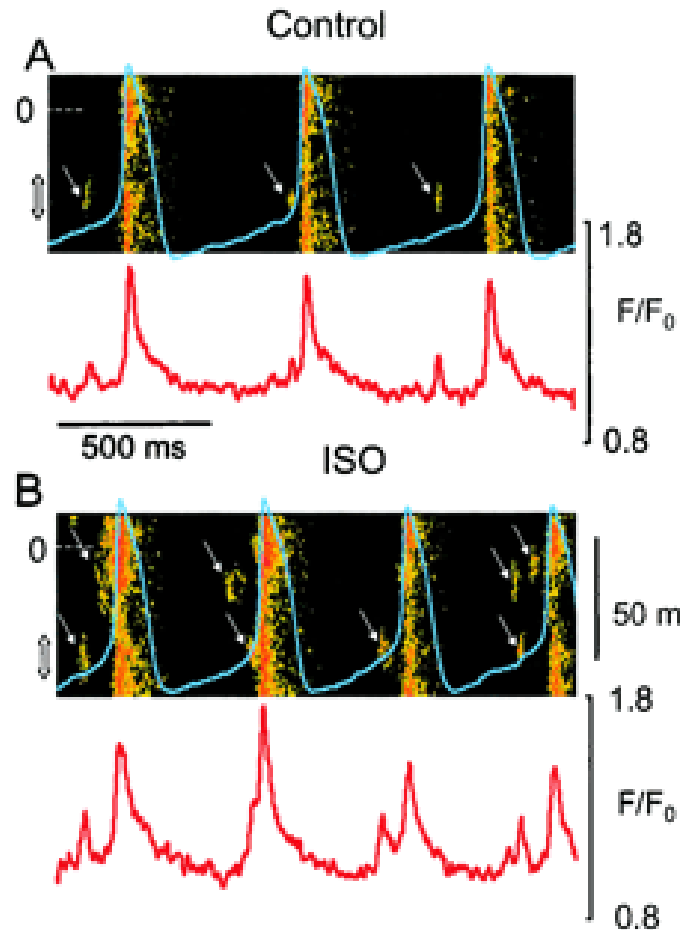
Aumentando ulteriormente [ACh] a  $1 \mu\text{M}$  (x) si osserva che  $i_f$  rimane pressochè invariata, mentre sia la corrente holding che il salto durante lo step di voltaggio aumentano.



[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<sup>+</sup> da parte del complesso  $\beta\gamma$  della proteina G.

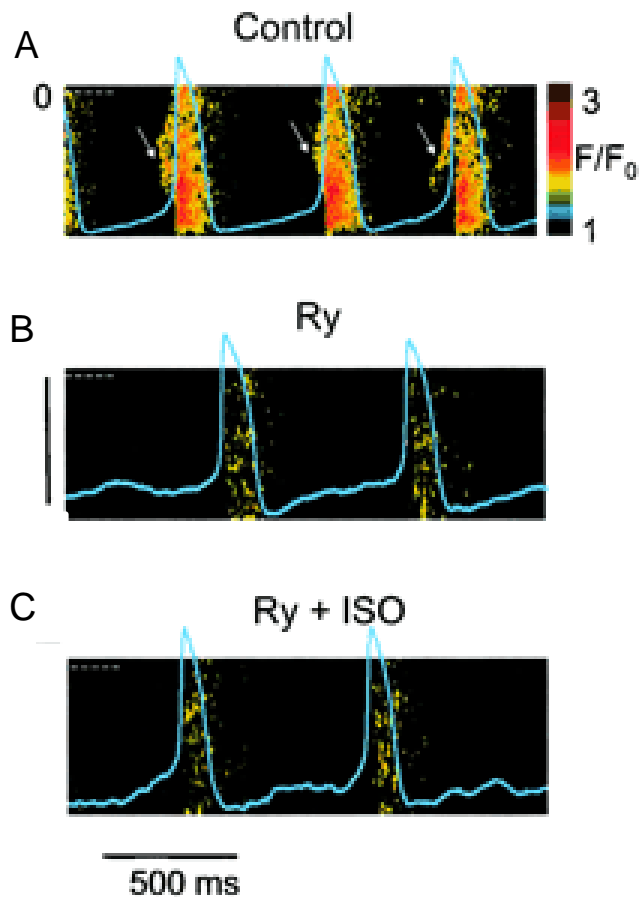
### 3.1 Effetti della stimolazione $\beta$ -adrenergica sulla LCR



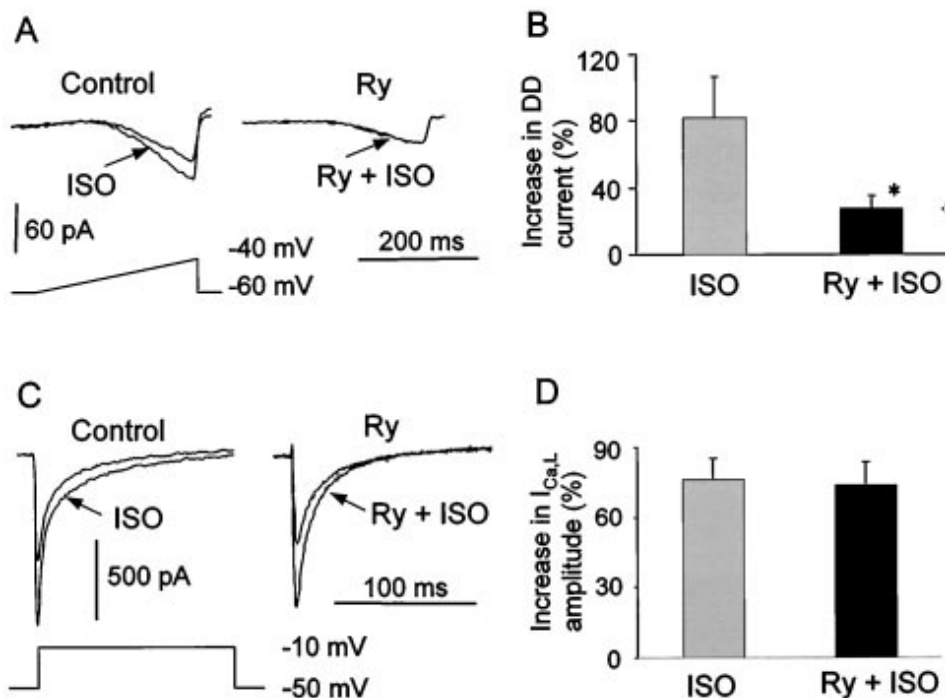
Vinogradova et al. *Ann NY Acad Sci* 2005

**La stimolazione  $\beta$ -adrenergica aumenta la probabilità e l'ampiezza della liberazione localizzata di  $\text{Ca}^{2+}$  durante la DD.** L'aggiunta di isoprenalina determina aumento della frequenza dei potenziali d'azione spontanei (tracce azzurre) associata ad una maggiore LCR (frecche e tracce rosse)

## 3.2 Effetti della stimolazione $\beta$ -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  $\beta$ -adrenergica ha un'azione diretta sui RyR**. Questo risultato implica anche che **l'effetto cronotropo positivo della stimolazione  $\beta$ -adrenergica dipende dall'aumentata LCR**.