

# Canali $I_f$ nell'attività di pacemaker del nodo seno-atriale

Simona Brogioni, Elisabetta Cerbai, Alessandro Mugelli

Dipartimento di Farmacologia Preclinica e Clinica, Università degli Studi, Firenze

**Key words:**

Diastolic depolarization;  
Heart rate-lowering  
agents; Pacemaker  
current.

Heartbeat is initiated by specialized pacemaker cells generating spontaneous impulses in the sinoatrial node (SAN). Twenty years ago DiFrancesco described a current that underlay the diastolic depolarization phase and drove membrane potential towards a threshold where a new action potential starts. This pacemaker current has been named  $I_f$ , f for "funny current" since it activates upon membrane hyperpolarization rather than depolarization, opposite to the most voltage-gated channels. Furthermore, the current is directly modulated by cyclic adenosine monophosphate through a mechanism independent of phosphorylation. Genes encoding for  $I_f$  have been cloned quite recently and named hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels (HCN). The HCN family comprises four isoforms (HCN 1-4). In the SAN, HCN4 is the most highly expressed isoform but HCN1 and HCN2 have also been detected.  $I_f$  modulation is important for controlling cardiac rhythm: the complete block results in a reduction of SAN rate by approximately 20 to 30%. In the last years several drugs able to block the  $I_f$  channels have been studied.  $I_f$  is blocked by organic substances like zatebradine and analogues. Ivabradine is a zatebradine analog that selectively blocks  $I_f$  without affecting other ionic currents that underlie cardiac action potential; thus, it acts specifically on SAN and does not present negative inotropic effects like calcium channel blockers or beta-blockers. Ivabradine blocks the HCN channel when it is open; ivabradine crosses the cell membrane and exerts its blocking action by interacting within the pore loop. At present, ivabradine is the only  $I_f$  blocker approved for clinical use.

(G Ital Cardiol 2006; 7 (Suppl 1-7): 20S-28S)

© 2006 CEPI Srl

Per la corrispondenza:

Prof. Alessandro Mugelli

Dipartimento  
di Farmacologia  
Preclinica e Clinica  
Centro di Medicina  
Molecolare CIMMBA  
Università degli Studi  
Viale G. Pieraccini, 6  
50139 Firenze  
E-mail:  
alessandro.mugelli@  
unifi.it

## Generazione del ritmo cardiaco e ruolo della corrente $I_f$

L'attività intrinseca del cuore ha origine a livello del nodo seno-atriale (NSA) o pacemaker primario situato a livello dell'endocardio nell'atrio destro, tra la vena cava superiore e la vena cava inferiore. Il NSA è formato da cellule altamente specializzate in grado di dar luogo a potenziali d'azione (PA) spontanei i quali, propagandosi per mezzo di un adeguato sistema di conduzione percorrono gli atri giungendo a livello del nodo atrioventricolare (NAV) o pacemaker secondario e da qui, attraverso le fibre del Purkinje, raggiungono rapidamente i ventricoli dando così luogo all'attività ritmica e contrattile del cuore.

All'interno del NSA si può riconoscere una discreta eterogeneità funzionale corrispondente a diversi pattern di espressione di canali ionici e recettori di membrana. Tale eterogeneità si esprime in differenze nella frequenza dell'attività automatica e nella sensibilità a sostanze endogene e farmaci<sup>1,2</sup>. La frequenza cardiaca è teoricamente determinata dall'attività automatica con

frequenza maggiore. Poiché le cellule sinusali sono fra di loro elettricamente collegate, l'attività elettrica di ciascuna cellula influenza quella delle cellule circostanti attraverso correnti elettrotoniche condotte dalle *gap junctions*. L'interazione elettrotonica, la cui intensità è inversamente proporzionale alla resistenza delle *gap junctions*, ha l'importante conseguenza di smorzare le differenze regionali e sincronizzare la scarica fra le cellule. Questo concetto è ben illustrato dall'affermazione che la frequenza sinusale risulta dal "consenso democratico" fra l'attività delle diverse cellule che compongono il NSA<sup>3</sup>. Considerando che sia le dimensioni delle cellule sinusali sia l'ampiezza della corrente che generano sono piccole, la sincronizzazione è probabilmente necessaria a garantire la generazione di una carica elettrica sufficiente alla propagazione dell'impulso al muscolo atriale circostante. Tuttavia, nel NSA il consenso democratico e la risultante sincronizzazione non sono assoluti. Si è infatti osservato che all'interno del NSA è comunque riconoscibile un sito di attivazione precoce (pacemaker dominante) dal quale si genera at-

tività propagata (incompatibile con una sincronizzazione totale). Inoltre, la stimolazione nervosa o l'applicazione di bloccanti di canale (ad esempio, calcioantagonisti) comporta uno spostamento del pacemaker dominante ad una diversa regione del NSA<sup>4,5</sup>.

Molteplici sono le correnti essenziali per il funzionamento del NSA e il profilo del PA è, infatti, determinato dalla corrente netta, risultato della somma algebrica delle diverse correnti (entranti e uscenti) attivate. Il PA è caratterizzato da un potenziale di membrana più negativo durante il potenziale d'azione relativamente positivo, da una lenta velocità dell'*upstroke* (circa 2 V/s)<sup>6</sup> e da una pronunciata fase 4 di depolarizzazione. Le principali correnti responsabili del PA sono correnti depolarizzanti, come la corrente di calcio di tipo L ( $I_{CaL}$ ), la corrente di calcio di tipo T ( $I_{CaT}$ ) e la corrente pacemaker ( $I_f$ ); correnti ripolarizzanti, come la corrente al potassio *delayed rectifier* rapida ( $I_{Kr}$ ), lenta ( $I_{Ks}$ ), ultrarapida ( $I_{Kur}$ ) e la corrente al potassio attivata dall'acetilcolina ( $I_{KACh}$ )<sup>7</sup>. La Figura 1 schematizza il ruolo di queste correnti nelle varie fasi del PA di una cellula del nodo del seno. L'automaticità cardiaca è garantita dalla presenza durante la diastole della corrente pacemaker  $I_f$ , in grado di sostenere la progressiva depolarizzazione del potenziale diastolico. Non sorprende, quindi, che questa corrente sia stata ampiamente oggetto di studio come possibile bersaglio per la regolazione farmacologica del ritmo cardiaco.

### Caratterizzazione della corrente $I_f$ e sua modulazione da parte di fattori endogeni

In un primo momento la corrente pacemaker fu interpretata come una pura corrente al  $K^+$  e chiamata  $I_{K2}$ <sup>8,9</sup>. Vassalle, infatti, nel 1966, "clampò" il potenziale di membrana di una fibra di Purkinje al massimo potenziale diastolico registrando la corrente responsabile della depolarizzazione diastolica. Così osservò una lenta corrente *inward* che si invertiva vicino al poten-

ziale di equilibrio del potassio<sup>9</sup>. Per molti anni si ritenne che l' $I_{K2}$  fosse attivata durante il *plateau* del potenziale d'azione e che, durante la ripolarizzazione, andasse incontro ad un progressivo decadimento. Allo stesso tempo, una corrente costante (o "background") portava il potenziale di membrana a valori sempre meno negativi dando origine alla depolarizzazione pacemaker fino al punto in cui, raggiunta la soglia per le correnti di sodio o di calcio, si generava un nuovo potenziale d'azione.

Nel 1981, DiFrancesco, grazie a nuovi esperimenti condotti nelle fibre di Purkinje, propose una diversa interpretazione delle basi ioniche della corrente pacemaker. Questa venne interpretata non più come il decadimento di una corrente di potassio uscente ( $I_{K2}$ ), bensì come una corrente entrante attivata in iperpolarizzazione<sup>10,11</sup>. Questi nuovi dati deponevano per la possibile identità tra la corrente  $I_{K2}$  nelle fibre di Purkinje e la corrente  $I_f$  descritta alcuni anni prima nel nodo del seno, e hanno gettato le basi per un'interpretazione comune dei meccanismi responsabili dell'automatismo nelle diverse regioni pacemaker del cuore<sup>12</sup>. La  $f$  di  $I_f$  sta per *funny*, in quanto questa corrente presenta alcune singolari caratteristiche. La principale è che  $I_f$  è l'unica corrente voltaggio-dipendente che si attiva in iperpolarizzazione. L'apertura dei canali dà origine ad una corrente in ingresso che si attiva con una cinetica molto lenta. La corrente depolarizza la cellula e il potenziale diastolico raggiunge così la soglia di attivazione delle correnti *inward* depolarizzanti e si ha la genesi di un nuovo potenziale di azione. La corrente è tipicamente e selettivamente bloccata da concentrazioni millimolari di cesio. Un'altra singolare caratteristica risiede nella modulazione del canale, che è regolato direttamente dai nucleotidi ciclici e in particolare dall'AMP ciclico. I livelli intracellulari di AMP ciclico sono aumentati o diminuiti nei cardiomiociti del NSA rispettivamente dalla noradrenalina (che stimola i recettori beta-adrenergici) e dall'acetilcolina (attraverso i recettori muscarinici), che sono i neurotrasmettitori che regolano la frequenza cardiaca<sup>13</sup>.

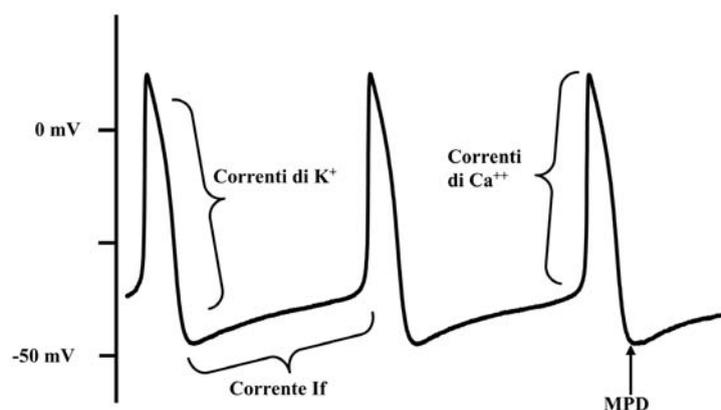


Figura 1. Profilo caratteristico del potenziale d'azione di un cardiomiocita del nodo del seno e principali correnti implicite. MPD = massimo potenziale diastolico.

È importante sottolineare che la fase di depolarizzazione diastolica nasce dall'azione coordinata di numerose conduttanze ioniche, tra le quali la corrente  $I_f$  svolge un ruolo fondamentale, ma non esclusivo. Il ruolo dei canali  $f$  nel controllo della frequenza cardiaca è oggetto di una recente rassegna a cui rimandiamo per approfondimenti<sup>12</sup>. Il canale  $f$  viene attivato dall'iperpolarizzazione della membrana con una soglia che, nella cellula isolata, è di poco positiva rispetto al potenziale diastolico massimo; inoltre, ai potenziali diastolici, la velocità di attivazione della corrente è piuttosto lenta. Quindi, durante un normale intervallo diastolico, viene attivata solo una piccola frazione della conduttanza massima di  $I_f$ ; la corrente che ne risulta è piuttosto piccola (nell'ordine di 0.3 pA/pF), ma comunque significativa rispetto a quella necessaria per sostenere la depolarizzazione diastolica (nell'ordine di 0.1 pA/pF)<sup>14</sup>. D'altro canto, l'incompleta attivazione risulta in un'ampia riserva funzionale di  $I_f$ , che entra in gioco quando la corrente netta disponibile per la depolarizzazione diastolica viene perturbata da influenze esterne<sup>15</sup>. Quando si apre, il canale  $f$  fa passare sia sodio sia potassio, ha cioè una conduttanza "mista" come dimostra il potenziale di inversione della corrente che è intermedio tra il potenziale di equilibrio delle due specie ioniche permeanti<sup>16,17</sup>. La corrente netta che si osserva è una corrente entrante determinata dalla diversa conduttanza del canale per gli ioni sodio (in entrata) e potassio (in uscita).

Come esemplificato in Figura 2, la fine regolazione della frequenza cardiaca si basa principalmente sulla modulazione della pendenza della depolarizzazione diastolica: tanto più questa è ripida, tanto prima viene raggiunta la soglia e innescato il potenziale d'azione successivo e viceversa.

L'AMP ciclico è coinvolto nella modulazione di altre correnti presenti durante la fase di depolarizzazione diastolica come la corrente  $I_{CaL}$  e la corrente  $I_{KACH}$ . Si

deve tenere conto però che mentre il AMP ciclico modula direttamente il canale  $f$ , le correnti di calcio e di potassio sono invece modulate dalla fosforilazione AMP ciclico-dipendente. Durante la diastole,  $I_{CaL}$  e  $I_f$  sono correnti entranti e il loro aumento ha un effetto cronotropo positivo.  $I_f$  è presente fin dall'inizio della diastole e la sua modulazione interessa la velocità globale della depolarizzazione diastolica mentre  $I_{CaL}$  si attiva solo al termine di essa<sup>14</sup> e influenza primariamente la soglia di attivazione del successivo potenziale d'azione e la quantità di corrente disponibile per la sua propagazione.  $I_{KACH}$  è una corrente uscente, la cui attivazione tende a stabilizzare il potenziale diastolico a valori negativi riducendo l'eccitabilità con effetto cronotropo negativo<sup>18</sup>.

L'effetto cronotropo negativo di acetilcolina può quindi dipendere dall'inibizione di  $I_f$ <sup>19</sup> e  $I_{CaL}$  e dall'attivazione di  $I_{KACH}$ , mentre l'effetto cronotropo positivo delle catecolamine può dipendere dalla stimolazione di  $I_f$  e  $I_{CaL}$ . Tuttavia esperimenti su miociti isolati dal NSA hanno evidenziato che, mentre gli effetti della stimolazione beta-adrenergica su frequenza,  $I_f$  e  $I_{CaL}$  avvengono nello stesso ambito di concentrazioni dell'agonista<sup>20</sup>, l'inibizione della  $I_f$  da parte dell'acetilcolina avviene a concentrazioni significativamente più basse di quelle necessarie ad attivare  $I_{KACH}$ <sup>21</sup>.

Gli studi su  $I_f$  hanno contribuito a far conoscere una nuova famiglia di canali, la cui esatta definizione è "attivati in iperpolarizzazione, modulati da nucleotidi ciclici" (*hyperpolarization-activated, cyclic nucleotide-gated channels* [HCN]) e il cui definitivo riconoscimento si è avuto nel 1998 con l'identificazione molecolare dei geni che codificano per queste proteine<sup>22,23</sup>.

Il canale  $f$  è un tetramero formato dall'assemblamento di quattro monomeri corrispondenti a proteine codificate dai geni HCN. In particolare, la famiglia HCN comprende quattro diverse isoforme (HCN1-4) tra loro molto simili (Figura 3). Come tutti i canali vol-

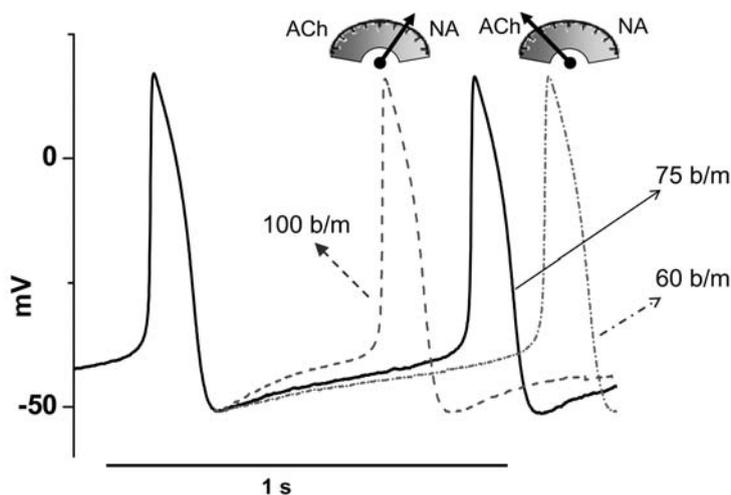
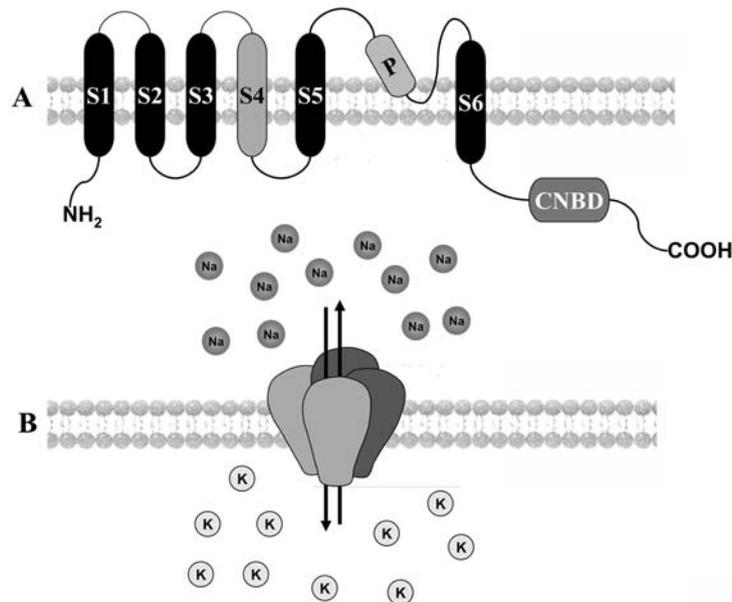


Figura 2. Regolazione della pendenza della depolarizzazione diastolica. Le catecolamine (noradrenalina-NA) e l'acetilcolina (ACh) determinano la frequenza spontanea nelle cellule pacemaker.



**Figura 3.** Struttura del canale ionico attivato dall'iperpolarizzazione del potenziale e regolato da nucleotidi ciclici. Il canale *f* è formato da un tetramero come mostrato in B. Ogni monomero è costituito da sei domini transmembrana (S1-S6). Il dominio S4 ha la funzione di sensore di voltaggio, tra S5 e S6 si trova il poro che permette il passaggio degli ioni Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> (P). Nella parte C-terminale si trova il sito di legame per i nucleotidi ciclici (CNBD).

taggio-dipendenti, ognuna di queste proteine contiene sei segmenti transmembrana ad alfa-elica (S1-S6), di cui S4 è il sensore del voltaggio, un segmento P corrispondente alla zona del poro tra S5 e S6, e, peculiarità che lo distingue dagli altri canali, un sito di riconoscimento per l'AMP ciclico nella regione C-terminale del peptide. Il canale è costituito dall'assemblamento di quattro isoforme le quali possono essere anche differenti tra loro; nel NSA l'isoforma predominante è HCN4, seguita da HCN1 e HCN2<sup>23-26</sup>.

Correnti del tutto analoghe ad *I<sub>f</sub>* e appartenenti a questa famiglia sono state scoperte in diversi tipi di neuroni e nei fotorecettori retinici, e chiamate *I<sub>h</sub>* o *I<sub>O</sub>* e hanno importanza nella regolazione dell'eccitabilità neuronale, della plasticità sinaptica e della visione notturna<sup>27-30</sup>.

### Blocco della corrente *I<sub>f</sub>* da parte di farmaci bradicardizzanti

Nel nodo del seno, la corrente *I<sub>f</sub>* è uno dei determinanti dell'attività pacemaker; il suo blocco completo è in grado di ridurre al massimo del 20-30% la frequenza cardiaca, dal momento che, come già esposto precedentemente, il sistema è sottoposto ad una fine regolazione anche da parte di altre correnti ioniche.

Nella cardiomiopatia ischemica i farmaci attualmente in uso sono i calcioantagonisti e i betabloccanti. L'azione terapeutica di questi farmaci è attribuibile alla riduzione del consumo di ossigeno, all'aumento dell'intervallo diastolico e al conseguente miglioramento del riempimento ventricolare e della perfusione coronarica.

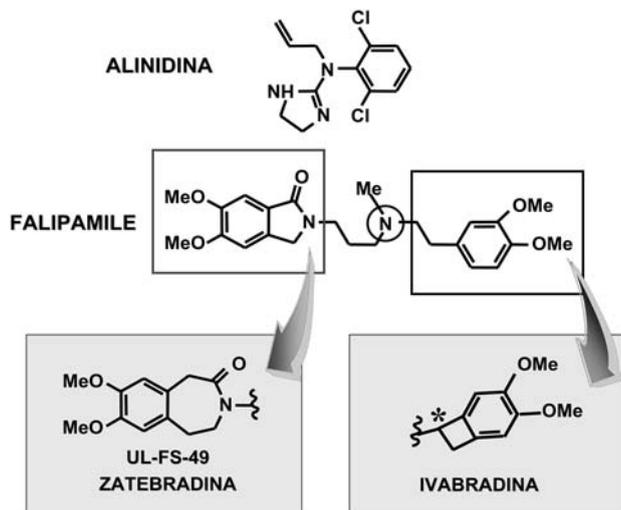
Tuttavia, l'azione di questi farmaci non è selettiva nei confronti del NSA, ma si esplica anche in altri distretti cardiaci ed extracardiaci. Ciò ha indirizzato la ricerca verso la sintesi e lo sviluppo di nuove molecole definite "bradicardizzanti specifici" o *heart rate-lowering agents*<sup>31,32</sup>.

Tali composti fanno parte della famiglia dei bloccanti dei canali ionici, di quella classe di molecole che legandosi a siti recettoriali (aminoacidi) specifici della proteina-canale impediscono il flusso di ioni attraverso il poro del canale stesso. Appartengono a questa famiglia varie classi farmacologiche di ampio uso, come i bloccanti del canale del sodio (antiaritmici, anestetici locali), i calcioantagonisti, che bloccano i canali del calcio di tipo L, e i bloccanti dei canali del potassio (antiaritmici come l'amiodarone), per citare alcuni degli esempi più noti.

La farmacologia del canale *f* è relativamente recente, sia perché il ruolo di questa corrente nel pacemaking è stato a lungo dibattuto<sup>33,34</sup>, sia perché le proprietà biofisiche e molecolari del canale sono state delucidate nel corso degli ultimi anni.

Il precursore dei farmaci bradicardizzanti è l'alinidina (Figura 4), un derivato della clonidina con peculiari proprietà analgesiche e bradicardizzanti<sup>35-38</sup> e con una certa selettività verso i canali *f*. Gli analoghi strutturali dell'alinidina, pur fornendo interessanti informazioni sulla relazione struttura-attività di questa classe di farmaci, non hanno avuto uno sviluppo significativo a causa dei molteplici effetti collaterali.

Maggior successo hanno avuto i derivati del verapamil, tra i quali ricordiamo falipamil, zatebradina e cilobradina. Tutti questi composti si sono dimostrati in grado di bloccare in varia misura il canale *f* e di eserci-



**Figura 4.** Struttura chimica dei principali derivati bradicardizzanti selettivi. L'asterisco indica la presenza di un centro chirale. L'azoto cerchiato ha proprietà basiche essenziali per l'attività di queste molecole.

tare un effetto bradicardizzante<sup>39-46</sup>. Zatebradina, la prima molecola studiata in maniera più approfondita, si distingue dal falipamile per l'anello lattamico a sette atomi che ne aumenta l'attività bradicardizzante. La presenza dell'azoto basico è inoltre indispensabile per l'attività di questo composto; è la forma protonata, infatti, che penetra all'interno del poro aperto e si lega al sito recettoriale<sup>42</sup>. Ivabradina è stata ottenuta dall'irrigidimento della porzione amminica della zatebradina (Figura 4).

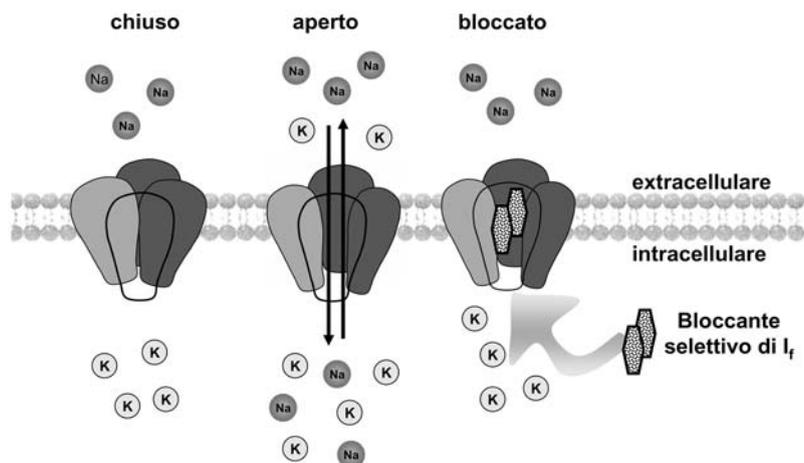
La caratteristica che contraddistingue questa classe di farmaci è il blocco della corrente  $I_f$ . Questa informazione deriva da studi elettrofisiologici condotti in *patch-clamp*, la tecnica che consente di vedere la funzione di una proteina-canale direttamente e di misurare all'istante l'inibizione di tale funzione. Durante la fase diastolica, il canale si apre consentendo l'ingresso di ioni sodio che generano una corrente depolarizzante (fa-

se di depolarizzazione diastolica). Una caratteristica comune dei "bradicardizzanti selettivi" è la loro lipofilità; essi penetrano liberamente la membrana plasmatica e si inseriscono all'interno del poro del canale dal lato citoplasmatico quando è aperto e lo bloccano<sup>40,42</sup> (Figura 5).

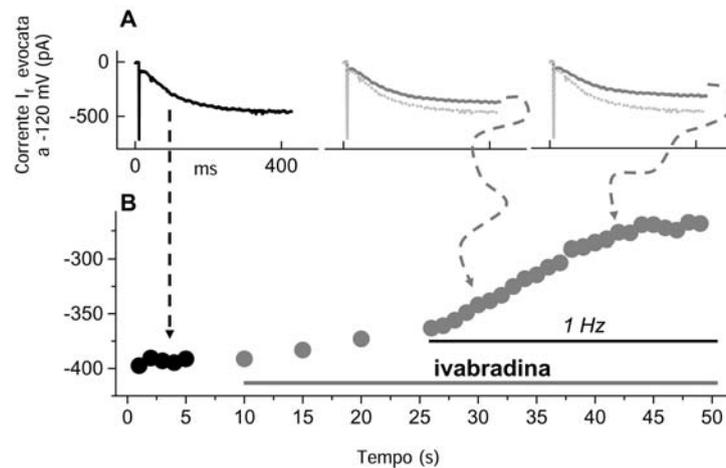
Una caratteristica fondamentale del blocco del canale da parte di ivabradina è che riduce la conduttanza del canale, ma non ne modifica la voltaggio-dipendenza, cioè le proprietà biofisiche<sup>12,43</sup>.

Un'altra proprietà essenziale di questi bloccanti e in particolare di ivabradina è l'uso- e frequenza-dipendenza. Questa proprietà è esemplificata nella Figura 6, che descrive il *time-course* del blocco di  $I_f$  in funzione della frequenza con cui la corrente è evocata. Nel pannello B abbiamo riportato la misurazione della corrente nel tempo; in assenza di farmaco (cerchi neri) l'ampiezza di  $I_f$  è praticamente costante durante una stimolazione ripetuta a 1 Hz (60 impulsi/min). Se dopo l'aggiunta del farmaco (cerchi grigi) viene mantenuta una bassa frequenza di stimolazione (10 impulsi/min), la corrente rimane pressoché simile a quella del controllo ma, appena la frequenza di stimolazione è riportata a 1 Hz, si instaura un progressivo blocco della corrente che si completa nell'arco di alcune decine di s. Questo comportamento è tipico di un'interazione farmaco-canale che dipende dallo stato biofisico del canale stesso, e quindi dai cicli di apertura e chiusura<sup>47</sup>. A parte le considerazioni molecolari, l'uso- e frequenza-dipendenza dell'azione di ivabradina si traduce in un effetto farmacologico maggiore alle più alte frequenze cardiache, cioè in quelle condizioni in cui la sua utilità clinica è più importante.

Come abbiamo descritto in precedenza, l'interazione farmaco-canale è strettamente correlata alla cinetica di apertura-chiusura del canale stesso. Ivabradina, zatebradina e cilobradina condividono la capacità di bloccare il canale quando esso è aperto, perché trovano accesso dal versante intracellulare ai residui aminoacidi-



**Figura 5.** Meccanismo d'azione dei farmaci bradicardizzanti selettivi. I bradicardizzanti selettivi attraversano la membrana plasmatica agendo dall'interno. Quando il canale è aperto le molecole vi penetrano interagendo con sequenze aminoacidiche specifiche.



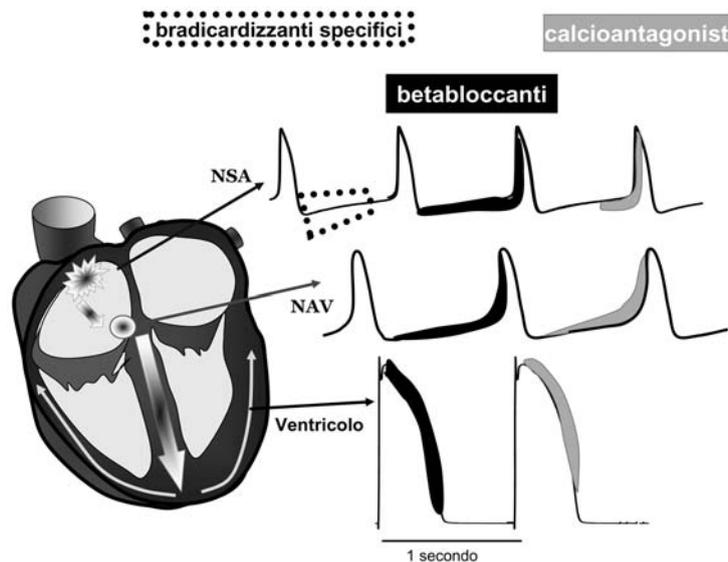
**Figura 6.** Effetto frequenza-dipendenza dei bradicardizzanti selettivi. Tipico esperimento di voltage clamp su un miocita del nodo del seno. Dopo l'esposizione al farmaco bradicardizzante l'ampiezza della corrente  $I_f$  diminuisce progressivamente. Se la corrente viene evocata a frequenza maggiore (1 Hz) il blocco si manifesta più rapidamente (pannello B). Il pannello A mostra le tracce della corrente registrate durante l'esperimento.

ci collocati all'interno del poro medesimo. Ripartiamo da questo punto per capire ciò che distingue ivabradina dalle altre molecole e che la rende peculiare nei confronti del canale  $f$  e, di fatto, ne aumenta la specificità d'azione. Gli esperimenti condotti nel laboratorio di DiFrancesco<sup>47</sup> dimostrano che durante una iperpolarizzazione sostenuta in grado di mantenere il canale  $f$  nello stato aperto, il flusso di ioni sodio dall'esterno all'interno del canale spinge ivabradina fuori dal suo sito di legame e rimuove il blocco. Se il canale è però occupato dal cesio (un bloccante inorganico) che non interferisce con ivabradina, ma ostruisce il passaggio agli ioni sodio, ivabradina non si distacca. Questa peculiarità ha fatto sì che il blocco della corrente  $I_f$  da parte di ivabradina fosse definito come "corrente-dipendente"<sup>12,47</sup>, un termine concettualmente analogo a quello di blocco "frequenza-dipendente".

Un'altra caratteristica rilevante che differenzia zatebradina e ivabradina è la selettività. La prima riduce, infatti, anche altre correnti ioniche coinvolte nel processo di ripolarizzazione del potenziale d'azione<sup>41,43,44,48,49</sup>. Gli studi clinici hanno evidenziato anche un'incidenza significativa di effetti collaterali a carico della funzione visiva (visioni persistenti, flash)<sup>50,51</sup>, dovuti all'interazione tra zatebradina e il canale  $f$  neuronale presente nei fotorecettori. Queste evidenze e i risultati clinici non incoraggianti<sup>50</sup> hanno portato ad interrompere la sperimentazione clinica con zatebradina. L'effetto di ivabradina sui canali  $f$  retinici è meno rilevante e completamente reversibile<sup>52</sup>.

Ivabradina è l'unico inibitore della corrente  $I_f$  che ha raggiunto uno sviluppo clinico esteso. Gli studi preclinici hanno confermato che l'effetto a livello delle cellule del NSA si traduce *in vivo* in un'azione bradicardizzante senza effetti sull'inotropismo e sull'elettrogenesi ventricolare (QT)<sup>41,53-58</sup>. Come descritto in precedenza, la frequenza sinusale è il risultato della complessa e coordinata interazione di differenti conduttan-

ze ioniche, di cui  $I_f$  è uno degli elementi chiave. Per meglio inquadrare l'azione di ivabradina e dei bradicardizzanti specifici, occorre quindi inserire questa nuova classe di farmaci in un contesto più ampio, che comprende almeno altre due classi tradizionalmente conosciute per la loro azione sui centri pacemaker, i beta-bloccanti e i calcioantagonisti. L'efficacia dei primi è riconducibile agli effetti di blocco della stimolazione adrenergica che, attraverso i recettori beta, provoca l'aumento dell'AMP ciclico cellulare. Questo secondo messaggero è un modulatore diretto del canale  $f$ , che presenta un sito di legame per i nucleotidi ciclici. L'AMP ciclico, tuttavia, è anche in grado di indurre la fosforilazione del canale del calcio mediata dall'enzima proteinchinasi A e di aumentare conseguentemente l'ingresso di calcio nella cellula miocardica. È evidente che la combinazione di blocco di questi due effetti (sul canale  $f$  e sul canale del calcio) che controllano le fasi della depolarizzazione diastolica, si sommano a livello delle cellule del NSA e hanno come risultato un'azione bradicardizzante. Per motivi simili, i calcioantagonisti come il verapamil e il diltiazem, bloccando direttamente i canali del calcio di tipo L, svolgono un'azione bradicardizzante (Figura 7). Potremmo quindi estrapolare che, a livello del NSA e limitandoci agli effetti puramente cellulari e non sistemici di questi farmaci, calcioantagonisti, betabloccanti e bradicardizzanti specifici siano equivalenti. Occorre, tuttavia, ricordare che la corrente di calcio svolge un ruolo fondamentale nell'elettrogenesi e nella conduzione del nodo atrioventricolare<sup>59</sup> (Figura 7). Sperimentalmente, calcioantagonisti come verapamil e diltiazem rallentano la conduzione atrioventricolare a concentrazioni alle quali esercitano effetti modesti sulla frequenza sinusale<sup>60</sup>. Le cellule del NAV esprimono anche i canali  $f$  (almeno l'isoforma HCN4)<sup>61</sup>; non esistono dati sugli effetti elettrofisiologici di ivabradina sul NAV, ma i dati clinici non hanno dimostrato azioni rilevanti di questo farma-



**Figura 7.** Calcioantagonisti, betabloccanti e bradicardizzanti selettivi. La Figura mostra le fasi del potenziale d'azione influenzate dai diversi farmaci a livello del nodo del seno (NSA), del nodo atrioventricolare (NAV) e del ventricolo.

co sulla conduzione atrioventricolare<sup>56</sup>. I betabloccanti sono in grado di modificare molteplici parametri inerenti la genesi e la conduzione dell'impulso elettrico cardiaco, agendo a livello del pacemaker primario (NSA) e dei centri sussidiari (NAV, His-Purkinje). Sia i calcioantagonisti sia i betabloccanti, inoltre, per l'inibizione diretta o indiretta dell'ingresso di calcio nel miocita ventricolare (Figura 7), hanno azioni sulla contrattilità cardiaca; in pazienti con ridotta funzione ventricolare sinistra, l'effetto inotropo negativo può limitare l'impiego di questi farmaci a dosi capaci di esercitare un adeguato controllo della frequenza cardiaca.

I farmaci bradicardizzanti selettivi riducono la frequenza sinusale, ma non alterano le proprietà contrattili del miocardio. Gli effetti del blocco della  $I_f$ , infatti, sono ristretti alla funzione pacemaker, senza alcun impatto su conduzione seno-atriale, attività elettrica di altri distretti, contrattilità, resistenze vascolari. La selettività di azione attesa dal blocco della  $I_f$  può rappresentare un importante vantaggio terapeutico, come verrà descritto negli articoli successivi.

## Riassunto

Il battito cardiaco ha origine a livello del nodo seno-atriale; cellule specializzate dette pacemaker sono, infatti, in grado di generare impulsi spontanei. DiFrancesco descrisse 20 anni fa, per la prima volta, una corrente presente durante la fase di depolarizzazione diastolica che guidava il potenziale di membrana delle cellule pacemaker verso valori via via più positivi fino al raggiungimento della soglia che permetteva ad un nuovo potenziale d'azione di generarsi.

Questa corrente fu chiamata dall'autore  $I_f$  da *funny* (buffa), per alcune sue caratteristiche peculiari: il canale  $f$  è l'unico che si attiva in iperpolarizzazione anziché in depolarizzazione come avviene per la maggior parte dei canali regolati dal voltaggio; inoltre, il canale è direttamente modulato dai nucleotidi ciclici

(come l'AMP ciclico) con un meccanismo completamente indipendente da processi di fosforilazione. I geni che codificano per la corrente  $I_f$  sono stati clonati nel 1998 e rappresentano una famiglia detta HCN (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*) costituita da quattro geni codificanti per la subunità alfa del canale  $f$  (HCN1-4). A livello del nodo seno-atriale, l'isoforma più espressa è HCN4, ma sono state individuate anche HCN1 e HCN2.

La modulazione della corrente  $I_f$  è un meccanismo importante nel controllo del ritmo cardiaco anche se non esclusivo; è stato accertato che il suo blocco comporta una riduzione massima della frequenza cardiaca di circa il 20-30%. Negli ultimi anni sono state sviluppate molteplici molecole in grado di modulare questa corrente. La corrente  $I_f$  è bloccata da composti organici come zatebradina e analoghi. Ivabradina è un analogo della zatebradina capace di bloccare selettivamente la corrente  $I_f$  senza interferire sulle altre correnti ioniche che fluiscono durante il potenziale d'azione; a differenza dei calcioantagonisti e dei betabloccanti, l'azione bradicardizzante di ivabradina si esercita senza che vi siano interferenze con la contrattilità. Ivabradina è il primo rappresentante della nuova classe di farmaci definiti "bradicardizzanti specifici" approvato per l'uso clinico.

**Parole chiave:** Corrente pacemaker; Depolarizzazione diastolica; Farmaci bradicardizzanti selettivi.

## Bibliografia

- Schram G, Pourrier M, Melnyk P, Nattel S. Differential distribution of cardiac ion channel expression as a basis for regional specialization in electrical function. *Circ Res* 2002; 90: 939-50.
- Boyett MR, Honjo H, Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure. *Cardiovascular Res* 2000; 47: 658-87.
- Michaels DC, Matyas EP, Jalife J. Mechanisms of sinoatrial pacemaker synchronization: a new hypothesis. *Circ Res* 1987; 61: 704-14.
- MacKaay AJ, Opthof T, Bleeker WK, Jongasma, HJ, Bouman LN. Interaction of adrenaline and acetylcholine on

- cardiac pacemaker function. Functional inhomogeneity of the rabbit sinus node. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 214: 417-22.
5. Shibata N, Inada S, Mitsui K, et al. Pacemaker shift in the rabbit sinoatrial node in response to vagal nerve stimulation. *Exp Physiol* 2001; 86: 177-84.
  6. Masson-Pevet M, Bleeker WK, Gros D. The plasma membrane of leading pacemaker cells in the rabbit sinus node. A qualitative and quantitative ultrastructural analysis. *Circ Res* 1980; 46: 11-22.
  7. DiFrancesco D. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu Rev Physiol* 1993; 55: 455-72.
  8. Draper MH, Weidmann S. Cardiac resting and action potentials recorded with an intracellular electrode. *J Physiol* 1951; 115: 74-94.
  9. Vassalle M. Analysis of cardiac pacemaker potential using a "voltage clamp" technique. *Am J Physiol* 1966; 210: 1335-41.
  10. DiFrancesco D. A new interpretation of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol* 1981; 314: 359-76.
  11. DiFrancesco D. A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J Physiol* 1981; 314: 377-93.
  12. DiFrancesco D. Funny channels in the control of cardiac rhythm and mode of action of selective blockers. *Pharmacol Res* 2006; 53: 399-406.
  13. DiFrancesco D, Tortora P. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 1991; 351: 145-7.
  14. Zaza A, Micheletti M, Brioschi A, Rocchetti M. Ionic currents during sustained pacemaker activity in rabbit sinoatrial myocytes. *J Physiol* 1997; 505: 677-88.
  15. Noble D, Denyer JC, Brown HF, DiFrancesco D. Reciprocal role of the inward currents  $I_b$ ,  $I_{Na}$  and  $I_f$  in controlling and stabilizing pacemaker frequency of rabbit sinoatrial node cells. *Proc R Soc Lond B* 1992; 250: 199-207.
  16. Brown H, DiFrancesco D. Voltage-clamp investigations of membrane currents underlying pace-maker activity in rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 1980; 308: 331-51.
  17. Yanagihara K, Irisawa H. Inward current activated during hyperpolarization in the rabbit sinoatrial node cell. *Pflugers Arch* 1980; 385: 11-9.
  18. Ten Eick R, Nawrath H, McDonald TF, Trautwein W. On the mechanism of the negative inotropic effect of acetylcholine. *Pflugers Archives* 1976; 213: 207-13.
  19. Zaza A, Rocchetti M, DiFrancesco D. Modulation of hyperpolarization-activated current ( $I_f$ ) by adenosine in rabbit sinoatrial myocytes. *Circulation* 1996; 94: 734-41.
  20. Zaza A, Robinson RB, DiFrancesco D. Basal responses of the L-type  $Ca^{2+}$  and hyperpolarization-activated currents to autonomic agonists in the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 1996; 491: 347-55.
  21. DiFrancesco D, Ducouret, P, Robinson RB. Muscarinic modulation of cardiac rate at low acetylcholine concentrations. *Science* 1989; 243: 669-71.
  22. Ludwig A, Zong X, Jeglitsch M, Hofmann F, Biel M. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 1998; 393: 587-91.
  23. Santoro B, Liu DT, Yao H, et al. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 1998; 93: 717-29.
  24. Shi W, Wymore R, Yu H, et al. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ Res* 1999; 85: e1-e6.
  25. Moroni A, Gorza L, Beltrame M, et al. Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel 1 is a molecular determinant of the cardiac pacemaker current  $I_f$ . *J Biol Chem* 2001; 276: 29233-41.
  26. Altomare C, Terragni B, Brioschi C, et al. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J Physiol* 2003; 549: 347-59.
  27. Pape HC. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu Rev Physiol* 1996; 58: 299-327.
  28. Frere SG, Kuisle M, Luthi A. Regulation of recombinant and native hyperpolarization-activated cation channels. *Mol Neurobiol* 2004; 30: 279-305.
  29. Robinson RB, Siegelbaum SA. Hyperpolarization-activated cation currents: from molecules to physiological function. *Annu Rev Physiol* 2003; 65: 453-80.
  30. Demontis GC, Moroni A, Gravante B, et al. Functional characterisation and subcellular localisation of HCN1 channels in rabbit retinal rod photoreceptors. *J Physiol* 2002; 542: 89-97.
  31. Yusuf S, Camm AJ. Sinus tachyarrhythmias and the specific bradycardic agents: a marriage made in heaven? *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2003; 8: 89-105.
  32. DiFrancesco D, Camm J. A. Heart rate lowering by specific and selective  $I_f$  current inhibition with ivabradine: a new therapeutic perspective in cardiovascular disease. *Drugs* 2004; 64: 1757-65.
  33. DiFrancesco D. The pacemaker current ( $I_f$ ) plays an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 307-8.
  34. Vassalle M. The pacemaker current ( $I_f$ ) does not play an important role in regulating SA node pacemaker activity. *Cardiovasc Res* 1995; 30: 309-10.
  35. Kobinger W, Lillie C, Pichler L. N-Allyl-derivative of clonidine, a substance with specific bradycardic action at a cardiac site. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1979; 306: 255-62.
  36. Lillie C, Kobinger W. Comparison of the bradycardic effects of alinidine (St 567), AQ-A 39 and verapamil on guinea-pig sinoatrial node superfused with different  $Ca^{2+}$  and NaCl solutions. *Eur J Pharmacol* 1983; 87: 25-33.
  37. Traunecker W, Walland A. Haemodynamic and electrophysiological actions of alinidine in the dog. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1980; 244: 58-72.
  38. Millar JS, Williams EM. Pacemaker selectivity: influence on rabbit atria of ionic environment and of alinidine, a possible anion antagonist. *Cardiovasc Res* 1981; 15: 335-50.
  39. Van Bogaert PP, Goethals M. Pharmacological influence of specific bradycardic agents on the pacemaker current of sheep cardiac Purkinje fibres. A comparison between three different molecules. *Eur Heart J* 1987; 8: 35-42.
  40. Van Bogaert PP, Goethals M, Simoons C. Use- and frequency-dependent blockade by UL-FS 49 of the  $I_f$  pacemaker current in sheep cardiac Purkinje fibres. *Eur J Pharmacol* 1990; 187: 241-56.
  41. Thollon C, Cambarrat C, Vian J, Prost JF, Peglion JL, Vialine JP. Electrophysiological effects of S 16257, a novel sinoatrial node modulator, on rabbit and guinea-pig cardiac preparations: comparison with UL-FS 49. *Br J Pharmacol* 1994; 112: 37-42.
  42. DiFrancesco D. Some properties of the UL-FS 49 block of the hyperpolarization-activated current ( $I_f$ ) in sinoatrial node myocytes. *Pflugers Arch* 1994; 427: 64-70.
  43. Bois P, Bescond J, Renaudon B, Lenfant J. Mode of action of bradycardic agent, S 16257, on ionic currents of rabbit sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 1051-7.
  44. Goethals M, Raes A, Van Bogaert PP. Use-dependent block of the pacemaker current  $I_f$  in rabbit sinoatrial node cells by zatebradine (UL-FS 49). On the mode of action of sinus node inhibitors. *Circulation* 1993; 88: 2389-401.
  45. Van Bogaert PP, Goethals M. Blockade of the pacemaker

- current by intracellular application of UL-FS 49 and UL-AH 99 in sheep cardiac Purkinje fibers. *Eur J Pharmacol* 1992; 229: 55-62.
46. Van Bogaert PP, Pittoors F. Use-dependent blockade of cardiac pacemaker current ( $I_p$ ) by cilobradine and zatebradine. *Eur J Pharmacol* 2003; 478: 161-71.
  47. Bucchi A, Baruscotti M, DiFrancesco D. Current-dependent block of rabbit sino-atrial node  $I_f$  channels by ivabradine. *J Gen Physiol* 2002; 120: 1-13.
  48. BoSmith RE, Briggs I, Sturgess NC. Inhibitory actions of ZENECA ZD7288 on whole-cell hyperpolarization activated inward current ( $I_p$ ) in guinea-pig dissociated sinoatrial node cells. *Br J Pharmacol* 1993; 110: 343-9.
  49. Valenzuela C, Delpon E, Franqueza L, et al. Class III antiarrhythmic effects of zatebradine. Time-, state-, use-, and voltage-dependent block of hKv1.5 channels. *Circulation* 1996; 94: 562-70.
  50. Frishman WH, Pepine CJ, Weiss RJ, Baiker WM. Addition of zatebradine, a direct sinus node inhibitor, provides no greater exercise tolerance benefit in patients with angina taking extended-release nifedipine: results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 305-12.
  51. Glasser SP, Michie DD, Thadani U, Baiker WM. Effects of zatebradine (ULFS 49 CL), a sinus node inhibitor, on heart rate and exercise duration in chronic stable angina pectoris. Zatebradine Investigators. *Am J Cardiol* 1997; 79: 1401-5.
  52. Borer JS, Fox K, Jaillon P, Lerebours G, for the Ivabradine Investigators Group. Antianginal and antiischemic effects of ivabradine, an  $I_p$  inhibitor, in stable angina: a randomized, double-blind, multicentered, placebo-controlled trial. *Circulation* 2003; 107: 817-23.
  53. Colin P, Ghaleh B, Hittinger L, et al. Differential effects of heart rate reduction and beta-blockade on left ventricular relaxation during exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 282: H672-H679.
  54. Colin P, Ghaleh B, Monnet X, Hittinger L, Berdeaux A. Effect of graded heart rate reduction with ivabradine on myocardial oxygen consumption and diastolic time in exercising dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308: 236-40.
  55. Monnet X, Ghaleh B, Colin P, de Curzon OP, Giudicelli JF, Berdeaux A. Effects of heart rate reduction with ivabradine on exercise-induced myocardial ischemia and stunning. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 299: 1133-9.
  56. Camm AJ, Lau CP. Electrophysiological effects of a single intravenous administration of ivabradine (S 16257) in adult patients with normal baseline electrophysiology. *Drugs R D* 2003; 4: 83-9.
  57. Vilaine JP, Bidouard JP, Lesage L, Reure H, Peglion JL. Anti-ischemic effects of ivabradine, a selective heart rate-reducing agent, in exercise-induced myocardial ischemia in pigs. *J Cardiovasc Pharmacol* 2003; 42: 688-96.
  58. Simon L, Ghaleh B, Puybasset L, Giudicelli JF, Berdeaux A. Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275: 659-66.
  59. Efimov IR, Nikolski VP, Rothenberg F, et al. Structure-function relationship in the AV junction. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2004; 280: 952-65.
  60. Schwarzl I, Stark U, Kasper K, Decrinis M, Lindner W, Stark G. Quantification of rate-dependent effects of verapamil, diltiazem, and digoxin on atrioventricular conduction. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1996; 36: 205-10.
  61. Dobrzynski H, Nikolski VP, Sambelashvili AT, et al. Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ Res* 2003; 93: 1102-10.