

Capitolo II

Il nervo

LA CELLULA NERVOSA A RIPOSO

Caratteristiche fisiologiche

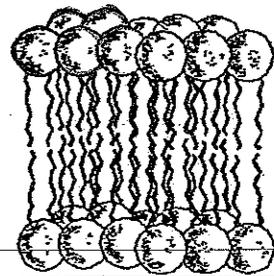
PRESENZA DI
UN POTENZIALE
TRANSMEMBRANA

*è la base dell'eccitabilità
della cellula*

Nella maggior parte delle cellule animali esiste una differenza di potenziale (*potenziale transmembrana*) ai due lati della membrana plasmatica che le riveste, tale differenza di potenziale è presente costantemente, ha un ruolo chiave nell'eccitabilità delle cellule nervose e contribuisce in larga parte alle loro proprietà elettriche. I fattori determinanti che portano allo sviluppo di questo potenziale sembrano legati alle caratteristiche della membrana e alle concentrazioni ioniche presenti all'esterno e all'interno della cellula, più che a proprietà particolari delle cellule nervose in genere.

LA MEMBRANA

La membrana è uno degli elementi vitali della cellula, in quanto individua e separa la cellula stessa dall'ambiente circostante; Tuttavia la cellula non è un ambiente chiuso, ma scambia sostanze con il mondo esterno e quindi attraverso la membrana stessa passano i metaboliti e i prodotti di rifiuto, gli ioni e le sostanze necessarie alle funzioni cellulari.



I principali costituenti della membrana sono le proteine e i fosfolipidi. Una molecola di fosfolipide ha una testa costituita da un gruppo polare (idrofilico) e da una estremità non polare, costituite da catene idrofobiche di acidi grassi. Essendo gli ambienti intracellulari ed extracellulari acquosi, le teste si dispongono verso l'acqua ed impediscono alle catene idrofobiche di entrarvi in contatto. Si costituisce, così, una struttura chiamata *doppio strato lipidico*, essa ha il più basso contenuto energetico e quindi è chimicamente stabile. Il modello tipico di questa struttura è visibile in figura II.1 All'interno del doppio strato lipidico, disseminate qua e là, vi sono le proteine di membrana che sono legate saldamente ai fosfolipidi ed hanno funzioni di vario genere; in particolare si riconoscono alcune

FIGURA II.1 Struttura della membrana lipidica.

proteine fondamentali come enzimi, carriers, channels, recettori per ormoni, recettori per neurotrasmettitori e antigeni.

Gli ioni e i metaboliti sono altamente solubili in acqua ed hanno molta difficoltà a superare le catene idrofobiche del doppio strato lipidico, quindi le membrane sono barriere di permeabilità; tuttavia tali molecole sono importanti per il funzionamento della cellula, quindi alcune proteine di membrana (carriers e channels) si sono specializzate al trasporto di ioni e metaboliti attraverso la membrana stessa. Nella cellule nervose le sostanze fondamentali nella determinazione delle proprietà elettriche sono gli ioni sodio e gli ioni potassio. Vi sono quindi molte proteine specializzate per il trasporto facilitato ed attivo (Na/K-ATPasi) di tali ioni.

CONCENTRAZIONI IONICHE

Un semplice modello chimico della cellula può essere costituito da due soluzioni acquose separate da membrana semipermeabile; le due soluzioni rappresentano il plasma cellulare (fase I) e il fluido extracellulare (fase E). La membrana semipermeabile permette il passaggio tra le due fasi di alcune molecole e ioni, tra i quali sodio (Na^+), potassio (K^+) e cloro (Cl^-). La tendenza degli ioni a muoversi sotto l'azione della forza elettrochimica può essere valutata utilizzando l'equazione di Nernst:

$$8,314 \left[\frac{\text{J}}{\text{mol} \cdot \text{K}} \right]$$

$$\Delta\phi_i = \phi_i^I - \phi_i^E = \frac{\mathcal{R} T}{z_i \mathcal{F}} \cdot \ln \left(\frac{C_i^E}{C_i^I} \right)$$

$\Delta\phi_i$ = ddp per cui con quelle concentrazioni lo ione i è all'equilibrio interfase.

$$36500 \left[\frac{\text{C}}{\text{mol}} \right]$$

dove \mathcal{R} è la costante dei gas, T è la temperatura assoluta, \mathcal{F} è la costante di Faraday, z_i è la carica dello ione, C_i^E e C_i^I sono le concentrazioni ioniche della specie i -esima nella fase E e nella fase I e la differenza di potenziale $\Delta\phi_i$ è chiamata potenziale di Nernst della specie i -esima. Se è presente una sola specie, il potenziale di Nernst corrisponde al potenziale transmembrana, mentre, se sono presenti più specie, il potenziale transmembrana è legato ad una combinazione lineare dei potenziali di Nernst delle specie stesse.

IMPORTANTE

TABELLA II.1 Concentrazioni ioniche ai lati della membrana di un assone gigante di calamaro e i relativi potenziali di Nernst.

Ione	Concentrazione Extracellulare (mM)	Concentrazione Intracellulare (mM)	Potenziale di Nernst (mV)	Potenziale di riposo (mV)
Na^+	460	50	58	-70
K^+	10	400	-96	
Cl^-	540	40	-68	

Nella colonna 4 di tabella II.1 sono riportati i potenziali di Nernst dei tre ioni sodio, potassio e cloro. Si può constatare facilmente che tali potenziali non si accordano con quello di -70 mV misurato sperimentalmente in condizioni di riposo cellulare. Ciò è sintomo di un non equilibrio ionico tra i due fluidi cellulari che può essere evidenziato effettuando un bilancio di forza elettrochimica.

La differenza di concentrazione per lo ione cloro produce una forza chimica che spinge lo ione a passare dalla fase E alla fase I (cioè, ad entrare nella cellula). All'equilibrio, la forza chimica è bilanciata da una forza elettrica prodotta dal potenziale di Nernst, il quale, nel caso del cloro, vale -68 mV. Lo ione cloro può,

quindi, essere considerato in equilibrio in quanto il potenziale transmembrana di -70 mV genera una forza elettrica praticamente coincidente con quella di equilibrio. Si può facilmente vedere che le situazioni del sodio e del potassio sono ben diverse. Per lo ione sodio la forza elettrica prodotta dal potenziale transmembrana è concorde con la forza chimica, dunque il flusso di ioni sodio tra esterno ed interno è ulteriormente agevolato. Per lo ione potassio i -70 mV, pur creando una forza che si oppone a quella chimica, non sono sufficienti a garantire l'equilibrio e quindi lo ione potassio tende ugualmente ad uscire dalla cellula.

170 mV MISURATI!

Se misuriamo sperimentalmente le concentrazioni ioniche di sodio e potassio, si osserva che esse non evolvono verso l'equilibrio, ma tendono a mantenere i valori medi di tabella II.1, quindi deve esistere un meccanismo che, lavorando contro gradiente chimico, mantiene questi valori di concentrazione. Tale meccanismo è chiamato

PRESENZA DI Na/K-ATPase

trasporto attivo ed è regolato dalle Na/K-ATPasi o pompe sodio-potassio. Tali elementi sono proteine di membrana capaci di espellere gli ioni sodio e di incamerare gli ioni potassio attraverso un processo di trasporto attivo che "brucia" il carburante biologico ATP (Adenosin-Tri-Fosfato). Lo scambio di ioni non è alla pari, poiché la Na/K-ATPasi scambia tre ioni sodio con due di potassio, quindi la pompa incamera un numero minore di cariche positive di quante ne espelle, e ciò contribuisce alla formazione di un potenziale transmembrana a riposo di valore negativo (figura II.2).

COMPENSAZIONE DI UN POTENZIALE TRANSMEMBRANA

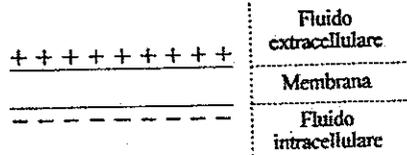


FIGURA II.2 Distribuzione di carica ai lati della membrana e rappresentazione del potenziale transmembrana.

$$\psi_i = \psi_e$$

Modello elettrico della membrana nervosa a riposo

Quando un certo numero di ioni si distribuisce ai lati della membrana, e tutti gli ioni sono lontani dal loro equilibrio elettrochimico, ciascun ione tenderà a spostare il potenziale di membrana verso il proprio potenziale di equilibrio (calcolato secondo Nernst). Inoltre, più permeabile è la membrana ad un particolare ione e maggiore è la forza che quello ione può esercitare nel portare il potenziale di membrana verso il proprio potenziale di equilibrio. In base a queste considerazioni e alle caratteristiche della membrana possiamo formulare il modello elettrico della membrana descritto dal circuito di figura II.3. In esso sono riportati tre rami contenenti una batteria ed una conduttanza. La batteria tiene conto dei potenziali di equilibrio dei singoli ioni sodio (E_{Na}) e potassio (E_K), e di un elemento complessivo che tiene conto delle restanti molecole, in generale battezzato Leakage (E_L); mentre la conduttanza tiene conto della permeabilità agli ioni (g_{Na} , g_K , g_L). Le caratteristiche

EX: Na
 $\Delta\psi = \psi_i - \psi_e = 58 \text{ mV}$
 $> 0 \Rightarrow \psi_i > \psi_e$
 $\Rightarrow \frac{1}{T_i} Na$

LEAKAGE: PERDITA

Tiene conto della permeabilità al dato ione

Tiene conto dell'accumulo di carica ai bordi delle membrane

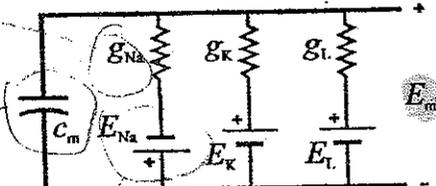


FIGURA II.3 Schema elettrico della membrana a riposo.

strutturali della membrana e l'accumulo di carica ai suoi bordi, vengono presi in considerazione con la capacità di membrana (c_m). Per svincolare i valori di conduttanza e capacità dalla superficie della membrana interessata si preferiscono i valori per unità di superficie (inoltre capacità e conduttanza sono entrambi proporzionali alla superficie). Si precisa che i valori per unità di

tiene conto della tendenza dello ione a spostare il potenziale di membrana verso il suo potenziale di equilibrio

FAI CONDOTTANZE PER UNITA' DI SUPERFICIE!

$$[g_m] = \left[\frac{S}{m^2} \right]$$

superficie saranno indicati con le lettere minuscole, utilizzando le corrispondenti lettere maiuscole per i valori contenenti anche il fattore di superficie. Nella tabella II.2 sono riportati i valori tipici per una fibra mielinata e non mielinata.

Tabella II.2. Valori tipici per fibre mielinate e non mielinate.

ASSONE NON MIELINATO			
Simbolo	Denominazione	Valore	Unità di misura
a_m	Raggio dell'assone	$5 \cdot 10^{-6}$	m
d_m	Spessore dell'assone	$6 \cdot 10^{-9}$	m
ϵ_m	Costante dielettrica relativa	7	adimensionale
ρ_m	Resistività della membrana	$1.6 \cdot 10^7$	Ωm
$\epsilon_m \cdot \rho_m$	Prodotto	$112 \cdot 10^4$	Ωm
c_m	Capacità per unità di area	10^{-2}	F/m^2
C_m/L	Capacità per unità di lunghezza	$3 \cdot 10^{-7}$	F/m
g_m	Conduttanza per unità di area	10	S/m
G_m/L	Conduttanza per unità di lunghezza	$3.2 \cdot 10^{-4}$	S/m
r_i	Resistenza longitudinale per unità di lunghezza	$6.4 \cdot 10^{-9}$	Ω/m
E_m	Potenziale interno a riposo	-70	mV
ASSONE MIELINATO			
Simbolo	Denominazione	Valore	Unità di misura
a_m	Raggio dell'assone	$5 \cdot 10^{-6}$	m
d_c	Spessore mielina	$2 \cdot 10^{-6}$	m
d_n	Spessore nodo	$6.2 \cdot 10^{-9}$	m
L_n	Larghezza nodo	$5 \cdot 10^{-6}$	m
ϵ_c	Costante dielettrica relativa della mielina	7	adimensionale
ϵ_n	Costante dielettrica relativa del nodo	7	adimensionale
ρ_c	Resistività della mielina	$7.4 \cdot 10^6$	Ωm
ρ_n	Resistività del nodo	$1.0 \cdot 10^6$	Ωm
$\epsilon_c \cdot \rho_c$	Prodotto per la mielina	$5.2 \cdot 10^7$	Ωm
$\epsilon_n \cdot \rho_n$	Prodotto per il nodo	$6.9 \cdot 10^6$	Ωm
c_m	Capacità per unità di area	$37 \cdot 10^{-6}$	F/m^2
C_m/L	Capacità per unità di lunghezza	$1.2 \cdot 10^{-9}$	F/m
g_m	Conduttanza per unità di area	$8 \cdot 10^{-2}$	S/m
G_m/L	Conduttanza per unità di lunghezza	$2.5 \cdot 10^{-6}$	S/m
r_i	Resistenza dell'assoplasma	$1.4 \cdot 10^{-10}$	Ωm
C_n	Capacità del nodo	$1.5 \cdot 10^{-12}$	F
G_n	Conduttanza del nodo	$2.4 \cdot 10^{-3}$	S

$$V = RI \Rightarrow [R] = \frac{[V]}{[A]} = \Omega$$

CONDUTTANZA di MEMBRANA per fibre non mielinate

I flussi ionici costituiscono flussi di carica che scorrono attraverso la membrana, quindi rappresentano vere e proprie correnti elettriche. Queste, espresse come densità di corrente (j), sono legate direttamente alla conduttanza per unità di superficie dei tre elementi ionici:

$$\begin{aligned} J_K &= g_K (E_m - E_K) = \left[\frac{1}{\Omega \cdot m^2} \right] [V] = \left[\frac{A}{V \cdot m^2} \right] [V] = \left[\frac{A}{m^2} \right] \\ J_{Na} &= g_{Na} (E_m - E_{Na}) \\ J_L &= g_L (E_m - E_L) \end{aligned} \quad \begin{array}{l} \text{SONO FLUSSI DI} \\ \text{CORRENTE!} \end{array} \quad (II.1)$$

Le (II.1) possono analogamente essere ricavate dal circuito di figura II.3, tenendo presente che ai capi della membrana in condizioni di riposo è presente un potenziale transmembrana pari a E_m . In condizioni stazionarie, affinché il potenziale rimanga costante la corrente che scorre nel condensatore deve essere nulla, ciò significa che:

$$J_K + J_{Na} + J_L = 0 \quad (II.2)$$

dunque sostituendo nella (II.2) la (II.1) e ricavando E_m otteniamo:

$$E_m = \frac{g_K}{g_m} E_K + \frac{g_{Na}}{g_m} E_{Na} + \frac{g_L}{g_m} E_L$$

derivate using the formula di Millman (II.3) dato che è tutto in parallelo

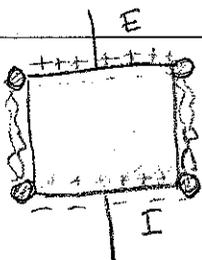
Essa è nota come equazione di Goldman e mostra che il potenziale di riposo della membrana nervosa è dato dalla media ponderata dei potenziali di equilibrio degli ioni, in cui il fattore ponderale per ciascuno ione è il rapporto tra la conduttanza dello ione e la conduttanza di membrana g_m . Questa conduttanza risulta essere dalle (II.1) e (II.2) pari a:

$$g_m = g_{Na} + g_K + g_L$$

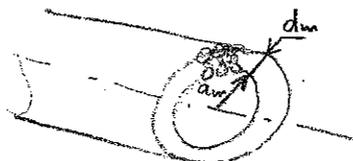
La misura della conduttanza di membrana è stata ricavata sperimentalmente valutando la resistività di membrana $\rho_m = 1.6 \cdot 10^7 \Omega m$, lo spessore della membrana (d_m) ed utilizzando la relazione espressa dalla seconda legge di Ohm:

$$g_m = \frac{1}{\rho_m d_m} = \left[\frac{1}{\Omega \cdot m \cdot m} \right] = \left[\frac{1}{\Omega \cdot m^2} \right] = \left[\frac{S}{m^2} \right]$$

CAPACITÀ di MEMBRANA per fibre non mielinate



Il doppio strato lipidico è caratterizzato da due strati polari separati da uno strato non polare, ne segue che esso può essere pensato come un condensatore con due armature cariche separate da un dielettrico (figura II.4). Ipotizzando la carica ionica e polare addensata sulla superficie della membrana e lo strato idrofobico come un dielettrico ideale, possiamo calcolare la capacità riferendoci ad un condensatore cilindrico (si considera cioè l'assone cilindrico) oppure, considerando una generica porzione di membrana, ad un condensatore piano. Si assume che lo spessore della membrana sia d_m e che il raggio interno dell'assone sia a_m , quindi le capacità per unità di superficie risultano: vedi a p. 24!



approssima a condensatore piano solo se $d_m \ll a_m$!

24 La capacità di un condensatore piano è quindi, per unità di superficie? (e ricorda dipende solo della forma)

$$c_x = \frac{\epsilon_0 \epsilon_x}{d_x} \quad \text{COND. PIANO} \quad \left[\frac{F}{m^2} \right]$$

$$c_x = \frac{\epsilon_0 \epsilon_x}{a_x \cdot \ln(1 \pm d_x/a_x)} \quad \text{COND. CILINDRICO}$$

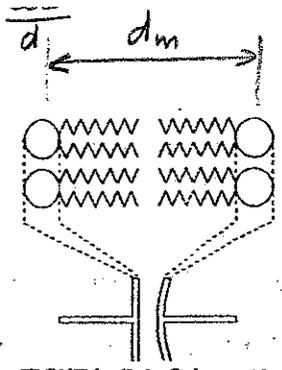


FIGURA II.4 Schematizzazione della membrana e corrispondenza tra strati polari ed armature.

$\epsilon_m = 7$

La costante ϵ_m è la costante dielettrica della membrana, la quale risulta da misure sperimentali pari a 7. Tenendo presente che il potenziale transmembrana è di circa 70 mV, che lo spessore d_m è di circa 6 nm e che il valore di a_m è di circa 5 μm , i due valori di capacità possono essere considerati uguali e pari a $c_m = 1.03 F/m^2$. Ciò ci permette di assumere come modello quello del condensatore piano.

Per la costante dielettrica, il valore sperimentale 7 risulta notevolmente più alto del valore 2.2 conosciuto per i lipidi. La differenza tra i valori sorge a causa del fatto che parte della membrana si polarizza così facilmente da comportarsi come conduttore e non come dielettrico. Se nel calcolo della capacità si considera il solo spessore lipidico, si può assumere $\epsilon_m = 2.2$, mentre se si considera l'intero spessore

di membrana la costante dielettrica aumenta notevolmente a causa dell'acqua e dei gruppi polari, quindi è più ragionevole usare $\epsilon_m = 7$. Infatti si deve tener conto delle tre costanti dielettriche dello strato lipidico: circa 2 per le catene idrofobiche, intorno a 50 per le teste polari e circa 80 per l'acqua.

Un modello più sofisticato per descrivere la membrana può essere quello di pensarla costituita da tre parti (mantenendo ancora la geometria piana): strato polare, strato lipidico, strato polare come rappresentato in

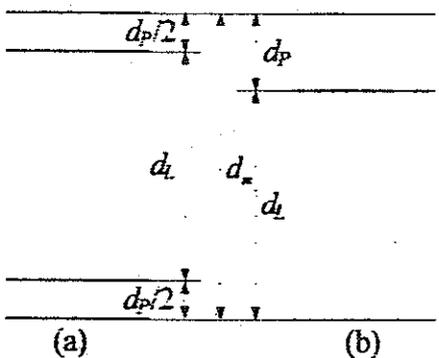


FIGURA II.5 (a) Membrana a tre strati. (b) Membrana a due strati.

figura II.5a. Lo stesso effetto si può ottenere considerando i due strati polari riuniti insieme come visibile in figura II.5b. Consideriamo il modello a due strati ed indichiamo con il pedice L lo strato lipidico e con il pedice P lo strato polare. Possiamo pensare i due strati come due condensatori piani in serie e quindi la capacità complessiva risulta:

ALTRE SCHEMATIZZAZIONI

$$c_x = \epsilon_0 \frac{\epsilon_L \epsilon_P}{\epsilon_L d_L + \epsilon_P d_P} \quad \text{NO!} \quad c_P = \frac{\epsilon_P \epsilon_0}{d_P} \quad c_L = \frac{\epsilon_L \epsilon_0}{d_L} \quad \text{(II.4)}$$

$$\frac{1}{c_m} = \frac{d_L}{\epsilon_L \epsilon_0} + \frac{d_P}{\epsilon_P \epsilon_0} = \frac{1}{\epsilon_0} \left(\frac{d_L}{\epsilon_L} + \frac{d_P}{\epsilon_P} \right) = c_m^{-1} \epsilon_0 \left(\frac{\epsilon_P d_L}{\epsilon_L} + \frac{\epsilon_L d_P}{\epsilon_P} \right)$$

Dalla (II.4) si ricava che la costante ϵ_m vale:

$$\epsilon_m = \frac{\epsilon_L \epsilon_P d_m}{\epsilon_L d_L + \epsilon_P d_P} \quad \text{(II.5)}$$

Inserendo nella (II.4) e nella (II.5) i valori numerici ($\epsilon_{H_2O} = 80$, $\epsilon_L = 2.2$, $\epsilon_P = 50$, $d_L = 5 \text{ nm}$, $d_P = 2 \text{ nm}$), si ottiene: $\epsilon_m = 3$ e $c_m = 3.8 \cdot 10^{-3} F/m^2$. Questo valore è molto vicino a quello trovato assumendo che i gruppi polari siano perfetti conduttori ($4 \cdot 10^{-3} F/m^2$), quindi considerando il dielettrico confinato al solo strato lipidico (spessore d_m) il modello può essere più che esauriente. Altri modelli più complessi possono essere ricavati considerando la presenza dell'acqua o rilassando le ipotesi di omogeneità ed isotropia.

CAPACITÀ E CONDUTTANZA PER FIBRE MIELINATE

Dato che lo spessore della mielina non è trascurabile rispetto al raggio dell'assone, dobbiamo modificare le equazioni in modo da considerare la nuova geometria del sistema.

Considerando la figura II.6 si osserva che il diametro totale della fibra mielinata è $2(a_m + d_m)$, che lo spessore della mielina è d_m e che il raggio della parte interna dell'assone (e approssimativamente quello di un nodo) è a_m ; utilizzando i valori di tabella II.2 si ci si rende conto che l'approssimazione $a_m \approx d_m$ non è più verificata. In questi termini anche il modello con geometria piana non può più essere utilizzato, infatti calcolando conduttanze e capacità di membrana nel caso piano con i dati di tabella II.2 si ha un divario di circa il 19% nei confronti del modello con geometria cilindrica.

E abbastanza facile ricavare con accuratezza i fattori geometrici delle fibre, non è altrettanto facile, invece, misurare i parametri elettrostatici necessari per il calcolo di conduttanze e capacità. Infatti si riesce a misurare con buona accuratezza i pro-

L'APPROX A COND. PIANO NON È PIÙ VALIDA PERCHÉ $d_m \neq a_m$ SI COMMITTEREBBE UN ERRORE DEL 19%

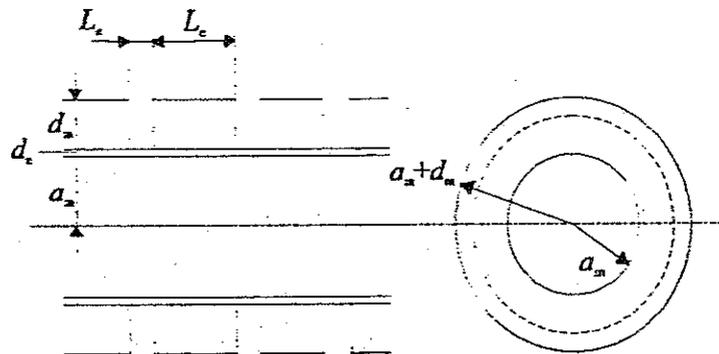


FIGURA II.6 Schematizzazione ideale di una fibra mielinata. Vista in sezione longitudinale (sinistra) e in sezione trasversale (destra).

SI CONOSCONO ATTRAVERSO LA MISURA DEL TEMPO DI SCARICA DEL CONDENSATORE

dotti $\rho_e \cdot \epsilon_e$ e $\rho_n \cdot \epsilon_n$ dove ρ_e e ρ_n sono la resistività della mielina e quella del nodo di Ranvier e ϵ_e e ϵ_n sono le costanti dielettriche di mielina e nodo. Quindi per poter calcolare i valori di ciascuna delle quattro grandezze occorre effettuare una stima utilizzando le conoscenze sulla struttura della membrana stessa. Da tali considerazioni è possibile ricavare che ρ_e è compresa tra 5.3 MΩm e 8.2 MΩm ed ϵ_e è compreso tra 6.4 e 9.9, mentre per i nodi di Ranvier si ricava che la costante dielettrica ϵ_n è circa la stessa, quindi la resistività ρ_n risulta compresa tra 0.7 MΩm e 1.1 MΩm. Si può facilmente notare dalla tabella II.2 che il valori dei prodotti $\rho \cdot \epsilon$ per mielina e nodo sono scalati di un fattore 10 e che i valori dei nodi non sono uguali a quelli della fibra non mielinata; è possibile considerare in generale la costante dielettrica di membrana assimilabile con quella della mielina, quindi si può assumere valido per tutte le membrane il valore $\epsilon_e = 7$.

$$\tau = \frac{C_m}{g_m} = \epsilon_0 \epsilon_m \rho_m$$

Se vogliamo formulare un modello più dettagliato per la capacità dobbiamo andare a considerare che la mielina è costituita da diversi strati avvolti insieme in modo compatto. Ogni strato è costituito da due sottostrati simmetrici e, a loro volta, formati da zone lipidiche, zone polari e zone acquose, come rappresentato in figura II.7. Gli strati di mielina si susseguono a distanza di 17.1 nm, mentre ogni singolo sottostrato ha uno spessore di 8.55 nm. Lo spessore lipidico occupa meno della metà dello spazio occupato dal doppio strato lipidico di membrana, tuttavia le misure affermano che la capacità di membrana è maggiore di quella del doppio

Zona Acquosa	$\epsilon=80$	55nm
Zona Polare	$\epsilon=50$	3.2nm
Zona Lipidica	$\epsilon=2.2$	2.1nm
Zona Polare	$\epsilon=50$	2.2nm
Zona Acquosa	$\epsilon=80$	1nm
Zona Polare	$\epsilon=50$	2.2nm
Zona Lipidica	$\epsilon=2.2$	2.1nm
Zona Polare	$\epsilon=50$	3.2nm
Zona Acquosa	$\epsilon=80$	55nm

FIGURA II.7 Risultato delle misure di spessore condotte ai raggi X. Struttura di uno strato di mielina.

i dati di figura II.7. L'effettivo valore della costante dielettrica (con riferimento alla figura II.7) risulta $\epsilon_m = 7.95$. Se ipotizziamo che lo spessore della membrana di un assonone non mielinato abbia zone estese la metà di quelle della mielina, lo spessore complessivo risulta essere 8.55 nm. Ne segue che la capacità per unità di area vale: 8.2 mF/m² (valore molto vicino a quello misurato, 10 mF/m², la coerenza continua a persistere).

In realtà, la capacità è legata allo spessore della zona lipidica e la conduttanza è legata al passaggio di ioni attraverso la zona polare. Inoltre, il prodotto $\epsilon \cdot \rho$ è significativo solo per una membrana omogenea e avente stesso spessore per capacità e conduttanza. Alla luce di ciò e con le "povere" conoscenze riportate, non ci sono giustificazioni per l'uso dello stesso spessore d_m nel calcolo di conduttanze e capacità di membrana, e per l'uso del prodotto $\epsilon \cdot \rho$. Ci limitiamo a suggerire che finché la struttura della membrana non è presa in considerazione, è saggio esprimere tutto in funzione di parametri come conduttanza, capacità e resistenza per unità di lunghezza; nei casi in cui non si possa fare a meno della struttura, è opportuno ipotizzare che le membrane siano omogenee.

strato lipidico, ne segue che, utilizzando la costante dielettrica dei lipidi, la membrana deve essere meno densa. Con questa osservazione riusciamo a raccordare i risultati ottenuti da misure di spessore (con diffrazione dei raggi X) e i risultati visti sulle capacità di membrana.

I concetti espressi per due zone possono essere estesi ad un sistema a più zone, considerando le formule (II.4) e (II.5) e

Analisi del modello

La membrana a riposo può essere schematizzata come in figura II.3, tuttavia, per rendere il circuito più intuitivo "compattiamo" i tre flussi ionici e la conduttanza di membrana, considerando il valore E_m espresso dalla legge di Goldman (II.3) e la conduttanza di membrana g_m espressa dalla (II.4). In base a queste trasformazioni il circuito di figura II.3 si trasforma in quello di figura II.8a. La linearità delle trasformazioni ci consente di affermare che l'analisi effettuata per ricavare la conduttanza di membrana è ancora valida e quindi il nuovo circuito è in equilibrio ed il flusso di corrente è nullo.

Nel modello, il generatore E_m rappresenta le pompe attive sodio-potassio che, mantenendo le concentrazioni ioniche a valori fuori equilibrio, producono appunto il potenziale transmembrana. Agenti chimici che bloccano l'attività di tali pompe minano l'attività cellulare e la risposta

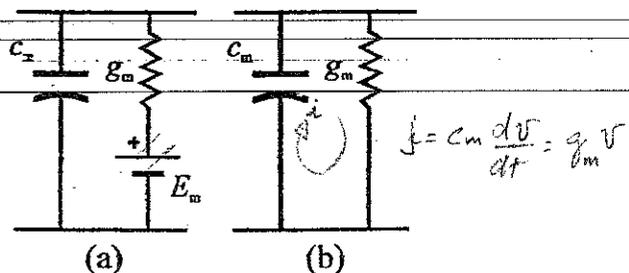


FIGURA II.8 Schema della membrana a riposo (a) in condizioni normali. (b) in condizioni di degenerazione cellulare.

E_m RAPPRESENTA
SENZA
 $Na/K-ATPase$

↑
VOLTA

nervosa in modo irreversibile. Dal punto di vista elettrico l'effetto registrato è il raggiungimento dell'equilibrio chimico e l'annullamento del potenziale di membrana, tuttavia ciò avviene con una certa costante di tempo che, dal punto di vista fisiologico, è importante al fine di prevenire la morte delle cellule interessate. Vediamo attraverso un'analisi circuitale se è possibile ricavare quali fattori sono determinanti nella stima di tale costante.

DEGENERAZIONE
CELLULARE

Il blocco delle pompe comporta lo spegnimento del generatore E_m nel circuito di figura II.8a; il potenziale di membrana inizialmente resta al valore E_m a causa della carica accumulata nel condensatore c_m , tuttavia tale carica inizierà a fluire nella conduttanza g_m e tenderà ad annullarsi, quindi anche il valore del potenziale tenderà a scendere. Il circuito di figura II.8a si trasforma dunque in quello di figura II.8b. Scrivendo l'equazione di Kirchhoff alla maglia risulta che la densità di corrente j_m che attraversa la membrana (che scorre quindi anche nella conduttanza g_m) è proporzionale alla capacità per unità di area c_m in base alla legge:

$$j_m = c_m \frac{dv}{dt} = g_m v \Rightarrow \frac{dv}{dt} - \frac{g_m}{c_m} v = 0 \quad v = C e^{-\frac{t}{\tau}}$$

La cui soluzione ci dice che il potenziale transmembrana evolve nel tempo con andamento esponenziale e con una costante di tempo τ che in funzione delle relazioni per la capacità e la conduttanza di membrana trovate risulta:

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{d_n}$$

$$\tau = \frac{c_m}{g_m} = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{d_n}{g_m} \quad c_m = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r E_m}{d_n} \quad g_m = \frac{1}{R_m d_n} \quad \text{in } \text{m}^2$$

$$v = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r E_m}{g_m d_n}$$

Si noti che il tempo di scarica è indipendente sia dall'area che dallo spessore della membrana. Tale indipendenza non deve sorprendere, giacché, il condensatore e la conduttanza in realtà non sono entità separate, ma fanno parte dello stesso elemento e quindi hanno fattori geometrici comuni.

LA CELLULA DURANTE LA CONDUZIONE

Caratteristiche fisiologiche della conduzione

IMPULSI
NERVOSI
"SPIKE"

Le cellule nervose sono caratterizzate dalla capacità di trasmettere impulsi nervosi, essi rappresentano una modificazione del potenziale di riposo ai capi della membrana. Forma, ampiezza e modo di propagazione sono differenti da fibra a fibra e da organismo ad organismo, tuttavia si possono riscontrare caratteristiche comuni che permettono di tracciare modelli generali. In particolare gli studi sulla conduzione nervosa sono stati condotti da Hodgkin ed Huxley sull'assone gigante di calamaro.

2.500 μm

Il potenziale di azione

Gli studi sperimentali hanno messo in evidenza che durante la conduzione dell'impulso nervoso si verificano variazioni del valore del potenziale transmembrana, chiamate nel complesso potenziali di azione; essi hanno forme diverse a seconda delle condizioni in cui si trova l'organismo, tuttavia un impulso tipico è rappresentato in figura II.9. L'impulso tipico mostra che il potenziale transmembrana passa da un valore a riposo di -70 mV ad uno superiore di -60 mV chiamato potenziale di soglia al di sopra del quale si scatena il potenziale d'azione vero e proprio. Questo sale rapidamente fino a valori positivi di circa 40 mV, quindi scende rapidamente verso valori notevolmente più negativi del potenziale di riposo (-90 mV) ed infine si ristabilisce al valore di riposo.

Come indicato in figura II.9 il tratto con forte pendenza positiva corrisponde ad una depolarizzazione molto elevata (con presenza di overshoot), mentre il tratto successivo alla ripolarizzazione manifesta un overshoot negativo sotto il potenziale di riposo che rappresenta una iperpolarizzazione della membrana nervosa. I concetti di depolarizzazione ed iperpolarizzazione devono essere legati ai meccanismi ionici con i quali il potenziale di azione si produce. Infatti le misure sperimentali hanno permesso di capire che la genesi del potenziale deriva dalla capacità della membrana di modificare la conduttanza agli ioni sodio e potassio (i cambiamenti

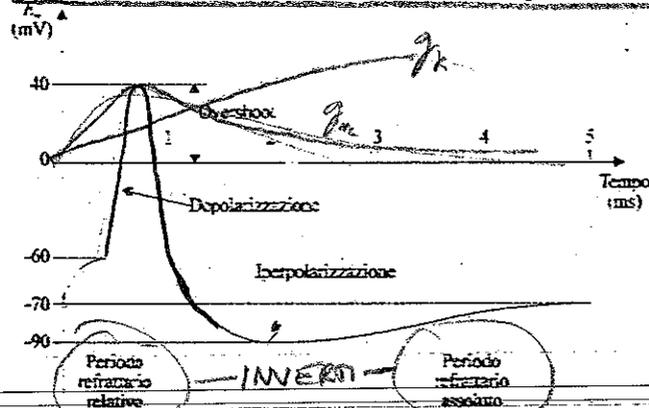


FIGURA II.9 Tipico impulso nervoso. Sono evidenziati i tratti di depolarizzazione ed iperpolarizzazione, e i periodi di refrattarietà assoluta e relativa.

Gli studi sperimentali hanno messo in evidenza che se c'è un aumento della concentrazione di ioni potassio nel fluido extracellulare il potenziale di azione sale meno e presenta un overshoot più basso. Ciò sembra essere dovuto a due fattori: una minor forza elettrica che spinge lo ione sodio ad entrare e la disattivazione dei canali del sodio. Infatti si nota sperimentalmente che la capacità di attivarsi dei canali del sodio è inversamente proporzionale alla concentrazione intracellulare di sodio. Si registra inoltre che la possibilità di generare un potenziale di azione è legata ad un numero minimo di canali attivabili, quindi un'elevata concentrazione di sodio all'interno della cellula, cioè un elevato potenziale d'azione rende inattiva una cellula alla conduzione. Analogamente accade per i canali del potassio, tuttavia risulta diversa la relazione tra concentrazione ed attivazione. A seguito di queste considerazioni, l'impulso di figura II.9 viene generalmente suddivisa in due periodi: il periodo refrattario assoluto ed il periodo refrattario relativo. Nel primo periodo la membrana è incapace di generare un secondo potenziale d'azione, mentre nel periodo successivo, pur con un valore maggiore di soglia di eccitabilità, il potenziale d'azione può essere nuovamente scatenato. Questo processo è utilizzato in

nei flussi del leakage sono trascurabili); in particolare si verifica una maggiore capacità del sodio di entrare nella cellula ed una maggiore capacità del potassio ad uscire. Queste variazioni di flusso producono correnti ioniche che modificano la carica ai bordi della membrana e di conseguenza il valore del potenziale transmembrana, generando il potenziale d'azione.

PER POTENZIALI D'AZIONE
O PER LA RIPOLARIZZAZIONE
LEGATI A MECCANISMI DI APERTURA DI CHANNELS IONICI → CAMBIA g_{Na} (ENTRA Na^+ ESCE K^+)

DIVIDI IL PERIODO TOT IN 2 PARTI

molti neuroni al livello sinaptico come meccanismo di gate per bloccare o meno la genesi degli impulsi nervosi.

Nella depolarizzazione che segue l'overshoot di iperpolarizzazione, la soglia di eccitabilità può essere superata senza che si generi il potenziale di azione (*fenomeno dell'accomodamento*). Ciò sembra verificarsi per il fatto che il tempo necessario al potenziale per raggiungere il valore di soglia è più grande di quello necessario alla disattivazione dei canali del sodio in relazione alla concentrazione del sodio stesso e al fatto che i canali del potassio sono più lenti a disattivarsi rallentando ulteriormente la crescita del potenziale.

PROPAGAZIONE DEL POTENZIALE D'AZIONE

Una delle proprietà elettriche delle fibre nervose è quella di condurre il potenziale di azione. Tale conduzione avviene grazie ad una ridistribuzione locale delle cariche, la quale si propaga a tutto il neurone attraverso un meccanismo di diffusione elettrotonica. In figura II.10a è rappresentata la distribuzione di carica sulla membrana di un assone al quale è stata depolarizzata una piccola regione centrale, mentre in figura II.10b è rappresentato il meccanismo di propagazione della depolarizzazione. La presenza locale di una concentrazione di carica positiva all'interno e di carica negativa all'esterno genera per diffusione un flusso ionico che tende ad evolversi verso l'equilibrio, e questo provoca la depolarizzazione delle regioni contigue, innescando un processo di *conduzione elettrotonica*.

La conduzione elettrotonica è chiamata così per la presenza di flussi di carica ionica, tuttavia essa è caratterizzata da un flusso continuo di carica lungo l'assone solo nel caso in cui la variazione di potenziale sia piccola da non superare il valore di soglia, in tal caso però non si ha nessun potenziale d'azione; nel caso in cui si supera la soglia, invece, la conduzione ionica resta un fenomeno di conduzione locale che innesca la depolarizzazione di un tratto di assone, il quale genera un potenziale d'azione (*effetto autorinforzante*) e non lo trasmette come accade in un comune conduttore elettrico. Questo rende particolari i neuroni in quanto essi possono essere considerati conduttori attivi, capaci di trasmettere un impulso senza degradarlo.

La velocità con cui avviene la conduzione elettrotonica, legata direttamente alla velocità di trasmissione dell'impulso nervoso, è dovuta alla grandezza delle fibre in quanto si hanno differenti concentrazioni di carica e differenti potenziali elettrochimici; tuttavia un fattore importante nella velocità di conduzione è rappresentato dalla mielina (se nelle fibre umane non vi fosse la mielina il riflesso di reazione per aver toccato un carbone ardente si manifesterebbe solo dopo 4 s, con tutti i problemi che ne deriverebbero). Nelle fibre mielinate la conduzione elettrotonica ha un maggiore campo di azione in quanto gli elementi capaci di generare il potenziale d'azione sono localizzati solo nei nodi di Ranvier, quindi a distanza di 1-2 mm; da ciò deriva il nome di *conduzione saltatoria*, infatti l'impulso si localizza solo al livello dei nodi di Ranvier. L'impulso non può rigenerarsi nei tratti dove è presente la mielina perché la depolarizzazione si distribuisce sui vari

DIFFUSIONE ELETTOTONICA

SI ESTINGUE? (SOTTO SOGLIA)

SOPRA SOGLIA →

LUNGO L'ASSONE!
+ + - -
- + + +
DENTRO S FUORI!

RUOLO DELLA MIELINA NELLA CONDUZIONE (LA MIELINA HA UNA ρ 45 VOLTE MINORE DELL'ASSONE)

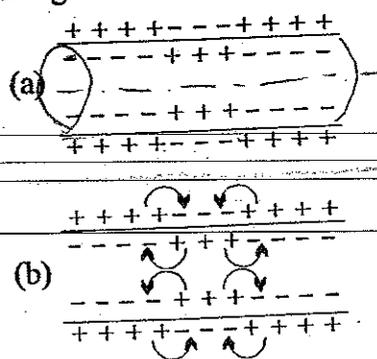


FIGURA II.10 Propagazione dell'impulso nervoso. (a) Distribuzione di carica in una membrana nervosa con depolarizzazione locale. (b) Flussi di carica nella conduzione elettrotonica.

strati della mielina (circa 50), abbassando notevolmente la variazione di potenziale (1-2 mV) e confinandola a valori sottosoglia.

Cella elementare di conduzione della membrana

Dalle considerazioni effettuate sulla conduzione elettrotonica occorre tenere presente che tutti i singoli elementi di membrana che danno risposta locale possono essere schematizzati come in figura II.8a, tuttavia scompare il potenziale E_m di riposo in quanto il circuito schematizzato in figura II.11 è un circuito dinamico (o con gergo elettronico un circuito per le variazioni). Gli studi fisiologici affermano che la generazione del potenziale d'azione dipende dalla variazione delle condut-

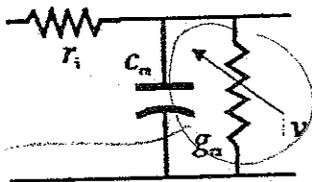


FIGURA II.11 Schema elettrico della cella elementare.

tanze ioniche in funzione del potenziale transmembrana, dunque la conduttanza g_m risulta una conduttanza variabile con la tensione e quindi schematizzata col simbolo di figura II.11 e non più come semplice conduttanza. La schematizzazione è generale in quanto, come vedremo, la relazione che intercorre tra conduttanza e potenziale transmembrana è tipica delle condizioni a cui è sottoposta la membrana stessa. In presenza di conduzione

g_m VARIA
COL POTENZIALE
V!

elettrotonica si generano correnti ioniche lungo le pareti della membrana e quindi nasce l'esigenza di considerare tra gli elementi di membrana una certa resistenza longitudinale dell'assone r_i (per comodità è espressa per unità di lunghezza). Rimane solo da modificare il circuito in modo da introdurre l'elemento capace di generare il potenziale di azione.

RESISTENZA LONGITUDINALE

→ diretti lungo l'assone

La presenza di flussi ionici longitudinali intracellulari ed extracellulari ci impone di considerare la resistenza longitudinale dei due mezzi. Il calcolo della resistenza del fluido extracellulare per la corrente esterna all'assone è molto complesso, tuttavia, assumendo che il fluido esterno alla cellula sia infinitamente esteso, si può dimostrare che la resistenza longitudinale esterna all'assone è vicina a zero; in realtà, in una fibra nervosa non c'è molto fluido extracellulare, perché gli assoni sono impacchettati e completamente chiusi insieme, comunque considereremo l'approssimazione valida.

HO RESISTENZA
SOLO
INTRA CELLULARE

Questo ci porta a dire che solo la corrente interna vede una certa resistenza longitudinale che naturalmente è legata alla lunghezza L e al raggio a_m (figura II.12); considerando tuttavia la resistenza per unità di lunghezza riusciamo ad eliminare la dipendenza da L e ciò è utile in quanto svincolala cella elementare dalla lunghezza del tratto assonico considerato sperimentalmente. L'espressione della resistenza longitudinale risulta dunque:

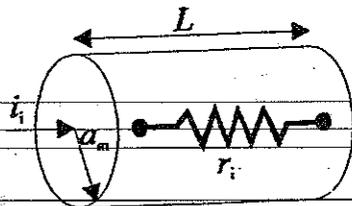


FIGURA II.12 Schema dell'interno dell'assone visto come una semplice resistenza.

$$R_x = \frac{\rho \cdot L}{S} = \frac{\rho}{S} = \frac{\rho}{\pi a^2} = \left[\frac{\Omega \cdot m}{m^2} \right] = \left[\frac{\Omega}{m} \right]$$

Anche per la resistenza longitudinale, la presenza o meno della mielina rivela una diversità di valori. Misure condotte da Hodgkin (1964) sugli assoni di rana hanno rivelato che in presenza di mielina la resistenza vale $1.4 \cdot 10^{-10} \Omega/m$ contro i $6.4 \cdot 10^{-9} \Omega/m$ di un assone non mielinato, quindi circa 45 volte più piccola. Ciò è un elemento importante per capire quale sia l'incremento di efficienza nella conduzione negli assoni mielinati.

EQUAZIONI DI CONDUZIONE PER LA CELLA ELEMENTARE

IN REGIME SOTTOSOGLIA

La conduzione elettrotonica (come visibile nella figura II.10b) avviene in quanto esiste una differenza di potenziale tra le due terminazioni del segmento elementare di membrana. Ciò implica

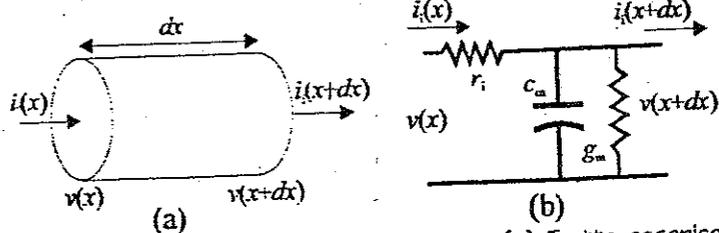


FIGURA II.14 Assone durante la conduzione (a) Tratto assonico elementare. (b) Riduzione alla cella elementare

che, se prendiamo in esame un tratto di assone lungo dx (figura II.14a), le sue terminazioni sono sottoposte alle tensioni $v(x)$ e $v(x+dx)$ e, a causa delle variazioni di carica ai capi del parallelo conduttanza-capacità, in esse scorrono le correnti $i_i(x)$ e $i_i(x+dx)$. Tale segmento può essere modellato con la cella elementare sottoposta alle stesse tensioni e nella quale entrano ed escano le stesse correnti (figura II.14b). In base a ciò l'equazione alla maglia esterna e al nodo superiore possono essere scritte nel seguente modo:

nella equazione

$$\begin{cases} v(x) - v(x+dx) = r_i i_i(x) dx \\ i_i(x) - i_i(x+dx) = \left[c_m \frac{dv(x)}{dt} + g_m v(x) \right] 2\pi a_m dx \end{cases}$$

in esse il termine dx tiene conto del fatto che r_i è una resistenza per unità di lunghezza e $2\pi a_m dx$ tiene conto del fatto che c_m e g_m sono valori per unità di superficie. Dividendo entrambi i membri per dx e passando al limite per $dx \rightarrow 0$ si ricava:

$$\begin{cases} -\frac{\partial v}{\partial x} = r_i i_i \\ \frac{\partial i_i}{\partial x} = \left[c_m \frac{\partial v}{\partial t} + g_m v \right] 2\pi a_m \end{cases}$$

Abbiamo dovuto introdurre il simbolo di derivata parziale in quanto, come vedremo nei modelli di conduzione dell'impulso nervoso, sia la corrente che il potenziale dipendono da entrambi le variabili spazio e tempo. Derivando la prima equazione e sostituendola nella seconda si ricava l'equazione generale della cella elementare:

$$c_m \frac{\partial v}{\partial t} = \frac{1}{2\pi a_m r_i} \cdot \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} - g_m v \quad \text{EQUAZIONE DEL TELEGRAFISTO} \quad (II.6)$$

La (II.6) è importante in quanto mette in evidenza che la variazione di carica sulle armature della capacità di membrana è pari alla quantità di corrente accumulata nell'assone a causa della variazione del potenziale diminuita della quantità di

corrente che fluisce attraverso la membrana. L'equazione (II.6) è scritta nella forma tipica delle equazioni delle linee di trasmissione (equazioni dei telegrafisti) nelle quali la variazione temporale del potenziale è legata alla variazione spaziale del potenziale; la (II.6) rappresenta, dunque, l'espressione di un'onda di potenziale che viaggia lungo l'assone. Se riscriviamo la (II.6) nella seguente forma:

$$\frac{1}{2\pi a_m r_i} \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} - c_m \frac{\partial v}{\partial t} = j_m \quad (\text{II.7})$$

nella quale j_m rappresenta la densità di corrente che fluisce attraverso la membrana, si vede esplicitamente che le variazioni temporali e spaziali del potenziale transmembrana sono legate direttamente alla corrente che fluisce attraverso la membrana. La (II.6) spesso viene scritta anche nella seguente forma:

$$\frac{1}{2\pi a_m r_i g_m} \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} - \frac{c_m}{g_m} \frac{\partial v}{\partial t} - v = 0 \quad \rightarrow \quad \frac{1}{\lambda^2} \frac{\partial^2 v(x)}{\partial x^2} - \tau \frac{\partial v(x)}{\partial t} - v(x) = 0$$

I due fattori che moltiplicano le derivate rappresentano due elementi fondamentali che caratterizzano la membrana nervosa. Infatti il termine c_m/g_m rappresenta la costante di tempo τ , essa indica il tempo necessario alle concentrazioni ioniche per raggiungere l'equilibrio chimico (morte del neurone), una volta che le pompe sodio-potassio vengano bloccate. Il termine $1/2\pi a_m r_i g_m$ è una costante di lunghezza, viene indicata con λ^2 , ha le dimensioni dell'inverso di una lunghezza al quadrato ed è legata alla distanza con cui si deve propagare l'impulso per essere degradato al valore di riposo E_m . Infatti, se si stimola l'assone nel punto $x=0$ con un potenziale transmembrana v_0 costante nel tempo, il termine $\partial v/\partial t$ si annulla e l'equazione ottenuta ha come soluzione i seguenti esponenziali:

$$v = \begin{cases} v_0 e^{-x/\lambda} & \text{se } x > 0 \\ v_0 e^{x/\lambda} & \text{se } x < 0 \end{cases}$$

Essi ci dicono che, se il valore del potenziale transmembrana viene mantenuto costante nel tempo, non si ha nessuna propagazione, perché la variazione di potenziale si annulla praticamente entro una lunghezza pari a $1/\lambda$.

GENESI DEL POTENZIALE D'AZIONE

Il meccanismo ionico del potenziale d'azione

Effettuando alcuni calcoli sui potenziali transmembrana è possibile vedere che il termine di leakage, in cui abbiamo concentrato tutti i fattori non dipendenti dagli ioni sodio e potassio, ha una conduttanza praticamente costante e quindi non influenza in modo apprezzabile l'andamento del potenziale d'azione. I due elementi che sono alla base della genesi del potenziale d'azione sono rappresentati dagli ioni sodio e potassio. Il meccanismo si basa sull'apertura o la chiusura dei canali dei due ioni e al meccanismo delle pompe attive. Un sufficiente aumento del flusso di sodio

LE POMPE
 NA/K CONTINUA
 NO NORMALMENTE
 A LAVORARE,
 CIO' CHE INTERVIENE E'
 L'APERTURA DI CHANNELS!

$$g_m = fct(t, \text{potenziale}, V)$$

verso l'interno della cellula e quindi un aumento della conduttanza g_{Na} provoca immediatamente una depolarizzazione. Ciò è dovuto al fatto che il potenziale di riposo del sodio è 58 mV e quindi un aumento di concentrazione del sodio all'interno della membrana porta il potenziale transmembrana verso tale valore. Le evidenze sperimentali hanno dimo-

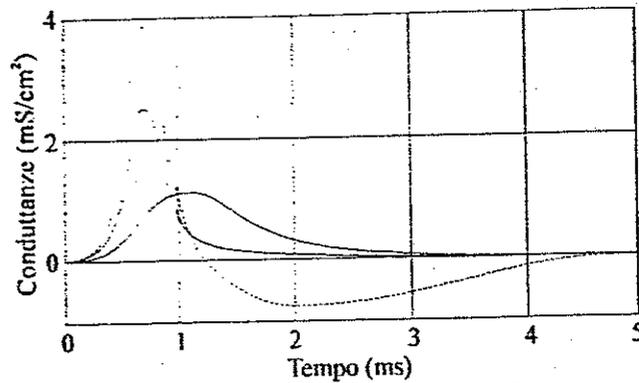


FIGURA II.15 Andamento delle conduttanze confrontate con l'andamento del potenziale di azione.

NOTA CHE
SI HANNO
POMPE ATTIVE
Na-K CHE LAVO
RANO E
ZINALI Na e K
CHE SI APRONO
PER DIFFUSIONE

strato che il rapido tratto ascendente del potenziale di azione è dovuto ad un rapido incremento della conduttanza del sodio, la quale ha il suo massimo in corrispondenza di quello del potenziale di azione (figura II.15). Il processo è rapido a causa di un meccanismo autoattivante della apertura dei canali del sodio; tale processo, tuttavia è funzione del potenziale, per cui man mano che il potenziale cresce la capacità di attivare altri canali diminuisce. In contemporanea, l'aumento del flusso di potassio verso l'esterno e quindi l'aumento della conduttanza del potassio g_K provoca uno sbilanciamento del potenziale transmembrana anche verso quella del potassio

il fatto che entrano
più Na^+ di quanto
escono K^+ mi pare
sia dovuto al
fatto che rimangono
le porte cioè più
+ della Na^+

(-96 mV), tuttavia la crescita della conduttanza del potassio è graduale ed ha un massimo a circa metà della fase di ripolarizzazione (figura II.15). Il fatto che sia graduale sembra attribuibile alla mancanza dell'effetto autoattivante. Quindi la presenza sia della diminuzione della capacità di autoattivazione dei canali del sodio, sia del graduale attivarsi dei canali del potassio innescano una tendenza ripolarizzante ed il potenziale transmembrana non può raggiungere i 58 mV, ma si ferma ad un valore compreso tra i 40 ed i 50 mV. Il rapido ripolarizzarsi è spiegato dalla grande capacità del potenziale di rendere inattivi i canali del sodio e al fatto che i canali del potassio, pur lentamente, ma si attivano; infatti il potenziale di riposo del potassio è maggiore in valore assoluto di quello del sodio, quindi gioca un ruolo predominante nella legge di Goldman (II.3). A questo punto la conduttanza del sodio tende al suo valore di riposo, tuttavia la conduttanza del potassio, non avendo un effetto disattivante (come il sodio), tende a decrescere con una lentezza analoga a quella con la quale era aumentata, dunque si verifica uno sbilanciamento verso il potenziale di riposo del potassio, con il conseguente overshoot negativo. Non si raggiunge il valore di -96 mV a causa del contributo del sodio nella formula di Goldman (II.3).

Ai fini della genesi del potenziale d'azione è importante accennare al fatto che il meccanismo di depolarizzazione e successiva ripolarizzazione è legato in modo differente ai canali e alle pompe attive a seconda della dimensione della fibra considerata. Infatti nelle grosse fibre, la presenza delle pompe è necessaria soprattutto per gestire la condizione di non equilibrio a riposo e quindi la polarizzazione e successiva ripolarizzazione è legato essenzialmente alla quantità di canali aperti; mentre nelle piccole fibre le pompe hanno un maggior peso anche nella genesi del potenziale d'azione. Ciò è confermato dalla diversa quantità di impulsi generati: per grosse fibre la pompa si esaurisce dopo circa 100'000 impulsi, mentre per piccole fibre non si arriva a 10. La spiegazione di ciò può essere legata alla quantità disponibile di canali attivabili per le maggiori dimensione della fibra stessa.

LA TECNICA DEL VOLTAGE-CLAMP

Gran parte delle attuali conoscenze sui meccanismi ionici del potenziale di azione deriva da esperimenti eseguiti con la tecnica del *voltage-clamp* (blocco del voltaggio). Questa tecnica, applicata da Hodgkin ed Huxley sull'assone gigante di calamaro negli anni quaranta, sfrutta un sistema di controllo elettronico (figura II.16) capace di spostare rapidamente e mantenere costante la differenza di potenziale transmembrana ($\sum v/cx^2=0$ nella (II.6)) ad un valore imposto dallo sperimentatore. Si inseriscono due elettrodi all'interno dell'assone ed un terzo viene posto nel materiale che circonda la cellula;

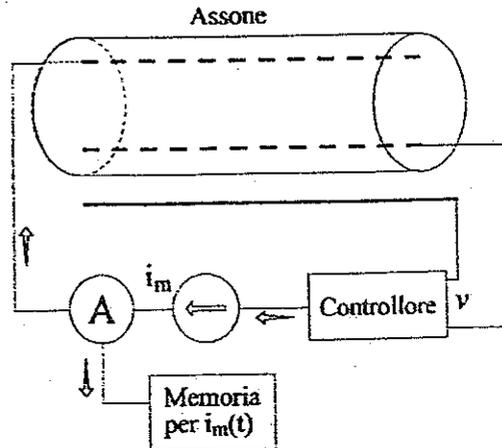


FIGURA II.16 Schema delle connessioni tra l'apparecchiatura di misura e l'assone nella tecnica del *voltage-clamp* (voltage bloccato).

con uno dei due elettrodi interni e quello esterno si misura e si mantiene costante il potenziale transmembrana, mentre con l'altro elettrodo interno si inietta o rimuove una corrente dall'assone. Attraverso la misura del potenziale transmembrana e della corrente che fluisce attraverso la membrana è possibile ricavare i valori della conduttanza. Per provare che la genesi del potenziale d'azione era dovuta alla membrana per mezzo della variazione di conduttanza agli ioni sodio e potassio, Hodgkin ed Huxley effettuarono esperimenti di generazione del potenziale d'azione dopo aver modificato i valori di concentrazione oppure dopo aver sostituirono l'assoplasma con soluzioni elettrolitiche isotoniche costituite da molecole differenti da ioni sodio e potassio. Nei vari esperimenti osservarono la scomparsa di alcune componenti delle correnti ioniche e dei potenziale di azione.

N COSTANTE LUNGO X

1 IN ETTO CARICHE => DEPOLARIZZO LA MEMBRANA g

Quando la membrana dell'assone viene depolarizzata ad un valore sottosoglia non si genera nessun potenziale di azione e la variazione di tensione si annulla con andamento esponenziale, mentre, se la depolarizzazione è rapida e soprasoglia, si produce un'istantanea corrente della durata di pochi microsecondi, dovuta alla variazione di carica ai capi della capacità di membrana ($c_m \partial v / \partial t$ nella (II.6)). Segue poi una corrente che scorre con lo stesso andamento temporale del potenziale di

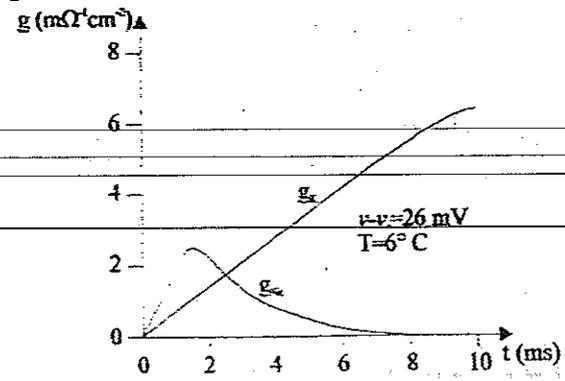


FIGURA II.17 Andamento delle conduttività del sodio e del potassio nel tempo in un esperimento effettuato con la tecnica del *voltage-clamp*. Al tempo $t=0$ è stato applicato un Δv di 26 mV.

azione (figura II.17). Questa corrente (j_m nella (II.9)) è la somma di due contributi: una corrente che fluisce verso l'interno dovuta agli ioni sodio ed una corrente che fluisce verso lo esterno dovuta agli ioni potassio. La separazione dei due contributi è stata effettuata sostituendo l'assoplasma con concentrazioni isotoniche di diversa composizione molecolare.

$$j_m = j_{Na} + j_K$$

Inoltre, questi esperimenti hanno confermato la presenza di canali diversi per gli ioni sodio e potassio, e la presenza di elementi in grado di

accentuare l'attivazione (*barriere di attivazione*) e l'inattivazione (*barriere di inattivazione*), cioè responsabili dei meccanismi di autoattivazione e autodisattivazione. In particolare si è trovato che i canali del sodio hanno sia le barriere di attivazione che quelle di inattivazione, mentre i canali del potassio hanno solo quelle di inattivazione. Recenti esperimenti hanno messo in evidenza l'apertura e la chiusura dei canali del sodio e del potassio grazie alla presenza di deboli extracorrenti di apertura e chiusura tipiche dei circuiti elettrici.

Il modello ohmico della membrana

Un semplice modello di membrana è quello che obbedisce alla legge di Ohm. Tuttavia, questa approssimazione è valida solo se la tensione ai capi della membrana subisce variazioni sufficientemente piccole da non far variare la conduttanza di quest'ultima.

In tale stato di equilibrio, la tensione lungo l'interno dell'assone è costante e vale E_m , quindi entrambe le derivate $\partial v / \partial t$ e $\partial^2 v / \partial x^2$ sono nulle. L'equazione (II.6) è soddisfatta quindi solo dal valore $j_m = 0$. Sebbene j_m sia globalmente nulla, essa sembra essere costituita da flussi di corrente opposti, legati essenzialmente agli ioni sodio e potassio. La bassa differenza di potenziale non scatena il meccanismo autoattivante e quindi i flussi di corrente di sodio e potassio possono essere equiparati. Assumiamo che j_m sia proporzionale alla differenza di tensione $v - E_m$, cioè:

$$j_m = g_m (v - E_m)$$

Questo semplice modello prevede che $j_m = 0$ quando $v = E_m$, inoltre ci dice che la corrente è positiva (verso l'esterno) se $v > E_m$ e negativa (verso l'interno) se $v < E_m$. Tuttavia questo modello non spiega la propagazione dell'impulso nervoso, dato che la conduttanza per unità di area g_m è stata assunta indipendente da v e dalla storia passata della membrana. Tale approssimazione è quindi valida solo nel caso di piccole variazioni. Con queste assunzioni, l'equazione (II.7) diventa:

$$c_m \left(\frac{\partial v}{\partial t} \right) = -g_m (v - E_m) + \frac{1}{2\pi a_m r_i} \left(\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} \right)$$

Generalmente questa equazione è scritta in modo da isolare nel membro di sinistra tutti i termini contenenti la tensione variabile v .

$$\frac{1}{2\pi a_m r_i g_m} \left(\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} \right) - \frac{c_m}{g_m} \left(\frac{\partial v}{\partial t} \right) - v = -E_m$$

In essa si ritrovano i due fattori che individuano la costante di tempo e quella di lunghezza, per cui è possibile scrivere la seguente equazione:

$$\lambda^2 \left(\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} \right) - \tau \left(\frac{\partial v}{\partial t} \right) - v = -E_m \quad (\text{II.8})$$

Si può facilmente ricavare che la soluzione $v = E_m$ è una soluzione stazionaria in quanto E_m è costante. Ciò ci permette di definire una nuova variabile $v' = v - E_m$ e di rendere omogenea l'equazione. Per comodità di scrittura eliminiamo l'apice ($v' \equiv v$), ottenendo:

$$\lambda^2 \left(\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} \right) - \tau \left(\frac{\partial v}{\partial t} \right) - v = 0$$

Questa equazione rappresenta la classica equazione dei telegrafisti. Le caratteristiche del modello della membrana rendono tale equazione di semplice soluzione per il fatto che né τ né λ^2 dipendono dalla tensione.

Il modello di Hodgkin-Huxley

Gli studi condotti da Hodgkin ed Huxley sulle variazioni delle conduttanze di sodio e potassio hanno portato alla costruzione di un modello semi-empirico, ma adeguato a descrivere la propagazione dell'impulso nervoso in regime di voltage-clamp (del resto la maggioranza degli esperimenti da loro condotti furono proprio con la tecnica del voltage-clamp).

I differenti comportamenti delle conduttanze del sodio, del potassio e della componente di leakage implicano uno studio separato dei tre elementi. Come già osservato nel ricavare il modello della membrana a riposo, la densità di corrente j_m è data dalla somma delle tre densità di corrente:

$$j_m = j_{Na} + j_K + j_L \quad (\text{II.9})$$

dove le tre correnti sono espresse dalle seguenti equazioni:

$$j_{Na} = g_{Na} (v - E_{Na}) \quad (\text{II.10})$$

$$j_K = g_K (v - E_K) \quad (\text{II.11})$$

$$j_L = g_L (v - E_L) \quad (\text{II.12})$$

Il numero degli ioni che attraversano la membrana durante un impulso nervoso è così piccolo da non variare significativamente le concentrazioni degli ioni stessi all'interno e all'esterno della membrana, pertanto queste concentrazioni possono essere assunte costanti e fissate. Da questa considerazione deriva che i flussi medi degli ioni risultano nulli, quindi, è lecito applicare le equazioni di Nernst e scrivere ancora le equazioni in funzione dei potenziali di equilibrio dei singoli ioni.

Mentre è possibile misurare direttamente le variazioni di corrente ionica, non è possibile farlo con le variazioni di conduttanza, quindi occorre una relazione o un espediente che leghi corrente e conduttanza in modo biunivoco. Le equazioni (II.10), (II.11) e (II.12) legano correnti e conduttanze, tuttavia la relazione è resa complessa a causa della variabilità della tensione. La tecnica del voltage-clamp permise ad Hodgkin e ad Huxley di rendere costanti le differenze di potenziale contenute nelle (II.10), (II.11) e (II.12), facendo corrispondere alle correnti ioniche direttamente le conduttanze attraverso una semplice proporzionalità.

La conduttanza del potassio

In base agli esperimenti condotti con la tecnica del voltage-clamp si ricava che, fissato il potenziale transmembrana, l'andamento della conduttanza del potassio è quello di figura II.17; variando il potenziale, si ottiene che, per uno stesso intervallo di tempo dall'applicazione dell'impulso, la conduttanza cresce con l'aumentare del potenziale transmembrana (figura II.18). Da questi risultati si ricava che la conduttanza del potassio (per ogni singola cella elementare) è una funzione del potenziale e del tempo, cioè si ha: $g_K(v,t)$.

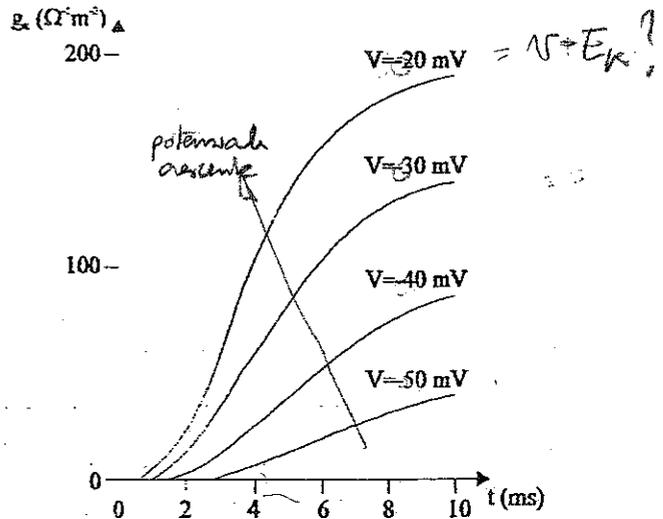


FIGURA II.18 L'andamento della conduttività dello ione potassio per differenti valori di tensione costante.

Sulla base dei meccanismi ionici la conduttanza associata ai singoli canali può essere considerata in media costante ed identificabile con un valore \bar{g}_K

(360 S/m²); da questo è possibile ipotizzare (almeno per una fibra abbastanza grossa in cui l'effetto dinamico delle pompe attive è trascurabile) che la conduttanza del potassio sia legata al numero $n_K(v,t)$ dei canali attivati. Sperimentalmente si vede inoltre che l'attivazione e l'inattivazione dei canali è funzione del potenziale transmembrana e dalla temperatura. Possiamo allora considerare la funzione $n_K(v,t)$ come la probabilità che un canale sia attivo. In questo modo si può assumere che l'incremento di canali attivi dn_K nell'unità di tempo è esprimibile con la seguente equazione differenziale del primo ordine (la soluzione ha un andamento esponenziale come visibile dalla figura II.18):

$$\frac{dn_K(v)}{dt} = f(v,T)[1 - n_K(v)] - w(v,T)n_K(v) \quad (II.13)$$

Il termine $[1 - n_K(v)]f(v,T)$ rappresenta la probabilità che, al valore v del potenziale, un canale si attivi; questo termine è dato dal prodotto della frazione di canali inattivi (e potenzialmente in grado di attivarsi) per la capacità $f(v,T)$ di attivazione (assunta come funzione del potenziale v e della temperatura T). Il secondo termine $n_K(v)w(v,T)$ rappresenta la probabilità che al valore v del potenziale, un canale si disattivi (esso ha ovviamente segno negativo in quanto l'incremento $dn_K(v)$ viene diminuito del numero di canali disattivati); questo termine è dato dal prodotto della frazione di canali attivi (e potenzialmente in grado di disattivarsi) per la capacità $w(v,T)$ di inattivazione (assunta funzione del potenziale v e della temperatura T).

La descrizione delle funzioni $f(v,T)$ e $w(v,T)$ è stata ricavata per via empirica e in modo esatto per la temperatura $T=6.3^\circ\text{C}$ (279°K), tuttavia sperimentalmente è stato trovato che la variazione con la temperatura può essere considerata aumentando sia $f(v,T)$ che $w(v,T)$ di un fattore 3 per ogni incremento di 10°C . Con questa ultima considerazione si ottengono le seguenti espressioni:

$\langle g_K \rangle \rightarrow$

$g_K = f(n_K(v,t), T)$



$$f(v, T) = 0.01 \cdot 3^{(T-6.3) \cdot 10} \cdot \frac{10 - v + E_m}{\exp\left(\frac{10 - v + E_m}{10}\right) - 1}$$

$$w(v, T) = 0.125 \cdot 3^{(T-6.3) \cdot 10} \cdot \exp\left(\frac{-v + E_m}{80}\right)$$

dove le temperature vanno espresse in gradi centigradi, le tensioni in millivolt. L'equazione (II.13) è di facile soluzione solo se si effettua un'integrazione senza considerare che v varia nel tempo ($v=v(t)$), tuttavia si può ipotizzare (ipotesi azzardata, ma praticabile) che il corretto valore di n_K si possa ricavare dall'integrazione della (II.13) nella quale si inseriscono i valori istantanei delle funzioni $f(v, T)$ e $w(v, T)$ calcolate per $v=v(t)$. In tal caso si ricava la seguente espressione per $n_K(v, t)$:

$$n_K(v, t) = \frac{f}{f + w} \left\{ 1 - \exp[-(f + w)t] \right\}$$

dove per comodità grafica abbiamo ommesso le dipendenze dalla temperatura e dal potenziale. Analizzando le curve di figura II.18 da un punto di vista matematico, si osserva che pur avendo andamenti esponenziali si annullano nell'origine con derivata nulla, quindi occorre elevare la funzione ad un'esponente maggiore dell'unità. Per via empirica si trova che le funzioni che approssimano bene quelle di figura II.18 hanno nulle anche la derivata seconda e terza, quindi occorre elevare alla quarta potenza la $n_K(v, t)$. Infine, moltiplicando per \bar{g}_K si ottiene la funzione definitiva per la conduttanza del potassio $g_K(v, t)$:

$$g_K(v, t) = \bar{g}_K \cdot n_K^4(v, t)$$

LA CONDUTTANZA DEL SODIO

In base agli esperimenti condotti con la tecnica del voltage-clamp si ricava che, fissato il potenziale transmembrana, l'andamento della conduttanza del sodio è quello di figura II.19; variando il potenziale, si ottiene che, per uno stesso intervallo di tempo dall'applicazione dell'impulso, la conduttanza cresce con l'aumentare del potenziale transmembrana. Da questi risultati si ricava che la conduttanza del sodio (per ogni singola cella elementare) è una funzione del potenziale v e del tempo $g_{Na}(v, t)$.

Analizzando la curva di figura II.19 ci si accorge che essa si annulla nell'origine con pendenza nulla. Dagli studi fisiologici si è trovato che, anche per il sodio, la conduttanza associata ai singoli canali è in media costante ed identificabile con un valore \bar{g}_{Na} (1200 S/m^2); pertanto è possibile ipotizzare (almeno per una fibra abbastanza grossa in cui l'effetto dinamico delle pompe attive è trascurabile) che la conduttanza del sodio sia legata al

numero $n_{Na}(v, t)$ dei canali attivati. Sperimentalmente si vede inoltre che l'attivazione e l'inattivazione dei canali è funzione del potenziale transmembrana e dalla temperatura. A causa della presenza del massimo la funzione $n_{Na}(v, t)$ (che

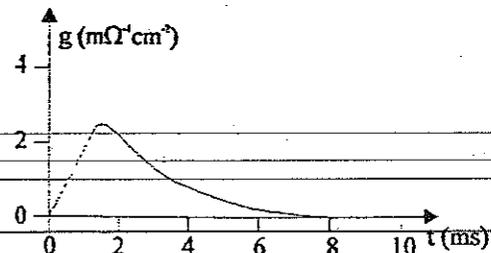


FIGURA II.19 Andamento delle conduttività del sodio nel tempo in un esperimento con la tecnica del blocco del voltaggio. Al tempo $t=0$ è stato applicato un Δv di 26 mV .

rappresenta la probabilità che un canale sia attivo) deve essere separata in due contributi, uno che tiene conto del tratto ascendente $n_{NaA}(v, t)$, l'altro che tiene conto del tratto discendente della caratteristica $n_{NaD}(v, t)$. In questo modo si può assumere separatamente l'incremento di canali attivi nel tratto ascendente (dn_{NaA}) e il decremento di canali attivi nel tratto discendente (dn_{NaD}); ognuno di essi, in analogia al potassio viene espresso dalle seguenti equazioni differenziali del primo ordine:

$$\begin{aligned} \frac{dn_{NaA}(v)}{dt} &= [1 - n_{NaA}(v)]h_A(v) - k_A(v)n_{NaA}(v) \\ \frac{dn_{NaD}(v)}{dt} &= [1 - n_{NaD}(v)]h_D(v) - k_D(v)n_{NaD}(v) \end{aligned} \quad (\text{II.14})$$

I ruoli svolti dalle funzioni $h_A(v)$, $h_D(v)$, $k_A(v)$, $k_D(v)$ sono analoghi a quelli svolti dalle funzioni $f(v)$ e $w(v)$ dell'equazione (II.13). Anche queste funzioni dipendono dalla temperatura T , tuttavia per motivi grafici abbiamo considerato implicita tale dipendenza. Le espressioni analitiche riportate di seguito sono esatte solo per una temperatura $T=6.3^\circ\text{C}$ e sono state corrette per le altre temperature con un coefficiente moltiplicativo identico a quello del potassio (un fattore 3 per ogni 10°C):

$$h_A(v) = 0.1 \cdot 3^{(T-6.3)/10} \cdot \frac{25 - v - E_m}{\exp\left(\frac{25 - v - E_m}{10}\right) - 1}$$

$$k_A(v) = 4 \cdot 3^{(T-6.3)/10} \cdot \exp\left(\frac{-v + E_m}{18}\right)$$

$$h_D(v) = 0.07 \cdot 3^{(T-6.3)/10} \cdot \exp\left(\frac{-v + E_m}{20}\right)$$

$$k_D(v) = 3^{(T-6.3)/10} \cdot \frac{1}{\exp\left(\frac{30 - v + E_m}{10}\right) - 1}$$

dove le temperature sono espresse in gradi centigradi e le tensioni in millivolt. Come nel caso del potassio, le equazioni (II.14) sono di facile soluzione solo se si effettua un'integrazione senza considerare che v varia nel tempo ($v=v(t)$), tuttavia si può nuovamente ipotizzare che il corretto valore di n_{NaA} e di n_{NaD} si possa ricavare dall'integrazione della (II.14) nella quale si inseriscono i valori istantanei delle funzioni $h_A(v)$, $h_D(v)$, $k_A(v)$, $k_D(v)$, calcolate per $v=v(t)$. In tal caso si ricava le seguenti espressioni:

$$n_{NaA}(v, t) = \frac{h_A}{h_A + k_A} \left\{ 1 - \exp[-(h_A + k_A)t] \right\}$$

$$n_{NaD}(v, t) = \frac{h_D}{h_D + k_D} \left\{ 1 - \exp[-(h_D + k_D)t] \right\}$$

dove per comodità grafica abbiamo ommesso le dipendenze dalla temperatura e dal potenziale. La conduttanza del sodio si ottiene dunque dalla seguente espressione:

$$g_{Na}(v, t) = \bar{g}_{Na} \cdot n_{NaA}^3(v, t) \cdot n_{NaD}(v, t)$$

LA CONDUTTANZA DEL FATTORE DI LEAKAGE

Gli studi fisiologici hanno dimostrato che la conduttanza del fattore di leakage non ha una grande influenza sulla genesi del potenziale d'azione a causa del fatto che la g_L è praticamente costante al variare del potenziale transmembrana, dunque il modello ohmico è più che soddisfacente per descrivere questo termine. Il valore assunto da Hodgkin ed Huxley è un valore empirico pari a 3 S/m^2 . Il flusso di corrente di leakage, tuttavia, viene espresso anche in termini di un potenziale E_L , che ancora su base empirica viene assunto essere pari a -60 mV .

PROPAGAZIONE DELL'IMPULSO NERVOSO

Dopo aver esaminato alcuni modelli per la densità di corrente di membrana j_m , esaminiamo le soluzioni dell'equazione (II.7) e cerchiamo di capire se esse sono in grado effettivamente di rappresentare un impulso nervoso viaggiante lungo la fibra nervosa.

La (II.7) non è di facile soluzione a causa della complessità del termine j_m , dunque occorre inserire condizioni aggiuntive restringendo il campo di validità della soluzione.

Stimolazione sottosoglia

Ogni cella elementare è in grado di generare un potenziale di azione se stimolata sopra il valore di soglia, tuttavia anche se la variazione di potenziale transmembrana rimane sottosoglia si verifica un'onda di tensione che si propaga lungo la fibra nervosa. Quest'onda è in grado di portare ad una debole conduzione elettrotonica lungo tutto l'assone; anche questa conduzione può essere vista come un'onda di corrente che viaggia lungo la fibra nervosa (*propagazione elettrotonica*). In base a tali considerazioni si può usare il modello ohmico e studiare la propagazione sulla base dell'equazione (II.8).

REGIME di VOLTAGE-CLAMP

Se effettuiamo lo studio mantenendo il voltaggio bloccato ad un valore fissato e quindi indipendente dalla posizione lungo l'assone, il termine $\partial^2 v / \partial x^2$ è nullo, dunque la (II.8) si riduce alla seguente espressione:

$$\tau \frac{\partial v}{\partial t} - v = -E_m$$

Tenendo presente che il valore iniziale della variazione di potenziale è v_0 , la soluzione che si ottiene vale:

$$v = E_m + v_0 e^{-t/\tau}$$

Questa soluzione rappresenta l'andamento della tensione dovuta ad una variazione di carica ai capi della capacità di membrana, tuttavia, essendo una soluzione valida a tutti gli istanti per ogni punto della fibra, non può essere considerata una vera e propria propagazione, ma piuttosto una semplice variazione del potenziale transmembrana.

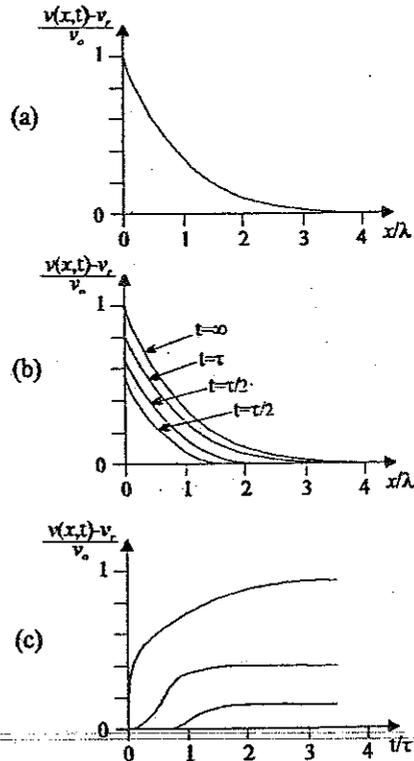
CASO GENERALE

Senza imporre nessuna condizione aggiuntiva cerchiamo di risolvere la (II.8). Cominciamo con il considerare il fatto che la stimolazione sottosoglia non scatena nelle singole celle elementari il processo per il quale il potenziale d'azione viene rigenerato; ciò porta, con il passare del tempo, alla degradazione dell'onda di potenziale stessa. Questo fenomeno è dovuto essenzialmente al termine di derivata temporale del potenziale che tiene conto del riequilibrarsi della capacità di membrana. Dal punto di vista analitico il fenomeno può essere considerato utilizzando la seguente funzione e le sue derivate:

$$v(x,t) = z(x,t)e^{-t/\tau}$$

$$\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} = \frac{\partial^2 z}{\partial x^2} e^{-t/\tau}$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} = \left(-\frac{z}{\tau} + \frac{\partial z}{\partial t} \right) e^{-t/\tau}$$



Sostituendo nella (II.8), raccogliendo l'esponentiale e semplificandolo, si ottiene:

$$\frac{\lambda^2}{\tau} \frac{\partial^2 z}{\partial x^2} = \frac{\partial z}{\partial t}$$

Questa equazione è analoga alla legge di diffusione (seconda legge di Fick), la cui soluzione è presentata in forma grafica in figura II.20. I grafici di figura II.20 sono ottenuti eccitando l'assone nel punto $x=0$ con una corrente costante mantenuta per un certo intervallo di tempo.

FIGURA II.20 Soluzioni grafiche della stimolazione sotto soglia. (a) Andamento del potenziale lungo l'assone a regime. (b) Andamento del potenziale lungo l'assone per diversi tempi dopo l'applicazione della corrente costante. (c) Andamento del potenziale in un punto fissato sull'assone in funzione del tempo.

Stimolazione soprasoglia in una fibra non mielinata

Se viene stimolata una fibra non mielinata soprasoglia (-60 mV), si genera un potenziale d'azione che depolarizza e ripolarizza la membrana in modo molto forte. Questa successione di eventi è in grado di attivare il processo di rigenerazione delle

celle elementari, permettendo la propagazione dell'impulso nervoso attraverso la fibra. Nelle fibre non mielinate le celle elementari sono disposte una accanto all'altra e quindi il meccanismo di attivazione attraverso la conduzione elettrotonica è più lento e la velocità di propagazione non può raggiungere valori molto elevati.

In questo caso non è più possibile considerare la membrana come ohmica, dato che la conduzione elettrotonica diventa un processo locale che ha il compito di scatenare la genesi del potenziale nella cella elementare contigua. Dal punto di vista generale, possiamo dunque considerare l'equazione (II.7) nella quale inserire a seconda del fenomeno da studiare un modello adeguato per la densità di corrente o, utilizzando le (II.9), (II.10), (II.11) e (II.12), per le conduttanze degli ioni sodio e potassio e del leakage.

REGIME di VOLTAGE-CLAMP

In questo caso uno dei modelli adeguati per le conduttanze è quello di Hodgkin ed Huxley in quanto è stato ricavato proprio con tecniche di voltage-clamp.

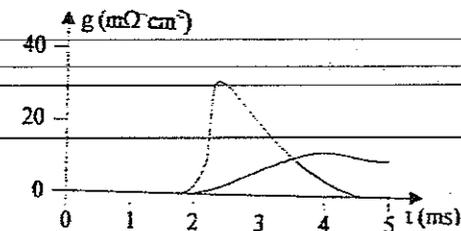
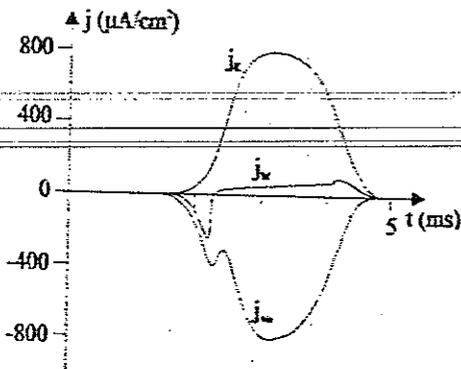
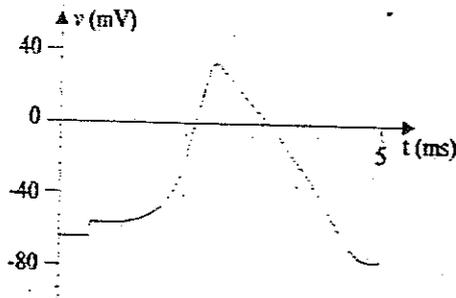


FIGURA 11.21 Grafico dell'andamento del potenziale (alto), delle correnti (centro) e delle conduttanze (basso) per il regime di voltage-clamp alla temperatura $T=6.3^{\circ}\text{C}$. (Grafico ottenuto dall'esecuzione del programma Pascal riportato alla fine del capitolo).

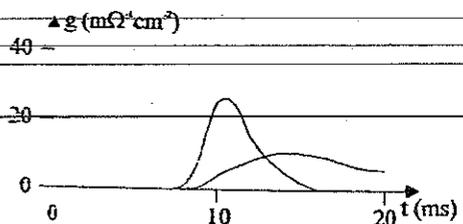
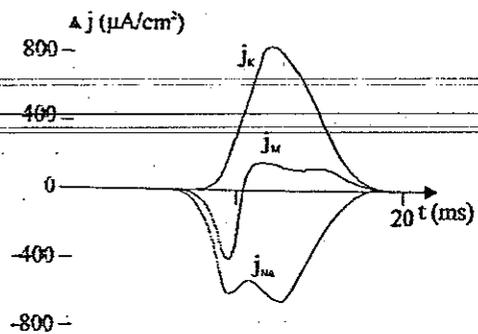
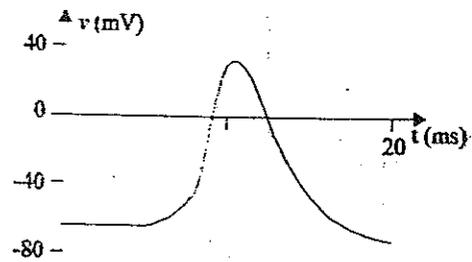


Figura 11.22 Grafico dell'andamento del potenziale (alto), delle correnti (centro) e delle conduttanze (basso) per il regime di voltage-clamp alla temperatura $T=6.3^{\circ}\text{C}$ (Grafico ottenuto dall'esecuzione del programma Pascal riportato alla fine del capitolo).

Utilizzando dunque le (II.9), (II.10), (II.11) e (II.12) riscriviamo la (II.7) tenendo presente che il termine $\partial^2 v / \partial x^2$ è nullo:

$$c_m \frac{\partial v}{\partial t} = -g_{Na}(v - E_{Na}) - g_K(v - E_K) - g_L(v - E_L) \quad (\text{II.14})$$

La soluzione di questa equazione viene data per via grafica attraverso le figure II.21 e II.22, nelle quali sono riportati i grafici per due temperature diverse dell'impulso di tensione, delle correnti e delle conduttanze. La corrente j_m è proporzionale a $\partial v / \partial t$. Inoltre, sebbene g_{Na} abbia un andamento regolare, la j_{Na} ha una oscillazione intorno a 2 ms; questa è causata dal rapido cambiamento della tensione, dato che $j_{Na} = g_{Na}(v - E_{Na})$. Le correnti degli ioni sodio e potassio si bilanciano strettamente in tutto l'intervallo temporale considerato, anche se questo non si direbbe nell'osservare il grafico delle conduttanze in cui la corrente del potassio si produce con un certo ritardo. Questo fenomeno è dovuto alla tensione non costante. Dal confronto delle figure II.21 e II.22 ci si rende conto che l'impulso di tensione tende a strettirsi con l'aumentare della temperatura. Infatti mentre a $T=6.3^\circ\text{C}$ ha una durata di circa 2 ms a $T=18.5^\circ\text{C}$ dura solo 1 ms circa.

CASO GENERALE

Nel caso più generale, nell'equazione (II.7) sono presenti tutti i termini; tuttavia è possibile semplificare la scrittura introducendo alcune grandezze espresse dalle seguenti relazioni:

$$j_m = g_m(v) \cdot v$$

$$\tau(v) = \frac{c_m}{g_m(v)}$$

$$\lambda^2(v) = \frac{1}{2\pi a \epsilon_r g_m(v)}$$

Esse ci permettono di riscrivere la (II.7) nel seguente modo:

$$\tau(v) \frac{\partial v}{\partial t} - \lambda^2(v) \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + v = 0 \quad (\text{II.15})$$

La (II.15) può essere risolta numericamente, tuttavia possiamo effettuare alcune considerazioni generali. Essa ricorda molto le equazioni d'onda, dunque è lecito supporre che il legame tra la coordinata spaziale x e il tempo sia la velocità di propagazione u dell'onda di potenziale all'interno della fibra. Con questo presupposto possiamo ipotizzare che il potenziale sia della forma seguente:

$$v(x, t) = v(x - ut)$$

Definiamo una nuova variabile $z = x - ut$. Le sue derivate spaziali e temporali risultano:

$$\begin{cases} \frac{\partial v}{\partial t} = -u \\ \frac{\partial v}{\partial x} = 1 \end{cases}$$

Quindi le derivate seconde temporali e spaziali del potenziale sono espresse dalle seguenti relazioni:

$$\begin{cases} \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} = \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} \\ \frac{\partial^2 v}{\partial t^2} = \frac{1}{u^2} \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} \end{cases}$$

Combinando insieme le derivate seconde (moltiplicando per $1/u^2$ la derivata temporale e sottraendola da quella spaziale), otteniamo proprio l'equazione di un'onda piana:

$$\frac{\partial^2 v}{\partial x^2} = \frac{1}{u^2} \frac{\partial^2 v}{\partial t^2}$$

Essa ci permette di sostituire la derivata seconda spaziale nella (II.14) riducendola ad una equazione differenziale di secondo grado:

$$\frac{\partial^2 v}{\partial t^2} - \frac{u^2 \tau(v)}{\lambda^2(v)} \frac{\partial v}{\partial t} - \frac{u^2}{\lambda^2(v)} v = 0$$

Si può vedere che se vengono usati valori arbitrari per u , la soluzione che esprime $v(t)$ "esplode"; tuttavia, esiste un particolare valore di u per cui la soluzione converge e dà origine ad un'onda non stazionaria. Tale u si chiama **autovalore di velocità**, esso risulta essere molto vicino al valore della velocità di propagazione misurato sperimentalmente. La soluzione grafica di questa equazione è stata trovata da Hodgkin ed Huxley e riportata in figura II.23.

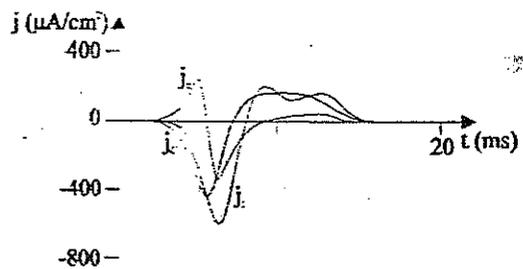
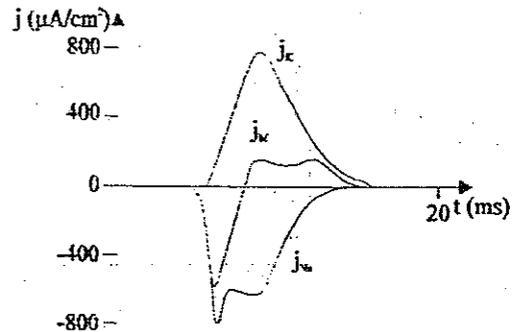
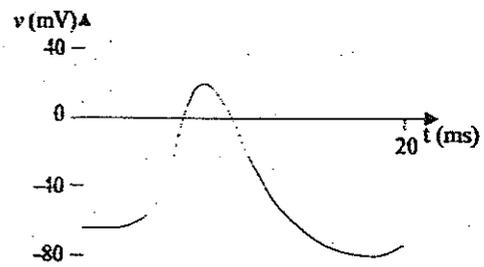


FIGURA II.23 Propagazione dell'impulso nervoso nell'assone di calamaro a $T=18.3^\circ\text{C}$ calcolata da Hodgkin e Huxley nel 1952. Nel grafico in basso i tre termini indicano: j_c il contributo di corrente dovuto a C_m , j_v il contributo legato alla derivata seconda temporale e j_x il contributo legato alla derivata seconda spaziale.

Propagazione dell'impulso in una fibra mielinata

La struttura di una fibra mielinata è caratterizzata dall'alternanza di tratti mielinati e di tratti non mielinati (nodi di Ranvier). Nei tratti mielinati la carica ionica si distribuisce tra i vari strati della cellula di Schwann, indebolendo il rendimento della conduzione elettrotonica e non permettendo la rigenerazione del potenziale d'azione. Nei nodi di Ranvier, invece, la membrana è simile a quella delle fibre non

mielinate e quindi la conduzione elettrotonica scatena la genesi del potenziale di azione che viene dunque rigenerato. Questo tipo di propagazione vede dunque l'alternanza di zone in cui non si ha potenziale d'azione e punti dove è possibile misurare il potenziale d'azione tipico, da questa discontinuità deriva il nome di conduzione o propagazione saltatoria. Dato che la generazione di questo potenziale è un meccanismo piuttosto lento, diradando le zone di rigenerazione, la velocità di propagazione dell'impulso nervoso aumenta.

Dal punto di vista della modellistica la fibra mielinata può essere vista come l'alternanza di tratti a stimolazione sottosoglia (tratti mielinati) e di tratti a stimolazione soprasoglia per fibra non mielinata (nodi di Ranvier). Tenendo conto che la mielina rende più efficiente elettricamente la fibra (abbassa la resistenza ed alza la capacità) si può effettuare un calcolo della costante λ che tiene conto della lunghezza massima di propagazione senza rigenerazione del potenziale. Utilizzando i dati di tabella II.2 si ricava che $\lambda=5$ mm, quindi ipotizzando che i nodi di Ranvier sono spazati al massimo di circa 2 mm, in base alla stimolazione sottosoglia si ricava che l'attenuazione introdotta è di circa $e^{-2/5}=0.67$, cioè un'attenuazione di circa 2/3. Il significato di tale attenuazione può essere compreso in base alla seguente considerazione. Sono sufficienti variazioni di tensione di 10-20 mV per produrre l'azione rigenerativa. Ipotizziamo, allora, che i nodi successivi ad un certo nodo (primo nodo) non siano in grado di produrre tale azione. Al primo nodo la tensione passa da -70 mV a 40 mV e si ha una variazione di 110 mV. Al secondo nodo (2 mm dopo il primo nodo) si è ridotta a 73 mV, sufficienti ancora per stimolare l'azione rigenerativa. Al terzo nodo (4 mm dopo il primo nodo) la variazione di tensione si è ridotta a 49 mV, quindi ancora sufficiente. Calcolando la variazione di tensione per i nodi successivi ci rendiamo conto che l'impulso si propagherebbe al massimo per un centimetro. Questa proprietà è utilizzata in anestesia locale: sostanze come la procaina, infatti, impediscono i cambiamenti di permeabilità nei nodi, bloccando l'impulso nervoso nel raggio di alcuni nodi, con distanze dell'ordine del centimetro.

LA TRASMISSIONE SINAPTICA

L'impulso nervoso raggiunge le terminazioni dendritiche o assoniche del neurone e si propaga al successivo neurone oppure ad un organo effetore attraverso le sinapsi. Andiamo dunque ad esaminare in dettaglio la fisiologia della trasmissione sinaptica interneuronica e neuromuscolare.

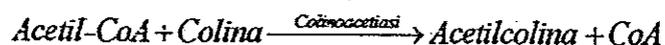
La giunzione neuromuscolare

Le ampie dimensioni della fibra muscolare rispetto alla sottile terminazione nervosa renderebbero impossibile la depolarizzazione diretta del sarcolemma. Ciò è dimostrabile svolgendo il calcolo della corrente necessaria alla fibra muscolare e di quella supportata dalla terminazione nervosa. La fibra muscolare (150 μm di

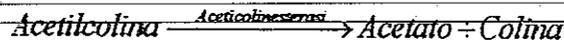
diametro) ha un'impedenza d'ingresso dell'ordine di $50\text{ K}\Omega$, ed è rivestita da una membrana eccitabile con un calo di tensione trans-membrana di circa 40 mV . Ne segue che per essere stimolata ha bisogno di un impulso di corrente pari a circa $0.8\ \mu\text{A}$. Assumiamo poi che la superficie di interazione tra la terminazione nervosa e la fibra muscolare all'interno di una doccia primaria sia cilindrica. Quindi, considerando una lunghezza di circa 1 mm ed un raggio di circa $0.5\ \mu\text{m}$, la superficie esposta è complessivamente $\pi \cdot r \cdot l = 2.3 \cdot 10^{-5}\text{ cm}^2$. La terminazione nervosa supporta durante l'impulso una densità di corrente di circa 1 mAcm^{-2} , ne segue che la corrente complessiva risulta circa $2.3 \cdot 10^{-8}\text{ A}$. Supponendo per assurdo che questa corrente possa arrivare tutta nella fibra muscolare non sarebbe certo in grado di eccitarla: due ordini di grandezza sono un divario piuttosto grande, dato che la variazione di tensione trans-membrana risulterebbe solo di 1.15 mV . In realtà la situazione è ulteriormente aggravata dall'impedenza dell'intervallo extracellulare tra la membrana basale e il sarcolemma, considerando anche questo fattore la corrente scende a livelli dell'ordine di 10 pA .

Queste considerazioni di carattere elettrico ci portano alla conclusione che la giunzione neuromuscolare è un amplificatore di corrente. In particolare possiamo dire che è un amplificatore di tipo chimico; questa affermazione è avvalorata dal ritardo con cui l'impulso nervoso attraversa la sinapsi stessa. Infatti, se si misurano le variazioni di potenziale con microelettrodi, si registrano due impulsi di corrente separati (quello nella terminazione assonica e quello nella regione post-sinaptica) di circa $0.3\text{--}0.5\text{ ms}$ (questo ritardo è assente nelle giunzioni elettrotoniche ed è imputabile alla diffusione dei trasmettitori chimici nel gap sinaptico). Si è visto inoltre che la membrana muscolare non è elettricamente eccitabile e non è in grado di generare potenziale di azione, anche se dopo l'eccitazione chimica la depolarizzazione si propaga alle regioni contigue della fibra muscolare per conduzione elettrica.

Nel 1936, sir Henry Dale scoprì che l'eccitazione di un nervo motore provoca la liberazione di acetilcolina, la quale ha un'azione stimolante molto potente sul muscolo scheletrico. Negli anni successivi fu appurato che l'acetilcolina è contenuta nelle vescicole sinaptiche e che queste sono presenti nel bottone sinaptico insieme all'enzima che la sintetizza (colinoacetilasi) a partire da acetile (combinato insieme all'enzima CoA) e colina (assunta dal liquido extracellulare) secondo la seguente reazione:



Al tempo stesso si scoprì che nella zona post-sinaptica non viene prodotta acetilcolina, anzi, si trovò che presso la membrana muscolare è presente un enzima capace di degradarla (acetilcolinesterasi) nei suoi costituenti: acetato e colina, secondo la seguente reazione:



Fu chiaro dunque che in qualche modo l'acetilcolina passava dal bottone terminale alla fibra muscolare permettendo la sua stimolazione. Prima di passare ai dettagli del funzionamento possiamo aggiungere che la grande capacità da parte della membrana assonica di accumulare colina nelle vicinanze del bottone sinaptico (anche contro elevati gradienti elettrochimici) garantisce al sistema un funzionamento eccellente ed una buona autonomia.

Il meccanismo pre-sinaptico

Al sopraggiungere della depolarizzazione assonica nel bottone sinaptico, le vescicole si avvicinano alle zone attive della membrana in corrispondenza delle docce secondarie (figura II.26a). La membrana che le riveste si fonde con quella del bottone sinaptico e per esocitosi le vescicole fuoriescono nella fessura sinaptica (gap) (figura II.26b). La possibilità di riformarsi della membrana vescicolare all'esterno è legata al fatto che essa è costituita da mucopolisaccaridi, gli stessi che si trovano nel gap sinaptico.

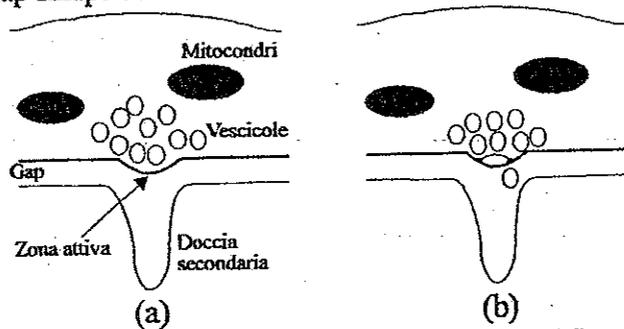


FIGURA II.26 Schematizzazione delle fasi del rilascio delle vescicole da parte della zona pre-sinaptica. (a) Fase di avvicinamento delle vescicole. (b) Rilascio delle vescicole per esocitosi.

Un ruolo importante nel meccanismo è assunto dagli ioni calcio (Ca^{++}), poiché il rilascio delle vescicole è legato strettamente all'assunzione di ioni calcio. In particolare sembra che essi siano responsabili dell'avvicinamento e fusione delle vescicole con la membrana (si legano alle vescicole e ad appositi siti della membrana nelle vicinanze delle zone attive). L'unica apparente contraddizione con questa richiesta di ioni calcio è legata al piccolo rilascio spontaneo che si ha anche se nel fluido assonico non c'è presenza di ioni calcio. Nel 1971 il problema fu chiarito: la piccola quantità di ioni che entra all'interno del bottone terminale viene sequestrata dai mitocondri, quindi la concentrazione interna di ioni calcio non è nulla, anche se non vi sono ioni liberi nel fluido assonico.

Esperimenti condotti su rana e calamaro gigante (Katz e Miledi 1967-71) hanno messo in luce il legame tra il rilascio di neurotrasmettitori e la corrente di ioni calcio; infatti si è visto che non c'è rilascio se il potenziale di membrana è tenuto al livello di equilibrio per gli ioni calcio, mentre sono rilasciati immediatamente se esso è portato ad un valore più negativo. Gli studi hanno permesso di scoprire, inoltre, che la variazione di permeabilità della membrana (e quindi della corrente degli ioni calcio) in funzione della variazione del potenziale pre-sinaptico è schematizzabile con una sigmoide, come si può vedere in figura II.27. Molti modelli sono stati proposti per descrivere questo legame, il più recente è quello probabilistico di Llinás (1977), ma non ci sono ancora sufficienti elementi per decidere inequivocabilmente in favore di uno o di un altro modello.

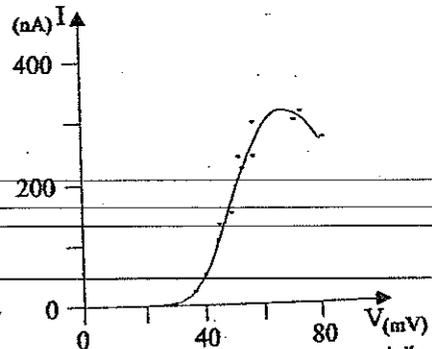


FIGURA II.27 Andamento della corrente di ioni calcio nella zona pre-sinaptica in funzione della variazione di potenziale di membrana.

Il MECCANISMO post-sinaptico

Le vescicole, attraversato il gap sinaptico, penetrano all'interno della membrana muscolare, si rompono e liberano l'acetilcolina. Si pensa che essa si leghi ad un recettore che apre il canale interno facendo aumentare la permeabilità agli ioni sodio e potassio. Di conseguenza aumenta la conduttanza agli stessi ioni e si determina la depolarizzazione che fa contrarre la fibra. L'acetilcolina viene infine degradata dalla acetilcolinesterasi.

Esperimenti condotti negli anni sessanta hanno dimostrato che l'acetilcolina agisce a livello post-sinaptico come attivatore. Infatti denervando la fibra muscolare e fornendo acetilcolina con una micropipetta si ottiene ugualmente la contrazione. Dagli stessi esperimenti emerse il fatto che l'acetilcolina agisce direttamente al livello della permeabilità agli ioni sodio e potassio. Si è trovato inoltre che il legame tra la tensione e la corrente ionica post-sinaptica è lineare (esperimenti condotti su rana e calamaro gigante) come si vede in figura II.28.

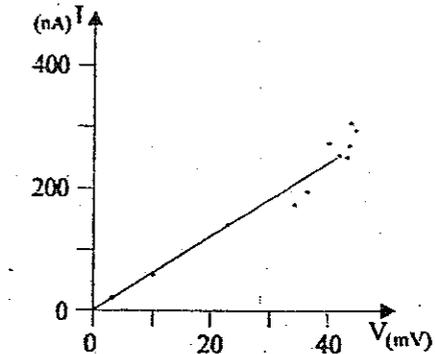


FIGURA II.28 Andamento della corrente ionica in funzione della potenziale post-sinaptico.

Le correnti ioniche degli ioni sodio e potassio producono una depolarizzazione temporanea nella regione della placca muscolare che prende il nome di *potenziale di placca Epp* (end plate potential). Il potenziale di placca è temporaneo a causa della degradazione dell'acetilcolina ad opera dell'acetilcolinesterasi ed un suo andamento è schematizzato in figura II.29. Si può vedere che la fase attiva dura circa 5 ms e la maggior parte dell'attività è confinata nei primi 2-3 ms, dopodiché la variazione di potenziale ha una diminuzione passiva governata dalla costante di attenuazione della fibra muscolare. Durante l'azione dell'acetilcolina la permeabilità degli ioni sodio ad entrare è resa uguale a quella degli ioni potassio ad uscire, quindi il valore massimo dell'Epp non può spostarsi oltre il livello di potenziale nullo, ed il potenziale di membrana tende alla media dei potenziali di riposo dei due ioni

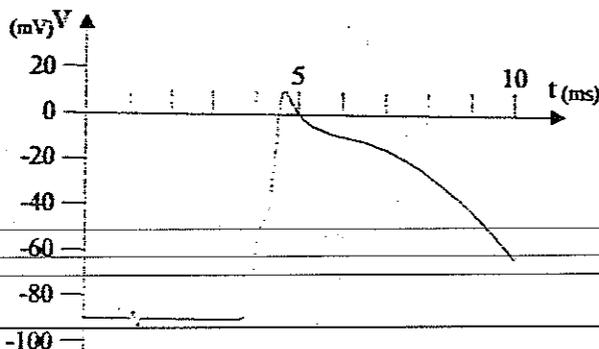


FIGURA II.29 Andamento del potenziale di placca Epp (End Plate Potential) in funzione del tempo.

$(E_{Na} + E_K)/2 = -15$ mV. Da alcuni esperimenti è emerso inoltre che tenendo il potenziale post-sinaptico bloccato a valori prestabiliti si è visto un modificarsi della depolarizzazione. In particolare per valori crescenti da -70 mV fino 40 mV si è visto che la depolarizzazione diminuisce, si annulla per un valore di -15 mV e inverte il segno per valori superiori, da questo il valore di -15 mV viene detto *potenziale d'inversione*.

Le sinapsi interneuroniche

Le sinapsi interneuroniche possono essere di tipo chimico o di tipo elettrotonico. Le sinapsi chimiche sono molto simili alle giunzioni neuromuscolari e sono le più conosciute e le più studiate. Le sinapsi elettrotoniche sono state trovate in moltissime specie viventi e in una molteplicità di forme e meccanismi, tuttavia non è ancora chiaro il loro ruolo all'interno del sistema nervoso.

SINAPSI ELETTROTONICHE

Le sinapsi elettrotoniche (o gap-junction) non presentano nessun ritardo nella trasmissione e per questo sembrano essere importanti in riflessi in cui sia essenziale una trasmissione rapida. Inoltre esse consentono trasmissioni bidirezionali, e per questo aspetto si differenziano dalle sinapsi chimiche, che sono obbligatoriamente unidirezionali; tuttavia esistono particolari tipi di sinapsi elettrotoniche che conducono più facilmente in una direzione e per questo vengono dette *rettificate*. Questo tipo di sinapsi, essendo legato principalmente allo scambio ionico tra cellule, non è facilmente influenzato da agenti chimici.

Questo tipo di sinapsi è caratterizzato da un *fattore di accoppiamento* definito dal rapporto tra l'ampiezza della risposta post-sinapica e l'ampiezza dell'impulso pre-sinaptico. Tale rapporto varia da sinapsi a sinapsi e non si conosce con certezza se sia regolato da meccanismi fisiologici o se sia una caratteristica del tipo di sinapsi.

La maggior parte degli studi fisiologici di queste sinapsi è stata condotta sui pesci Teleostei ed ha rivelato che esistono sinapsi elettriche di tipo eccitatorio e di tipo inibitorio e che la loro azione può essere combinata con quella di sinapsi chimiche in un complesso meccanismo di integrazione elettrochimica.

Le sinapsi chimiche

La presenza dei meccanismi di produzione e ricezione dei neurotrasmettitori rende la sinapsi chimica obbligatoriamente unidirezionale; questa caratteristica risulta importante nella costruzione di sistemi afferenti ed efferenti interconnessi a più livelli come accade in molti organismi. Le sinapsi chimiche sono caratterizzate da un ritardo di circa 0.5 ms che sembra essere legato essenzialmente al tempo necessario per la liberazione del neurotrasmettitore. Questo ritardo diventa molto significativo nelle vie plurisinaptiche, in quanto esso risulta essere una frazione considerevole del tempo totale di propagazione dell'impulso nervoso.

Il trasmettitore chimico liberato dal neurone pre-sinaptico modifica la conduttanza della membrana post-sinaptica per uno o più ioni effettuando le veci della conduzione elettrotonica tra le singole celle elementari neuroniche. In generale i neurotrasmettitori vanno ad aumentare la conduttanza ionica della membrana, tuttavia esistono casi particolari in cui si è registrata un'azione opposta.

Le sinapsi chimiche sono caratterizzate da un'elevata sensibilità chimica e da una bassa sensibilità elettrica in corrispondenza della regione post-sinaptica. Ciò sembra essere la spiegazione del fatto che non si registrano potenziali di azione nelle zone post-sinaptiche. La variazione del potenziale transmembrana viene trasportata dalla sinapsi al corpo cellulare per mezzo di una conduzione elettrotonica sotto-soglia. Le varie risposte post-sinaptiche, raggiunto il corpo del neurone, vengono

integrate e se la loro somma risulta essere superiore alla soglia di eccitabilità si genera il potenziale d'azione, il quale viene propagato lungo l'assone o gli assoni del neurone.

RELAZIONI INGRESSO-USCITA

La giunzione neuromuscolare costituisce un tipo di sinapsi particolarmente semplice, in cui ad un potenziale d'azione nella cellula pre-sinaptica corrisponde un potenziale d'azione nella cellula post-sinaptica. In altri tipi di sinapsi si possono avere più ingressi e/o più uscite. Si parla dunque di sinapsi *uno- α -uno*, *uno- α -molti*, *molti- α -molti*.

Le *sinapsi uno- α -uno* sono caratterizzate da un ingresso e un'uscita con risposte simili (un tipico esempio è la giunzione neuromuscolare).

Le *sinapsi uno- α -molti* sono rare e sono caratterizzate dalla divergenza del potenziale, cioè un singolo potenziale evoca più potenziali (un esempio tipico è dato dalle cellule di Renshaw di rana).

Le *sinapsi molti- α -uno* sono molto comuni e sono caratterizzate dall'integrazione di più potenziali di azione (convergenza) che può dare origine ad un unico potenziale d'azione. In genere in questo tipo di sinapsi possono convergere più di 100 assoni pre-sinaptici, quindi per generare un potenziale d'azione occorre l'effetto concomitante di più ingressi. Accanto alla convergenza delle informazioni, si affiancano i meccanismi per i quali alcune terminazioni pre-sinaptiche effettuano un'azione eccitatoria depolarizzando le relative terminazioni post-sinaptiche, mentre altre effettuano un'azione inibitoria iperpolarizzando. In questo tipo di sinapsi ogni terminazione post-sinaptica partecipa al valore finale del potenziale con 1-2 mV, per cui occorrono diversi ingressi per dar vita ad un potenziale d'azione. La somma degli impulsi può avvenire sia per *integrazione spaziale*, cioè due impulsi che arrivano contemporaneamente danno luogo ad una risposta doppia; sia per *integrazione temporale*, cioè due impulsi in rapida successione danno luogo a due potenziali d'azione in rapida successione in modo che la risposta sia doppia dal punto di vista temporale.

SOLUZIONE NUMERICA DEL VOLTAGE-CLAMP

La soluzione numerica dell'equazione (II.14) può essere ottenuta con il seguente programma scritto in Turbo Pascal 5.5. Esso è strutturato come procedura (*procedure Huxley*) da inserire in un programma più complesso che permetta anche la gestione grafica e l'inserimento di valori di temperatura. All'interno di questa procedura vengono considerate due procedure di livello inferiore che gestiscono la visualizzazione e la stampa di dati (*function ESPO* e *procedure USCITA*). Una terza procedura di livello inferiore effettua il calcolo delle funzioni di Hodgkin-Huxley (f, w, h_A, h_D, k_A, k_D), mentre le conduttanze (g_K, g_{Na}, g_L), le correnti (j_K, j_{Na}, j_I, j_m) ed il numero di canali attivi (n_K, n_{NaA}, n_{NaD}) sono calcolati direttamente all'interno nel programma principale; le righe in cui vengono effettuati questi calcoli sono evidenziate dal simbolo "{*}" e da un relativo commento. La procedura

Huxley riceve due parametri: *Temp* (di tipo reale) che tiene conto del valore di temperatura *T* e *Stampa* (di tipo booleano) che attiva (true) o meno la stampa su carta. Inoltre usa alcune istruzioni presenti all'interno delle librerie *CRT*, *DOS* e *PRINTER* in dotazione con pacchetto software TURBO PASCAL 5.5.

La soluzione numerica è considerando la seguente approssimazione:

$$A(t + \Delta t) = A(t) + \frac{\partial A}{\partial t} \Delta t$$

Gli incrementi differenziali di n_K , n_{NaA} , n_{NaD} sono calcolati come nel testo, cioè basandosi sui valori delle funzioni di Hodgkin-Huxley calcolate per il valore istantaneo di potenziale; l'incremento del potenziale (dV) è ottenuto invece dalla seguente relazione:

$$dV = -\frac{J_m + J_s}{C_m}$$

dove il termine j_s rappresenta lo stimolo di corrente con cui viene eccitata ipoteticamente la fibra. Questo stimolo ha un valore di 10^{-4} A/cm² e viene applicato per un tempo compreso tra 0.5 e 0.6 ms. Inoltre viene usato un incremento di tempo di 1 μ s, mentre per la presentazione dei dati numerici viene usato un tempo di 0.1 ms.

```

Procedure HUXLEY(Temp: real; stampa: boolean);
{***** DOCUMENTAZIONE *****}
{Questa procedura fornisce i valori numerici in regime di voltage-clamp per il modello di
Hodgkin-Huxley per la temperatura Temp su video o carta (stampa=false/true).
La versione della procedura è stata scritta per TURBO PASCAL 5.5.}
{***** LIBRERIE DI SUPPORTO *****}
uses
  CRT, DOS, PRINTER;
{***** ELENCO COSTANTI *****}
const
  Deltat = 1E-6;    {Incremento di integrazione}
  Tvisio = 1E-4;    {Intervallo di uscita tabulazione}
  Em = -65E-3;     {Potenziale di riposo}
  Cm = 1E-6;       {Capacità di membrana}
  Tmax = 5E-3;     {Tempo complessivo di osservazione}
  ENa = 50E-3;     {Potenziale nerstiano del Sodio}
  EK = -77E-3;     {Potenziale nerstiano del Potassio}
  EL = -54.4E-3;   {Potenziale di riferimento di leakage}
  Tdef = 6.3;      {Temperatura di default}
{***** ELENCO VARIABILI GLOBALI *****}
var
  NK, NNaA, NNAD : real;    {Numero canali attivi}
  F, W, HA, KA, HD, KD : real; {Funzioni di Hodgkin-Huxley}
  dNK, dNNaA, dNNAD, dV : real; {Derivate per l'integrazione}
  GK, GNa, JK, JNa, JL, Jm, Js, V : real; {Conduttanze, correnti e tensione}
  t, ts : real;            {Tempi}
  key : char;              {Variabili di controllo}
  NumRiga : integer;
{***** PROCEDURE DI OUTPUT *****}
function ESPO(elem: real);
{Aggiusta il formato dell'esponente per la visione o la stampa}
var

```

```

numero stato : integer; {Variabili di supporto}
vedo viso    : string;  {Stringhe di supporto}

begin
str(clem:11,vedo);
viso:=copy(vedo,1,pos('E',vedo)+1);
vedo:=copy(vedo,pos('E',vedo)+2,4);
val(vedo,numero_stato);
str(numero,vedo);
espo:=viso+vedo+copy(' ',1,4-length(vedo));
end;

Procedure USCITA(caso, inizio: boolean);

var
riga: string;

begin
riga:=ESPO(Jm)+ESPO(GNa)+ESPO(JNa)+ESPO(GK)+ESPO(JK)+ESPO(JL);
if caso=false then
begin
if inizio=true then
begin
writeln;
writeln('Premi un tasto per continuare');
key:=readkey;
clrscr;
writeln('tempo V   Jm   GNa   JNa   GK   JK   JL');
end;
write(t*1000:4:1, 1000*V:7:1, ' '); writeln(riga);
end
else
begin
if inizio=true then
begin
writeln(Lst,'Valori numerici per il modello di Hodgkin-Huxley in regime di Voltage-Clamp');
writeln(Lst,' '); writeln(Lst,' ');
writeln('tempo V   Jm   GNa   JNa   GK   JK   JL');
end;
write(Lst, t*1000:4:1, 1000*V:7:1, ' '); writeln(Lst, riga); writeln(Lst,' ');
end;
end;

{***** PROCEDURA DI CALCOLO *****)

procedure FUNZIONI(Temp);
{Calcola le funzioni di Hodgkin-Huxley. (Volt e secondi)}

var
q: real;

begin
q:=(Temp-Tdef)*ln(3)/10; q:=exp(q);
F:=q*10*(-1000*(V-Em)+10)/(exp((-1000*(V-Em)+10)/10)-1);
HA:=q*100*(-1000*(V-Em)+25)/(exp((-1000*(V-Em)+25)/10)-1);
HD:=q*70*exp(-1000*(V-Em)/20);
W:=q*125*exp(-1000*(V-Em)/80);
KA:=q*4000*exp(-1000*(V-Em)/18);
KD:=q*1000/(exp((-1000*(V-Em)+30)/10)+1);
end;

{***** PROCEDURA HUXLEY *****)

```

```

begin
t:=0; V:=Em; ts:=0; NumRiga:=0;
if stampa=true then
begin
writeln;
writeln('Premere un tasto per iniziare la stampa');
key:=readkey;
ClrScr;
writeln;
writeln('Stampa valori...');
end;

FUNZIONI(Tmp);           {Calcola i valori iniziali}
NK:=F/(F+W);            {*}
NNaA:=HA/(HA+KA);       {*}
NNaD:=HD/(HD+KD);       {*}

while t<Tmax do
begin
GK :=36E-3*N*N*N*N;     {Calcola le correnti}
GNa:=120E-3*M*M*M*H;    {*}
JK :=GK*(V-EK);         {*}
JNa:=GNa*(V-ENa);       {*}
JL :=3E-4*(V-EL);       {*}
Jm :=JK+JNa+JL;         {*}

if t>=ts then           {Scrivi i dati ad intervalli Tvisio}
begin
if NumRiga=0 then
USCITA(stampa, true)
else
USCITA(stampa, false)
end;
ts:=ts+Tvisio; NumRiga:=NumRiga+1;
if NumRiga=20 then NumRiga:=0;
end;

if (t>=5E-4) and (t<6E-4) then {Applica lo stimolo nervoso}
Js:=1E-4
else
Js:=0;                  {Termina l'applicazione dell'impulso}

dV:=(-Jm+Js)/Cm; V:=V+dV*Deltat; {Calcola gli incrementi delle variabili}
FUNZIONI(Tmp);         {*}
dNK:=F*(1-NK)-W*NK;    {*}
NK:=NK+dNK*Deltat;     {*}
dNNaA:=HA*(1-NNaA)-KA*NNaA;  {*}
NNaA:=NNaA+dNNaA*Deltat;  {*}
dNNaD:=HD*(1-NNaD)-KD*NNaD;  {*}
NNaD:=NNaD+dNNaD*Deltat;  {*}
t :=t+Deltat;

end;
end;
if stampa=false then
begin
writeln;
writeln('Premi un tasto per uscire');
key:=readkey;
end;
end;

```

```
* corpo principale programma su voltage clamp
cd c:\univer;
```

```
%costanti
```

```
T_rif=6.3;      %temperatura di riferimento
Em=-65e-3;     %potenziale transmembrana di riposo
Cm=1e-6;       %capacità membrana
E_Na= 50e-3;   %pot Nerst sodio
E_K= -77e-3;   %pot Nerst potassio
E_L= -54.4e-3; %pot Nerst leakage
G_L=3e-4;      %condutt di leakage
delta_t=1e-6;  %step di integrazione
t_fin=5e-3;    %istante finale di osservazione
```

```
Js=1e-4;       %intensità dello stimolo di corrente usato
t_start= 5e-4; %istanti di inizio e fine dello stimolo
t_stop= 6e-4;
```

```
%corpo del programma
```

```
v=Em;          %inizializzazioni (ddp e temperatura)
T=6.3;
```

```
funzioni;      %invoco script che calcola funzioni di H-Huxley
```

```
n_K = f/(f+w);      %inizializzo frazioni di canali aperti
n_Na_a = h_a/(h_a+k_a);
n_Na_d = h_d/(h_d+k_d);
t=0;
i=1;
```

```
%ciclo di valutazione
```

```
while t<t_fin
```

```
  G_K= 36e-3*(n_K)^4;      % conduttanza in S/cm^2
  G_Na= 120e-3*((n_Na_a)^3)*n_Na_d;
  J_K= G_K*(v-E_K);
  J_Na= G_Na*(v-E_Na);
  J_L= G_L*(v-E_L);
  Jm= J_K + J_Na + J_L;
```

```
  jK(i)= J_K;      %in questi vettori memorizzo i
  jNa(i)= J_Na;    %valori calcolati dal programma
  jL(i)= J_L;
  jm(i)=Jm;
  V(i)= v;
  gK(i)= G_K;
  gNa(i)= G_Na;
```

```
  if and((t>=t_start), (t<=t_stop))
    J_tot=-Jm+Js;
```

```
  else
    J_tot=-Jm;
  end
```

```
  delta_v=(J_tot/Cm)*delta_t;
```

```
v=v+delta_v;
```

```
funzioni;
```

```
delta_n_K=(f*(1-n_K)-w*n_K)*delta_t;
```

```
n_K = n_K + delta_n_K;
```

```
delta_n_Na_a=(h_a*(1-n_Na_a)-k_a*n_Na_a)*delta_t;
```

```
n_Na_a = n_Na_a + delta_n_Na_a;
```

```
delta_n_Na_d=(h_d*(1-n_Na_d)-k_d*n_Na_d)*delta_t;
```

```
n_Na_d = n_Na_d + delta_n_Na_d;
```

```
t=t+delta_t;
```

```
i=i+1;
```

```
end
```

```
grafici; %script per visualizzare grafici
```

calcolo delle funzioni di Hodgkin Huxley
usate per stimare andamento della conduttanza di sodio e potassio

%costanti

%NB POICHE FUNZIONI SONO DATE PER TENSIONI
%ESPRESSE IN mV È NECESSARIO MOLTIPLICARE LE VARIABILI
%DI TENSIONE PER 1000 (NEL PROGRAMMA PRINCIPALE INFATTI
%USIAMO PER LE TENSIONI IL VOLT E PER I TEMPI I SECONDI)

%funzioni per il potassio:

%funzione di attivazione

$f=10*3^{((T-T_{rif})/10).*(10+(-v+Em)*1000)./(exp((10+(-v+Em)*1000)/10)-1)};$

%funzione di disattivazione

$w=125*3^{((T-T_{rif})/10).*exp(1000*(-v+Em)/80)};$

%funzioni per il sodio:

%tratto in salita

%funzione di attivazione

$h_a=100*3^{((T-T_{rif})/10).*(25+1000*(-v+Em))./(exp((25+1000*(-v+Em))/10)-1)};$

%funzione di disattivazione

$k_a=4000*3^{((T-T_{rif})/10).*exp(1000*(-v+Em)/18)};$

%tratto in discesa

%funzione di attivazione

$h_d=70*3^{((T-T_{rif})/10).*exp(1000*(-v+Em)/20)};$

%funzione di disattivazione

$k_d=1000*3^{((T-T_{rif})/10)./(exp((30+1000*(-v+Em))/10)+1)};$

```
%script per eseguire stampa video dei vari grafici
```

```
te=[0:delta_t:t_fin-delta_t]; %vettore dei tempi  
%nota che devo sottrarre delta_t  
%per avere numero di punti pari a  
%t_fin/delta_t
```

```
plot(te,jK); %stampa densità di corrente  
hold on;  
plot(te,jNa,'--');  
plot(te,jm,'-.');  
hold off
```

```
figure %stampa ddp  
plot(te,V);
```

```
figure %stampa conduttanze  
plot(te,gK);  
hold on;  
plot(te,gNa,'-.');  
hold off;
```

```
v=V; %stampa funzioni di H-Huxley  
funzioni; %v=V serve perche lo script "funzioni"  
figure %usa vome variabile v  
subplot(2,2,1);  
plot(v,h_a);  
subplot(2,2,2);  
plot(v,k_a);  
subplot(2,2,3);  
plot(v,h_d);  
subplot(2,2,4);  
plot(v,k_d);
```