

# MODELLO DI NEURONE ECCITABILE

## 1. Le cellule eccitabili e il potenziale d'azione

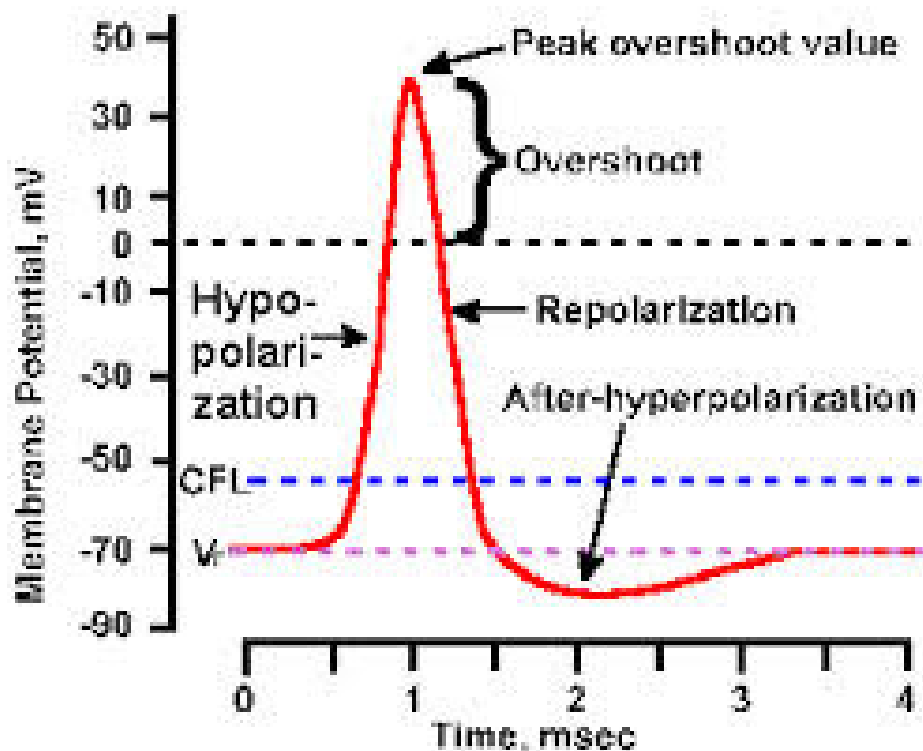
Una delle più importanti funzioni della cellula è quella di regolare la differenza di potenziale ai capi della membrana, attraverso il controllo dei canali ionici. Diverse cellule, come i neuroni e le cellule muscolari, utilizzano il potenziale di membrana come un segnale.

Per comprendere meglio l'elettrofisiologia cellulare, è opportuno distinguere le cellule in due grosse categorie. Alcune cellule mantengono stabile il proprio potenziale: se viene applicato uno stimolo di corrente per un breve intervallo temporale, il potenziale ritorna rapidamente all'equilibrio non appena la corrente viene rimossa. Tali cellule sono **non-eccitabili**, e si comportano grosso modo come un integratore con perdite, cioè come una capacità che si carica e scarica attraverso una resistenza. Altre cellule, invece, sono eccitabili: in seguito all'applicazione di un impulso di corrente di sufficiente ampiezza, il potenziale di membrana mostra una larga escursione, chiamata **potenziale d'azione**, prima di ritornare in condizione di equilibrio.

Il potenziale d'azione, di cui un esempio è mostrato nella figura seguente relativamente a un neurone, presenta alcune caratteristiche tipiche:

i) presenza di una **soglia**. Solo se il potenziale di membrana viene perturbato oltre un certo valore (per un tipico neurone pari a circa  $-55\text{mV}$ ) il potenziale d'azione si innesta. Finché il potenziale di membrana rimane al di sotto del valore di soglia, la cellula si comporta come se fosse non-eccitabile;

ii) il potenziale d'azione ha una **forma stereotipata**, cioè è del tipo “tutto o nulla”. Ciò significa



che, una volta innestato il fenomeno (quindi una volta superato il valore di soglia) la forma del

potenziale d'azione diviene indipendente dallo stimolo. Come si vede dalla figura, partendo da una situazione di riposo di circa  $-70\text{mV}$  (tipico per un neurone), una volta superato il valore di soglia (intorno ai  $-55\text{ mV}$ ) il potenziale d'azione sale rapidamente a valori positivi di potenziale, (mostrando un overshoot sui  $+30\text{-}40\text{ mV}$ ) e un rapido ritorno alla condizione di riposo attraverso un modesto undershoot (fino a  $-80\text{-}85\text{ mV}$ ). La durata complessiva del fenomeno è pari a circa  $1\text{-}2\text{ ms}$ .

iii) Una volta terminato il potenziale d'azione, esiste un intervallo temporale, detto **tempo refrattario assoluto**, durante il quale la cellula si comporta come se fosse non-eccitabile; non è più possibile generare il potenziale d'azione, nonostante l'applicazione di forti impulsi di corrente.

iv) Al termine del tempo refrattario assoluto la cellula riacquista la capacità di eccitarsi, ma esiste un ulteriore periodo di tempo, detto **tempo refrattario relativo**, durante il quale occorre stimolare la cellula con degli impulsi di corrente più forti per generare il potenziale d'azione. In altri termini, durante questo intervallo temporale è come se la soglia si fosse alzata, rendendo più difficile l'innesco del fenomeno.

## 2. La formulazione del modello di Hodgkin Huxley e l'esperimento a blocco di voltaggio

I meccanismi in grado di generare il potenziale d'azione sono stati descritti da Alan Hodgkin e Andrew Huxley (con la collaborazione ulteriore di Bernard Katz) in una serie di lavori apparsi nel 1952. Per comprendere la genesi del modello, partiamo dall'analogo elettrico della membrana in cui, per semplicità, tutti i contributi diversi dai canali ionici del sodio e del potassio (compresi i contributi del cloro e delle pompe ioniche) sono inglobati in una conduttanza equivalente  $g_{eq}$  e in un potenziale equivalente  $E_{eq}$ . Supponendo di stimolare il neurone con una corrente  $i$  (diretta dall'esterno all'interno) possiamo scrivere la seguente equazione:

$$C \frac{dv}{dt} + g_{Na}(V - E_{Na}) + g_K(V - E_K) + g_{eq}(V - E_{eq}) = i \quad (1)$$

dove  $V$  è il potenziale di membrana, e  $E_{Na}$  e  $E_K$  sono i potenziali di Nernst del sodio e del potassio. Si noti che, essendo le correnti del sodio e del potassio (anche durante lo sviluppo di un potenziale d'azione) estremamente piccole (ordine dell'influsso di  $\text{Na}^+$   $3.7\text{ pmoli/cm}^2$ ; ordine dell'efflusso di  $\text{K}^+$ :  $4.3\text{ pmoli/cm}^2$ ) le concentrazioni ioniche subiscono delle variazioni minime; è pertanto lecito considerare costanti i relativi potenziali di Nernst.

Se il neurone si comportasse secondo l'equazione (1), assumendo conduttanze e potenziali costanti, il funzionamento sarebbe equiparabile a quello di una capacità  $C$  che si carica e scarica attraverso delle conduttanze; la cellula sarebbe non-eccitabile. Hodgkin e Huxley hanno dapprima mostrato che, durante lo svolgimento di un potenziale d'azione, si verificano delle variazioni della conducibilità di alcuni canali ionici; in particolare un lavoro di Hodgkin e Katz del 1949 mise in evidenza il ruolo del sodio e del potassio. Questi autori compresero che una diversa variazione nel tempo della conduttanza del sodio e del potassio poteva spiegare, almeno qualitativamente, la forma del potenziale d'azione. Infatti, un aumento di  $g_{Na}$  è in grado di spostare il potenziale della membrana verso il valore (positivo) del potenziale del sodio, come avviene durante la prima parte del

potenziale d'azione. Viceversa, un aumento della conduttanza del potassio,  $g_K$ , è in grado di spostare il potenziale di membrana verso valori più negativi (come avviene durante il breve undershoot con cui termina il potenziale d'azione).

Cominciamo, allora, a domandarci quale legge potrebbero seguire i canali del sodio e del potassio durante un potenziale d'azione. Il punto di partenza consiste nell'immaginare che i canali posseggano dei gate, che permettano selettivamente il passaggio della specie ionica, e che questi gate si possano aprire o richiudere, in funzione del potenziale della membrana. Poiché l'apertura e la chiusura di tali gate è regolata dal potenziale di membrana, i relativi canali ionici sono denominati **voltage-dependent**. (tali sono appunto i canali del sodio e del potassio oggetto del modello di H. H.).

Consideriamo un gate relativo al canale del potassio. In un certo istante il gate può essere aperto (lasciando quindi passare lo ione potassio) oppure chiuso. Indichiamo con  $n$  la frazione dei gate aperti a un certo istante  $t$ . Dovrà essere  $0 \leq n \leq 1$ . Si noti che, per la legge dei grandi numeri, poiché vi è un numero elevatissimo di gate nella membrana di un neurone, tale frazione coincide con la probabilità che, a un dato istante, un singolo gate sia aperto o chiuso. Il punto di partenza consiste nell'immaginare che tale gate possa aprirsi o richiudersi con una cinetica del primo ordine, regolata dal potenziale  $V$ . Possiamo scrivere la seguente equazione differenziale:

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V)(1-n) - \beta_n(V)n \quad (2)$$

L'equazione precedente può essere interpretata nel modo seguente.  $\alpha_n(V)$  indica il rateo di apertura, ovvero la probabilità che un gate chiuso si riapra, mentre  $\beta_n(V)$  indica il rateo di chiusura, pari alla probabilità che un canale aperto si richiuda (essendo  $n$  la frazione dei canali aperti e  $1-n$  la frazione dei gate chiusi). Si noti che l'Eq. (2) deriva da simili equazioni della cinetica di sostanze chimiche.

Per comprendere cosa succede durante lo svolgersi di un potenziale d'azione, occorre esplicitare la dipendenza dei ratei di apertura e di chiusura da  $V$ , ovvero esprimere le funzioni  $\alpha_n(V)$  e  $\beta_n(V)$ . E' estremamente difficile, però trovare la soluzione dell'Eq. (2) in condizioni in cui il potenziale varia liberamente, trattandosi di un'equazione non lineare (infatti, se varia  $V$ , variano anche nel tempo i coefficienti  $\alpha$  e  $\beta$ , rendendo non lineare l'intera equazione). Viceversa, l'Eq. (2) ha una soluzione assai semplice nel caso lineare, se cioè si considerano i coefficienti  $\alpha$  e  $\beta$  costanti. Ciò è possibile, tuttavia, solo in condizioni in cui il potenziale di membrana è costante.

Supponiamo, allora, che all'istante  $t = 0$  il potenziale di membrana sia aumentato dal suo valore di riposo  $V_0$  (pari al valore del potenziale di equilibrio del neurone) a un nuovo valore, che denoteremo con  $V$  e quindi mantenuto costante. Supponiamo anche che, all'istante  $t = 0$ , la variabile  $n$  sia in equilibrio al valore  $n(0) = n_0$ . La soluzione dell'equazione lineare, assunto  $V$  costante, assume la nota espressione

$$n(t) = n_\infty(V) + (n_0 - n_\infty(V))\exp(-t/\tau_n(V)) \quad (3')$$

dove  $n_0$  rappresenta il valore della variabile  $n$  al tempo 0 (quindi lo stato iniziale), mentre  $n_\infty$  e  $\tau_n$  rappresentano, rispettivamente, il valore asintotico (di equilibrio) e la costante di tempo. Entrambi dipendono dal particolare valore di  $V$  (assunto costante). Risulta, inoltre

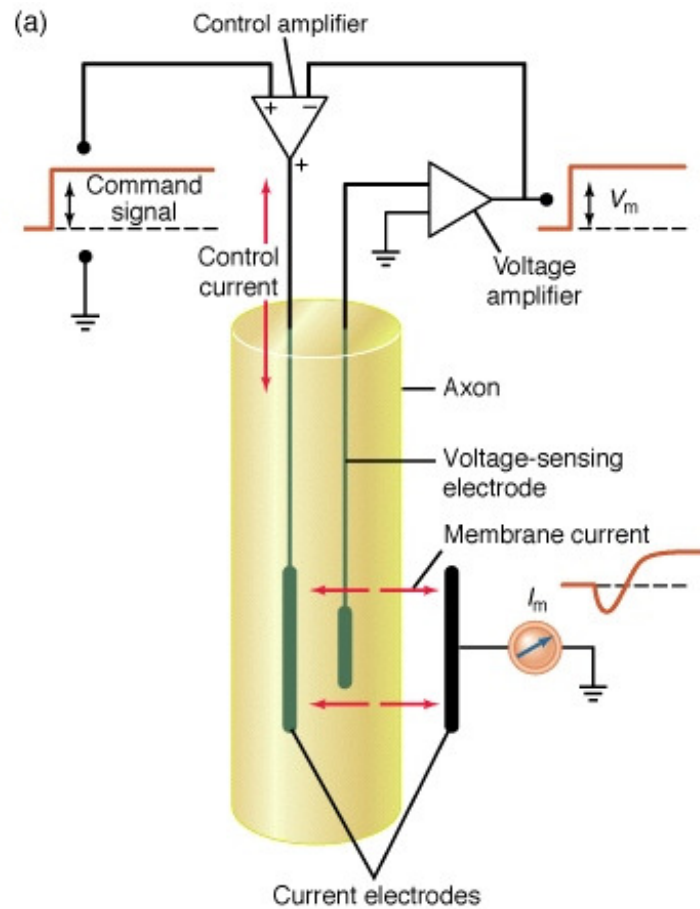
$$n_\infty(V) = \frac{\alpha_n(V)}{\alpha_n(V) + \beta_n(V)} \quad (3'')$$

$$\tau_n(V) = \frac{1}{\alpha_n(V) + \beta_n(V)} \quad (3''')$$

Si noti come, dalla conoscenza di  $n_\infty(V)$  e di  $\tau_n(V)$  sia poi possibile risalire a  $\alpha_n(V)$  e a  $\beta_n(V)$  risolvendo le (3'') e (3'''). Risulta infatti:

$$\alpha_n(V) = \frac{n_\infty(V)}{\tau_n(V)} \quad \beta_n(V) = \frac{1}{\tau_n(V)} - \alpha_n(V) = \frac{1 - n_\infty(V)}{\tau_n(V)} \quad (4)$$

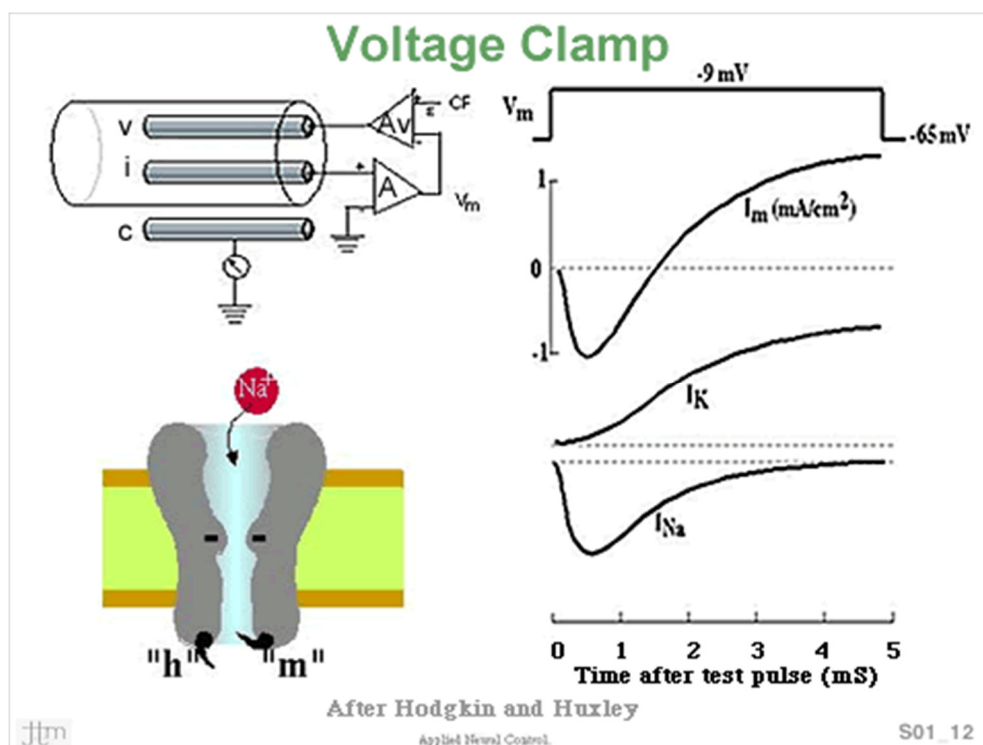
Hodgkin e Huxley hanno determinato sperimentalmente, per punti, le funzioni (3'') e (3''') per diversi valori di  $V$ , attraverso degli esperimenti condotti sull'assone gigante del calamaro, in condizioni di **blocco di voltaggio (voltage clamp)**. In particolare, durante tali esperimenti, H. H. hanno misurato le correnti di sodio e di potassio, da cui è possibile risalire alle conduttanze del sodio,  $g_{Na}$ , e del potassio,  $g_K$ . L'apparato usato è descritto nella figura seguente



Dispositivo usato nell'esperimento a blocco di voltaggio.

Un primo elettrodo, collegato a un voltmetro, permette la misura della differenza di potenziale fra interno ed esterno dell'assone (con l'uso di un elettrodo esterno di riferimento). Tale tensione (denotata  $V_m$  in figura per indicare il potenziale di membrana) viene quindi confrontata con un valore di riferimento ("command signal"): ogni volta che si verifica una differenza fra  $V_m$  e il valore desiderato, viene iniettata una corrente che permette di riportare  $V_m$  al valore desiderato. Attraverso questo sistema in retroazione, con guadagno molto alto, il potenziale di membrana viene tenuto praticamente costante al valore desiderato, anche al variare delle conduttanze del sodio e del potassio. Infine un amperometro permette la misura della corrente iniettata, che coincide con la corrente che attraversa le conduttanze del sodio e del potassio (infatti, essendo  $V_m$  costante, la corrente iniettata deve necessariamente uguagliare la corrente delle specie ioniche). Si noti anche l'uso di elettrodi assiali (cioè che decorrono lungo l'asse dell'assone) al fine di ridurre il più possibile gli effetti della propagazione del potenziale. In questo modo si è cercato di limitare la dipendenza delle grandezze dallo spazio, concentrandosi solo sulla variabile tempo: il potenziale non è più funzione della distanza lungo l'assone ma solo del tempo trascorso dall'applicazione dello stimolo.

La prima osservazione importante di H. H. fu che, in seguito all'applicazione di un gradino di tensione, la corrente presentava un andamento simile a quello evidenziato nella figura seguente, cioè la corrente mostrava dapprima una diminuzione a valori negativi, seguita da un aumento (si noti che, poiché la corrente fluiva dall'interno all'esterno durante l'esperimento, una corrente negativa va interpretata come una corrente ionica entrante, e viceversa). Con varie considerazioni (che qui non riportiamo) H. H. ipotizzarono che l'iniziale corrente entrante fosse quasi interamente attribuibile al sodio, mentre la corrente uscente nel periodo successivo fosse imputabile al potassio



Il passo successivo, allora, fu quello di cercare di discriminare fra le correnti del sodio e del potassio. A tale scopo, H. H. ripeterono l'esperimento in una situazione in cui il fluido

extracellulare era deprivato di sodio (al posto del sodio usarono una sostanza “choline” che variava di pochissimo il potenziale di equilibrio della membrana). Supponiamo di indicare con  $i_{Na}^{on}$  la corrente di sodio misurata in condizioni normali, in seguito all’applicazione di una certa tensione, e con  $i_{Na}^{off}$  la corrente misurata in condizioni di quasi totale assenza del sodio (anche rimpiazzato il sodio, una minima corrente era ancora presente). Un’ipotesi fondamentale del modello di H. H. era che le conduttanze del sodio e del potassio (e, quindi, le rispettive correnti) avessero un andamento temporale che dipendesse soltanto dalla tensione applicata. Ciò si riflette in due sotto-ipotesi: i) l’andamento temporale delle correnti del sodio nei due casi è identico, e quindi  $\frac{i_{Na}^{on}}{i_{Na}^{off}} = c$  (dove  $c$

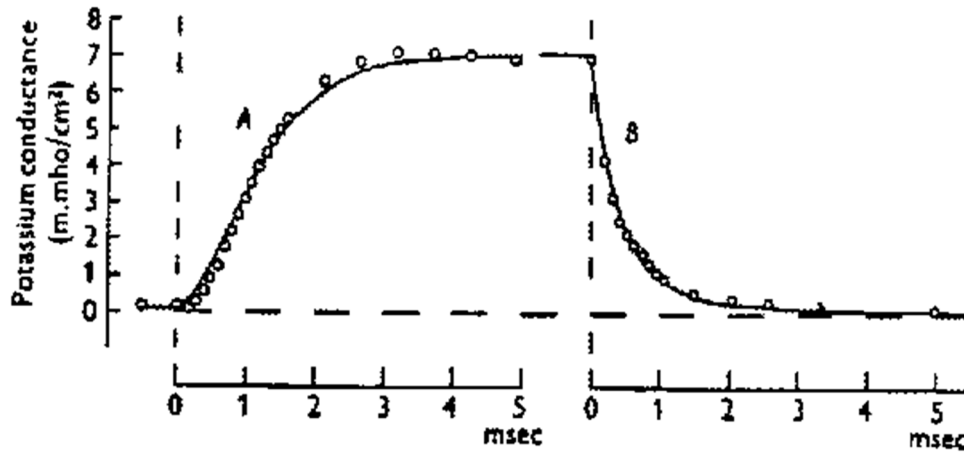
indica una costante); ii) la corrente  $i_K$  del potassio è la stessa nei due casi. Indicando con  $i_{Tot}^{on}$  e  $i_{Tot}^{off}$  la corrente ionica totale nei due casi (misurata con il voltage clamp) si ottiene allora:

$i_{Tot}^{on} = i_{Na}^{on} + i_k = c i_{Na}^{off} + i_k$  e inoltre  $i_{Tot}^{off} = i_{Na}^{off} + i_k$  da cui  $i_{Tot}^{on} - i_{Tot}^{off} = c i_{Na}^{off} - i_{Na}^{off}$  e  $i_{Na}^{off} = \frac{i_{Tot}^{on} - i_{Tot}^{off}}{c - 1}$ . Si

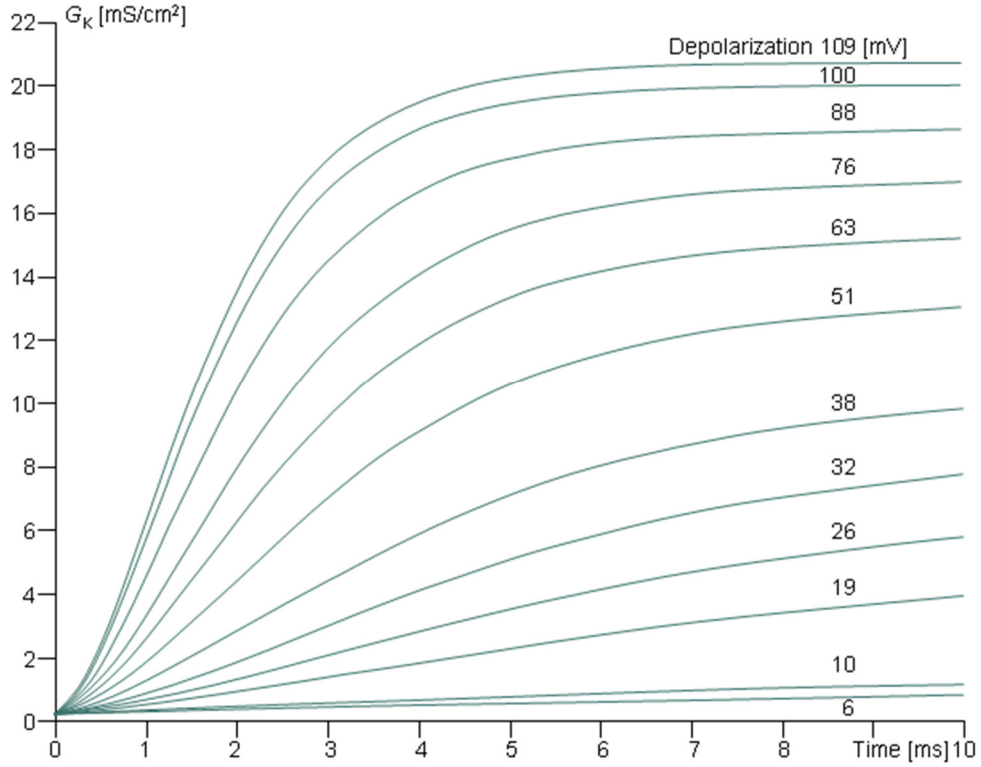
perviene quindi alle espressioni delle correnti del sodio e del potassio, nelle condizioni di normale comportamento, a partire dalle correnti totali misurate:

$$i_{Na}^{on} = \frac{c(i_{Tot}^{on} - i_{Tot}^{off})}{c - 1} \quad i_k = i_{Tot}^{on} - i_{Tot}^{off} = i_{Tot}^{on} - \frac{c(i_{Tot}^{on} - i_{Tot}^{off})}{c - 1} = \frac{c i_{Tot}^{off} - i_{Tot}^{on}}{c - 1} \quad (5)$$

Una volta ricavate, per un certo valore di tensione, le correnti del sodio e del potassio, è possibile ricavare le conduttanze, essendo nota la differenza di tensione ai capi della membrana. Cominciamo con il considerare le conduttanze del potassio. Dagli esperimenti a blocco di voltaggio risultavano gli andamenti riportati nelle figure sottostanti. La prima figura fa riferimento a un singolo aumento a gradino, con successivo ritorno al valore di base. La seconda figura mostra l’andamento nel tempo della conduttanza  $g_K$  in seguito a diversi gradini di tensione,



Andamento della conduttanza del potassio nel tempo, in risposta a un singolo aumento a gradino della tensione e a un successivo abbassamento della tensione al valore di riposo.



Andamento temporale della conduttanza del potassio, in risposta a gradini di tensione di ampiezza diversa.

Il passo successivo, che ci porta alla stima delle funzioni  $\alpha_n(V)$  e a  $\beta_n(V)$ , sarà quello di esprimere la conduttanza del potassio in funzione della variabile  $n$ . Indicando con  $g_{kmax}$  la massima conduttanza del potassio, ottenibile quando tutti i canali sono aperti, e ricordando che, nella membrana cellulare, i canali sono in parallelo fra loro, potremmo scrivere

$$g_k(t) = g_{kmax} p_k(t) \quad (6)$$

dove si è indicato con  $p_k$  la probabilità che, all'istante  $t$ , un canale del potassio sia aperto. Infatti, per  $p_k = 0$  tutti i canali sono chiusi e la conduttanza è nulla; per  $p_k = 1$  tutti i canali sono aperti e la conduttanza è al massimo; per valori intermedi di  $p_k$  la conduttanza dipende linearmente dalla frazione di canali aperti (la probabilità coincide con la frazione per la legge dei grandi numeri).

Ipotizziamo che esista un solo gate per ogni canale, e che possa essere aperto o chiuso. In tale caso avremmo  $p_k(t) = n(t)$ . Allora, sostituendo l'espressione (3') nella (6) risulta:

$$g_k(t) = g_{kmax} n(t) = g_{kmax} [n_\infty(V) + (n_0 - n_\infty(V)) \exp(-t/\tau_n(V))]$$

Fissato  $n_0$  e  $g_{kmax}$  (tali parametri devono essere gli stessi per tutti gli esperimenti), l'obiettivo è quello di ricavare  $n_\infty$  e  $\tau_n$  per il valore di  $V$  usato durante l'esperimento e quindi ricavare  $\alpha_n$  e  $\beta_n$  per il medesimo valore di  $V$ .

Tuttavia, H.H. hanno osservato che, con l'espressione precedente, il fitting risultava del tutto inadeguato. Per risolvere questa discrepanza, possiamo allora ipotizzare che esistano più gate in un unico canale del potassio, come illustrato nella figura successiva (che ipotizza la presenza di quattro gate). Se in un canale esistono  $v$  gate, e ciascuno ha la stessa probabilità  $n$  di essere aperto o chiuso a un certo istante, e i gate siano assimilabili a variabili aleatorie indipendenti di tipo binario (1 = aperto, 0 = chiuso) allora la probabilità di apertura di un canale sarà:

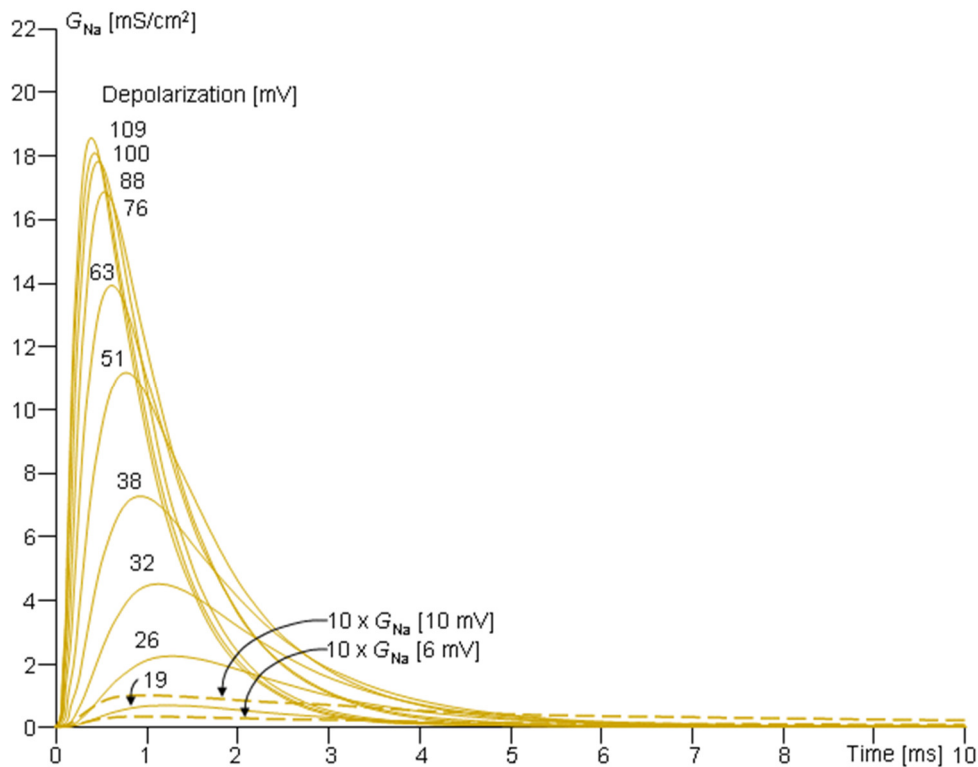
$$p_k(t) = n(t)^v \quad (7)$$

Hodgkin e Huxley hanno cercato di fittare l'eq. (7) ai dati sperimentali, usando il più basso valore di  $v$  che fornisse una buona stima. Tale valore è risultato essere quattro. Pertanto, l'equazione della conduttanza del potassio assume la forma (in cui si è usato  $v = 4$  e si è sostituita la (3') nella (7))

$$g_k(t) = g_{k \max} n(t)^4 = g_{k \max} [n_{\infty}(V) + (n_0 - n_{\infty}(V)) \exp(-t/\tau_n(V))]^4 \quad (8)$$

Il fitting dell'equazione (8) ha permesso di ricavare i valori di  $n_{\infty}(V)$  e di  $\tau_n(V)$  per diversi valori di  $V$ , da cui è stato poi possibile ricavare per punti le funzioni  $\alpha_n(V)$  e  $\beta_n(V)$ , utilizzando le equazioni (4).

Consideriamo adesso il caso della conduttanza del sodio. Dall'esperimento a blocco di voltaggio risultavano i valori di conduttanza riportati nella figura seguente:



Andamento temporale della conduttanza del sodio, in risposta a gradini di tensione di ampiezza diversa.



Come si può notare, l'andamento del sodio risulta più complicato di quello del potassio: ad un aumento iniziale assai rapido della conduttanza, che avviene nel giro di 1 ms, fa seguito una progressiva riduzione di conduttanza. Questo andamento è stato descritto accuratamente immaginando la presenza di due tipi diversi di gate: un gate responsabile della attivazione del canale del sodio, la cui probabilità di apertura sarà indicata di seguito con  $m$ , e un gate responsabile della inattivazione del canale del sodio, la cui probabilità di apertura è indicata nel seguito con  $h$ . Per entrambe queste variabili valgono equazioni simili alla (2). Quindi

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V)(1-m) + \beta_m(V)m \quad (9)$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V)(1-h) + \beta_h(V)h \quad (10)$$

Un ottimo fitting è stato ottenuto ipotizzando la presenza di tre gate di attivazione, e un solo gate di inattivazione, per ogni canale del sodio. L'equazione della conduttanza del sodio assume pertanto la forma:

$$\begin{aligned} g_{Na}(t) &= g_{Na \max} m(t)^3 h(t) = \\ &= g_{Na \max} [m_\infty(V) + (m_0 - m_\infty(V))\exp(-t/\tau_m(V))]^3 [h_\infty(V) + (h_0 - h_\infty(V))\exp(-t/\tau_h(V))] \end{aligned} \quad (11)$$

da cui è stato possibile ricavare per punti le funzioni  $\alpha_m(V)$  e  $\beta_m(V)$ ,  $\alpha_h(V)$  e  $\beta_h(V)$ .

Infine, le funzioni  $\alpha_s(V)$  e  $\beta_s(V)$  ricavate per punti (con  $s = n, m, h$ ) sono state interpolate con delle funzioni algebriche. Si perviene così al modello completo di Hodgkin Huxley, composto da quattro equazioni differenziali (nelle variabili di stato  $V, n, m, h$ ) e di sei equazioni algebriche. Le equazioni complete sono riportate nel seguito

### 3. Il modello completo e la genesi del potenziale d'azione

Le equazioni di H.H., sono riportate nel seguito

*Equazioni di stato:*

$$C \frac{dV}{dt} + g_{Na \max} m^3 h (V - E_{Na}) + g_{K \max} n^4 (V - E_K) + g_{eq} (V - E_{eq}) = i$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V)(1-m) - \beta_m(V)m$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V)(1-h) - \beta_h(V)h$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V)(1-n) - \beta_n(V)n$$

*Equazioni algebriche:*

$$\alpha_m(V) = 0.1 \frac{-40-V}{\exp\left(\frac{-40-V}{10}\right) - 1}$$

$$\beta_m(V) = 4 \exp\left(\frac{-65-V}{18}\right)$$

$$\alpha_h(V) = 0.07 \exp\left(\frac{-65-V}{20}\right)$$

$$\beta_h(V) = \frac{1}{\exp\left(\frac{-35-V}{10}\right) + 1}$$

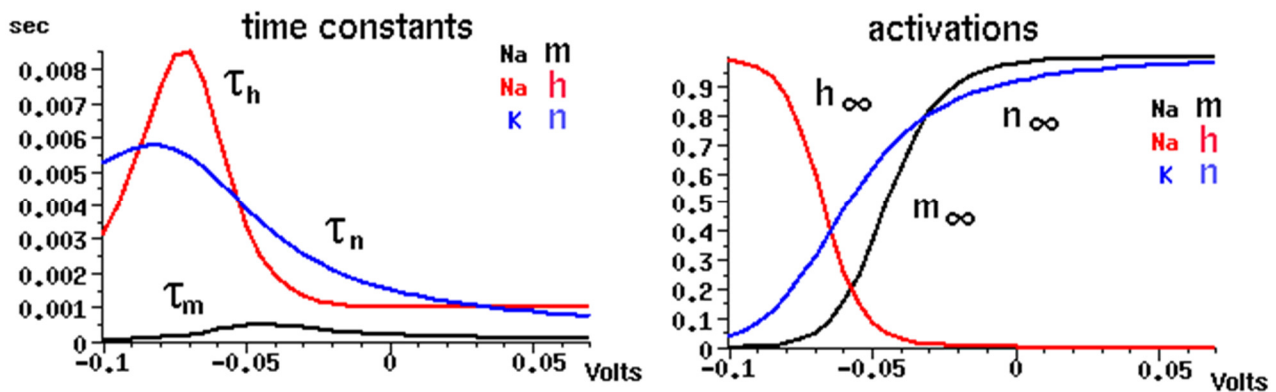
$$\alpha_n(V) = 0.01 \frac{-55-V}{\exp\left(\frac{-55-V}{10}\right) - 1}$$

$$\beta_n(V) = 0.125 \exp\left(\frac{-65-V}{80}\right)$$

con i seguenti valori dei parametri

$g_{Na_{max}} = 120$ ;  $g_{K_{max}} = 36$ ;  $g_{eq} = 0.3$ ;  $E_{Na} = 55$ ;  $E_K = -77$ ;  $E_{eq} = -54.4$ . (le tensioni sono in mV, le conduttanze sono in mS/cm<sup>2</sup>, i tempi in ms; le altre dimensioni sono congruenti).

Per capire in modo qualitativo il comportamento del modello quando la tensione  $V$  è libera (quindi non più nelle condizioni a blocco di voltaggio) è interessante osservare la figura seguente, che mostra i valori delle variabili  $n$ ,  $m$ ,  $h$  in condizioni stazionarie, e le rispettive costanti di tempo. Possiamo notare che in condizioni di forte ripolarizzazione della membrana ( $V < -70$  mV) i canali del sodio sono quasi completamente chiusi (infatti la variabile  $m$  è poco superiore allo zero) i canali del potassio sono anch'essi in gran parte chiusi (la variabile  $n$  è pari a circa 0.1-0.2) mentre la variabile  $h$  è a un valore alto (quindi, se non ci fosse  $m$ , consentirebbe l'apertura del canale). Notiamo inoltre che la variabile  $m$  presenta una costante di tempo molto inferiore rispetto alla costante di tempo delle altre due variabili (meno di 1 ms, rispetto a 6-8 ms).



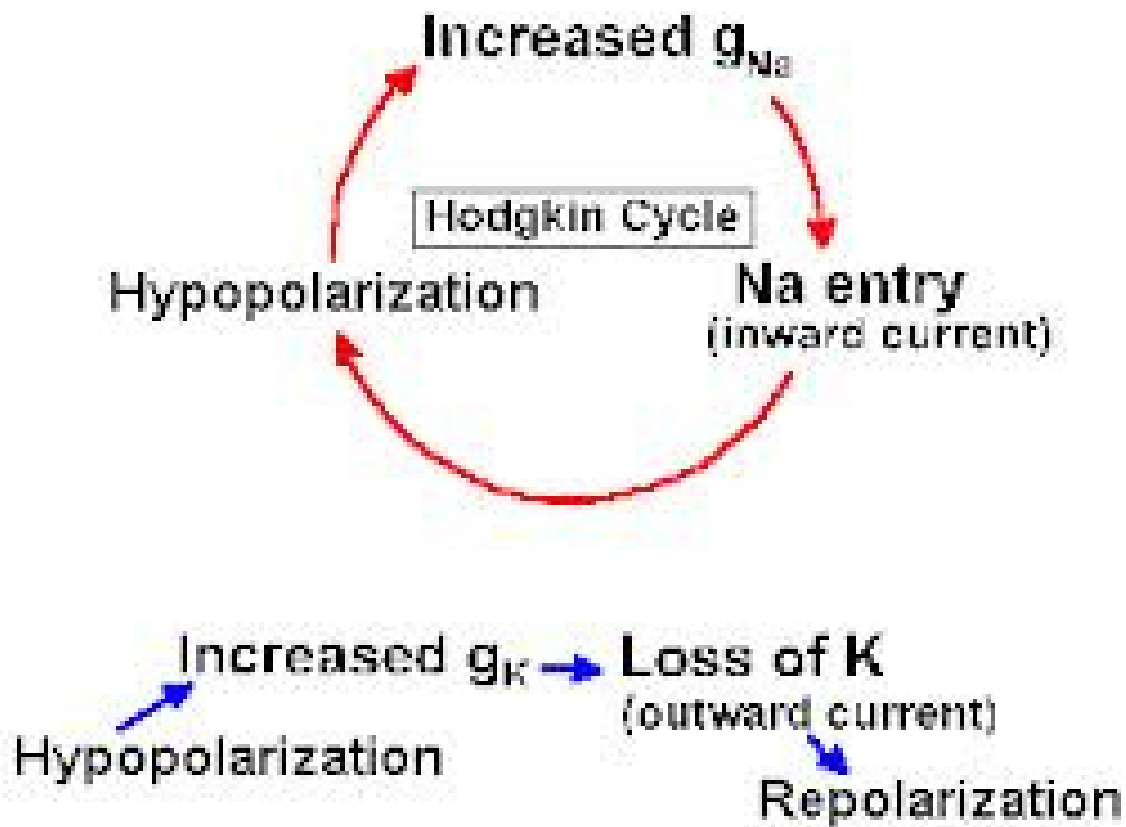
Andamento delle costanti di tempo e dei valori di equilibrio delle variabili  $m$ ,  $n$  e  $h$ , ottenuti da esperimenti a blocco di voltaggio.

L'andamento delle variabili  $m$ ,  $n$  e  $h$  è in grado di spiegare i meccanismi che originano il potenziale d'azione. Immaginiamo, infatti, di perturbare la cellula neuronale con un impulso di corrente tale da aprire un numero sufficiente di canali del sodio (infatti, la variabile  $m$  ha una dinamica molto più veloce delle altre due variabili, e quindi i canali del sodio si aprono, in seguito alla depolarizzazione della membrana, con tempi inferiori al ms). L'apertura dei canali del sodio provoca un ingresso di ioni  $\text{Na}^+$  dall'esterno all'interno della membrana, a cui fa seguito un ulteriore aumento del potenziale di membrana (cioè una ulteriore depolarizzazione). Si innesta, quindi, un *feedback positivo*, che induce un forte e rapido aumento del potenziale di membrana. Se la conduttanza del sodio divenisse molto maggiore delle conduttanze di tutti gli altri canali ionici, il potenziale di membrana si porterebbe al valore del potenziale di Nernst del sodio, quindi circa 30-40 mV.

Tuttavia, col passare del tempo (cioè dopo 1-2 ms) si verificano altri due fenomeni: cominciano ad aprirsi i canali del potassio (variabile  $n$ ) e cominciano a chiudersi i canali del sodio (variabile  $h$ ). Si noti, infatti, dalla figura precedente, che tali variabili hanno una costante di tempo di alcuni ms. Di conseguenza, il potenziale di membrana torna a calare (maggiore uscita di ioni  $\text{K}^+$  dall'interno all'esterno della membrana, minore ingresso di ioni  $\text{Na}^+$ ). Il potenziale della membrana si porta, transitoriamente, verso il potenziale di equilibrio del potassio, determinando un undershoot. A questo punto, a causa della diminuzione del potenziale  $V$ , i fenomeni descritti in precedenza si innescano in senso opposto (torna a calare rapidamente  $m$ , tornano, con dinamica più lenta, a scendere  $n$  e a risalire  $h$ ) finché il potenziale non si riporta all'equilibrio.

I fenomeni descritti in precedenza sono sintetizzati dalla figura seguente.

Si noti, infine, come la presenza di un periodo di tempo in cui  $m$  è ritornata al valore di equilibrio (prossimo allo zero) mentre le variabili  $h$  e  $n$  sono ancora a un valore alterato ( $h$  prossima allo zero,  $n$  molto alta, a causa della loro lenta dinamica) è in grado di spiegare la presenza dei tempi refrattari. Infatti, durante tale intervallo temporale, la dinamica del sodio è ostacolata dalla variabile  $h$ , mentre i canali del potassio, ancora aperti, mantengono il potenziale d'azione a un valore fortemente negativo. Risulta quindi assai difficile alterare il potenziale di membrana, e indurre un potenziale d'azione, attraverso uno stimolo esterno.



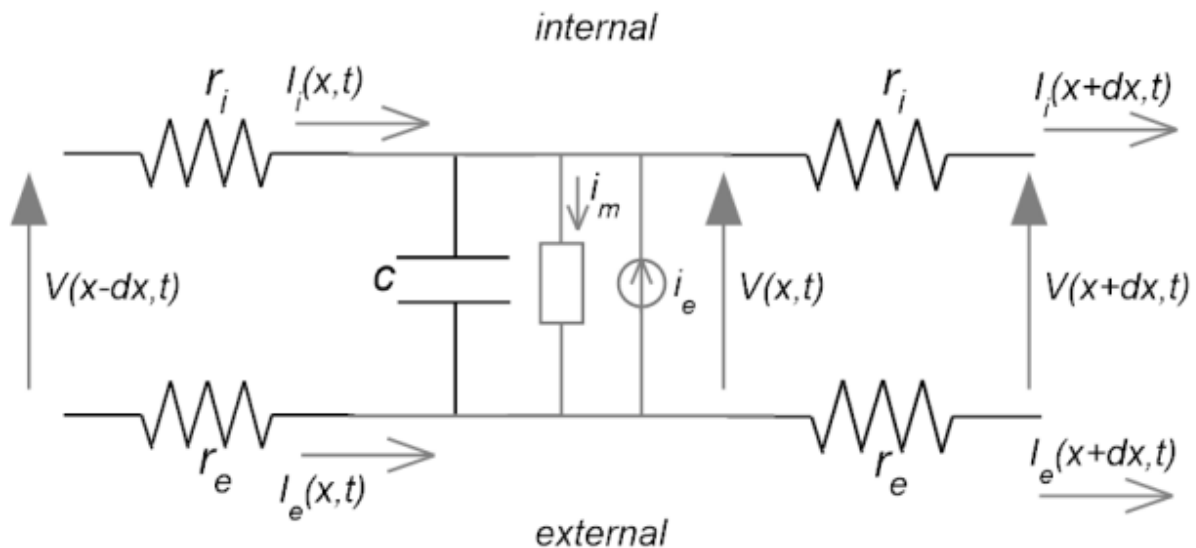
Andamento della conduttanza del sodio e del potassio, in grado di spiegare la genesi del potenziale d'azione. Si noti la presenza di un feedback positivo nella dinamica del sodio, e l'effetto stabilizzante della dinamica del potassio.

## La propagazione del potenziale lungo l'assone

Nel modello considerato in precedenza si immaginava che il potenziale di membrana fosse lo stesso in tutta la cellula, così da avere un modello a costanti concentrate. Nella realtà il potenziale di membrana può variare in modo anche assai significativo lungo la membrana cellulare, soprattutto per quei neuroni caratterizzati da assoni assai lunghi, oppure se consideriamo le rapide variazioni a cui è soggetto il potenziale di membrana. Il potenziale di membrana lungo un assone va quindi descritto più accuratamente attraverso un modello a costanti distribuite, che consideri quindi non soltanto la dipendenza del potenziale dal tempo, ma anche dalle coordinate spaziali.

Nel seguito supporremo un neurone con un lungo assone di forma longitudinale, e ci concentreremo sul fenomeno della propagazione del potenziale lungo l'assone. In particolare, faremo l'ipotesi che l'assone sia assimilabile a un cilindro di raggio  $a$ . Consideriamo, inoltre, che le variazioni di potenziale lungo le direzioni radiali e assiale siano trascurabili rispetto alle variazioni lungo la coordinata longitudinale, per cui considereremo il potenziale di membrana funzione solo delle variabili tempo,  $t$ , e della coordinata longitudinale,  $x$ .

La costruzione del modello segue una trattazione simile a quella che si utilizza nella teoria dei cavi. Consideriamo un tratto infinitesimo di assone di lunghezza  $dx$ . L'analogo elettrico della membrana è presentato nella figura seguente. A titolo di avvertimento, nel seguito si useranno le lettere minuscole per indicare grandezze espresse per unità di lunghezza (se longitudinali) o per unità di superficie (se trasversali), mentre si useranno le lettere maiuscole per le grandezze espresse in unità intera.



Il significato dei simboli è il seguente:

$r_i$ : resistenza longitudinale per unità di lunghezza, dovuta al fluido intracellulare (espressa in  $K\Omega/mm$ );

$r_e$ : resistenza longitudinale per unità di lunghezza dovuta al fluido extracellulare (espressa in  $K\Omega/mm$ );

$c$ : capacità della membrana per unità di superficie;

$V(x, t)$ : potenziale di membrana alla coordinata  $x$  e al tempo  $t$ ;

$I_i(x, t), I_e(x, t)$ : correnti longitudinali, intracellulare e extracellulare, al tempo  $t$  e alla coordinata  $x$ .

$i_m(x)$ : corrente di membrana per unità di superficie alla coordinata  $x$ .

$i_e(x)$ : corrente iniettata (dall'esterno all'interno) per unità di superficie alla coordinata  $x$ .

La prima equazione che possiamo scrivere riguarda il bilancio dei flussi alla coordinata  $x$ . Occorre però ricordare che la capacità  $c$ , e le due correnti  $i_m$  e  $i_e$  sono espresse per unità di superficie. L'insieme di questi tre termini rappresenta l'ammettenza trasversale della membrana. Questa ammettenza trasversale rappresenta ciò che era il circuito di membrana usato nei paragrafi precedenti. Per avere i valori relativi a un tratto infinitesimo di lunghezza  $dx$ , questi termini vanno moltiplicati per la superficie della membrana. Un tratto di lunghezza  $dx$  avrà superficie pari a  $2 \pi a dx$ . Possiamo allora scrivere la seguente equazione di bilancio al nodo:

$$2\pi a dx \left[ c \frac{\partial V(x, t)}{\partial t} + i_m(x, t) - i_e(x, t) \right] = I_i(x, t) - I_i(x + dx, t)$$

che, dividendo per  $dx$ , fornisce:

$$2\pi a \left[ c \frac{dV(x, t)}{dt} + i_m(x, t) - i_e(x, t) \right] = - \frac{\partial I_i(x, t)}{\partial x} \quad (12)$$

La corrente  $I_i$ , a sua volta, è collegata al potenziale intracellulare (che chiameremo  $V_i(x, t)$ ) dall'equazione seguente, che si ottiene calcolando la caduta di tensione infinitesima lungo la resistenza  $r_i$ , cioè

$$r_i dx I_i(x, t) = V_i(x, t) - V_i(x + dx, t)$$

in cui la resistenza è stata moltiplicata per  $dx$ , poiché si tratta di resistenza per unità di lunghezza. L'equazione precedente può essere quindi riscritta nella forma

$$I_i(x, t) = - \frac{1}{r_i} \frac{\partial V_i(x, t)}{\partial x} \quad (13)$$

Un'equazione analoga vale anche per la corrente  $I_e$ , che fluisce esternamente alla membrana, usando però il potenziale extracellulare, e la relativa resistenza extracellulare per unità di lunghezza:

$$I_e(x, t) = - \frac{1}{r_e} \frac{\partial V_e(x, t)}{\partial x} \quad (14)$$

Nelle (13) e (14) compaiono però le nuove variabili,  $V_i$  e  $V_e$ . Vogliamo esprimere tali variabili usando il solo potenziale di membrana  $V$ . Per raggiungere questo obiettivo, possiamo notare che vale la seguente relazione di bilancio fra le due correnti

$$I_i(x, t) - I_i(x + dx, t) = I_e(x + dx, t) - I_e(x, t) \quad (15)$$

Tale equazione è stata ottenuta, semplicemente, esprimendo la corrente che passa attraverso l'ammittenza trasversale (cioè il membro a destra dell'Eq. (12)): la corrente che entra dall'alto deve essere ovviamente uguale alla corrente uscente dal basso.

Inserendo le (13) e (14) nella (15), dividendo per  $dx$ , e assumendo che  $r_i$  e  $r_e$  non siano funzione di  $x$  (consideriamo un assone con diametro costante), otteniamo:

$$-\frac{\partial I_i(x, t)}{\partial x} = \frac{1}{r_i} \frac{\partial^2 V_i(x, t)}{\partial x^2} = \frac{\partial I_e(x, t)}{\partial x} = -\frac{1}{r_e} \frac{\partial^2 V_e(x, t)}{\partial x^2}$$

Ricordando che è  $V(x, t) = V_i(x, t) - V_e(x, t)$ , l'equazione precedente può essere riscritta nella forma:

$$-\frac{\partial I_i(x, t)}{\partial x} = \frac{1}{r_i} \frac{\partial^2 V_i(x, t)}{\partial x^2} = -\frac{1}{r_e} \frac{\partial^2 V_i(x, t)}{\partial x^2} + \frac{1}{r_e} \frac{\partial^2 V(x, t)}{\partial x^2}$$

da cui si ottiene:

$$\left( \frac{1}{r_i} + \frac{1}{r_e} \right) \frac{\partial^2 V_i(x, t)}{\partial x^2} = + \frac{1}{r_e} \frac{\partial^2 V(x, t)}{\partial x^2}$$

e quindi

$$-\frac{\partial I_i(x, t)}{\partial x} = \frac{1}{r_i + r_e} \frac{\partial^2 V(x, t)}{\partial x^2} \quad (16)$$

Sostituendo adesso la (16) nella (12) otteniamo l'espressione del potenziale di membrana lungo l'assone:

$$2\pi a \left[ c \frac{\partial V(x, t)}{\partial t} + i_m(x, t) - i_e(x, t) \right] = \frac{1}{r_i + r_e} \frac{\partial^2 V(x, t)}{\partial x^2} \quad (17)$$

La soluzione dell'Eq. (17) dipende, naturalmente, dall'espressione della corrente  $i_m(x, t)$  che attraversa la membrana per unità di superficie. Sappiamo che tale corrente è soprattutto determinata dalle correnti ioniche e che, come visto nel modello di Hodgkin-Huxley, può assumere un andamento assai complesso nel tempo. In particolare, tale corrente sarà anch'essa funzione del potenziale  $V$ .

#### *Equazione di propagazione: caso lineare*

Consideriamo dapprima il caso in cui il neurone sia vicino al suo potenziale di riposo  $V_0$ , e consideriamo piccole variazioni di  $V$ , tali da non innescare il potenziale d'azione. Una simile trattazione varrebbe anche, più in generale, per una cellula non eccitabile. Se la membrana non si discosta dal comportamento lineare, la corrente di membrana può essere scritta nella forma

$$i_m(x,t) = g_m(V(x,t) - V_0) \quad (18)$$

in cui  $g_m$ , detta conduttanza di membrana, rappresenta la conduttanza per unità di superficie in condizioni di riposo. Sostituiamo la (18) nell'equazione (17) e, ricordando che  $V_0$  è costante (cioè indipendente da  $t$  e da  $x$ ), passiamo al sistema alle variazioni, utilizzando la nuova variabile  $v = V - V_0$ . Otteniamo

$$2\pi a \left[ c \frac{\partial v(x,t)}{\partial t} + g_m v(x,t) - i_e(x,t) \right] = \frac{1}{r_i + r_e} \frac{\partial^2 v(x,t)}{\partial x^2}$$

Chiamiamo  $r_m = 1/g_m$  la resistenza di membrana (che sarà espressa in  $M\Omega \cdot \text{mm}^2$ ). Moltiplicando tutti i membri della precedente equazione per  $r_m$ , e dividendo per  $2\pi a$ , otteniamo:

$$r_m c \frac{\partial v(x,t)}{\partial t} + v(x,t) - r_m i_e(x,t) = \frac{r_m}{2\pi a(r_i + r_e)} \frac{\partial^2 v(x,t)}{\partial x^2}$$

Poniamo adesso:

$$\tau_m = r_m c \quad : \text{costante di tempo della membrana}$$

$$\lambda = \sqrt{\frac{r_m}{2\pi a(r_i + r_e)}} \quad : \text{costante di spazio}$$

Controlliamo le unità di misura. Essendo  $c$  una capacità per unità di superficie (ad esempio  $c = 10 \text{ nF/mm}^2$ ), ed essendo  $r_m$  il reciproco di una conduttanza per unità di superficie (ad esempio  $r_m = 1 \text{ M}\Omega \cdot \text{mm}^2$ ) si ottiene una costante di tempo dell'ordine di 1-10 ms. Infine, essendo  $a$  in  $\mu\text{m}$  (ad esempio un assone può avere raggio di  $2 \mu\text{m}$ ), le resistenze longitudinali sono espresse per unità di lunghezza (ad esempio:  $r_i + r_e = 40 \text{ M}\Omega / \text{mm}$ ) si ricava che  $\lambda$  ha la dimensione di una lunghezza, tipicamente:  $(1 \text{ M}\Omega \cdot \text{mm}^2 / [(40 \text{ M}\Omega / \text{mm}) \cdot (2 \mu\text{m}) (2\pi)])^{1/2} = [1 \text{ mm}^3 / (40 \cdot 4 \pi 10^{-3} \text{ mm})]^{1/2} \simeq 2 \text{ mm}$ .

Con le precedenti posizioni, l'equazione può essere scritta nella forma canonica.

$$\tau_m \frac{\partial v(x,t)}{\partial t} + v(x,t) - r_m i_e(x,t) = \lambda^2 \frac{\partial^2 v(x,t)}{\partial x^2} \quad (19)$$

Si ricordi che, nello scrivere l'eq. (19), abbiamo considerato  $r_m$  come la resistenza di membrana in condizioni di riposo e abbiamo supposto *che il suo valore rimanga costante*, come nel caso di una cellula non eccitabile.

La soluzione dell'equazione (19) richiede di specificare non solo lo stato iniziale (al tempo  $t = 0$ ), ma anche le condizioni al contorno nello spazio (si tratta infatti di un'equazione alle derivate parziali). Esistono varie modalità per specificare tali condizioni. Per quanto concerne lo spazio, le condizioni al contorno vanno specificate nei punti terminali dell'assone, oppure alle ramificazioni. Ad esempio, in un punto di ramificazione occorrerà specificare la continuità del potenziale e la conservazione della corrente totale. Nel seguito considereremo soltanto il caso semplice di un



assone di lunghezza infinita. Ovviamente tale caso non può verificarsi nella pratica, ma può essere considerato la buona approssimazione di un assone molto lungo.

Un esempio: condizione stazionaria in presenza di una corrente costante.

Supponiamo di stimolare l'assone con una corrente costante, e che l'elettrodo sia puntiforme (quindi la corrente è ovunque nulla tranne che per  $x = 0$ ). In particolare, supponiamo di partire con un elettrodo di lunghezza  $\Delta$ , che inietti una corrente totale  $I_e$ . Avremo

$$2\pi a \Delta i_m(x, t) = \begin{cases} I_e & \text{se } |x| < \Delta/2 \\ 0 & \text{se } |x| \geq \Delta/2 \end{cases}$$

Passando al limite per  $\Delta \rightarrow 0$ , e ricordando le proprietà della delta di Dirac, possiamo scrivere.

$$i_m(x, t) = \begin{cases} \lim_{\Delta \rightarrow 0} \frac{I_e}{2\pi a \Delta} & \text{se } |x| < \Delta/2 \\ 0 & \text{se } |x| \geq \Delta/2 \end{cases} = \frac{I_e}{2\pi a} \delta(x)$$

Consideriamo la soluzione all'equilibrio, quando il transitorio è terminato. Allora, per ogni  $x \neq 0$ , la (19) diventa:

$$v(x) = \lambda^2 \frac{d^2 v(x, t)}{dx^2} \quad x \neq 0 \quad (20)$$

La cui soluzione ha la forma:

$$v(x) = A \exp(-x/\lambda) + B \exp(+x/\lambda) \quad x \neq 0 \quad (21)$$

Occorre trovare le due costanti  $A$  e  $B$ , imponendo le condizioni al contorno. Poiché il cavo è supposto di lunghezza infinita, richiediamo che la soluzione non diverga. Allora  $A = 0$  per  $x < 0$ ,  $B = 0$  per  $x > 0$ . Otteniamo

$$v(x) = \begin{cases} A \exp(-x/\lambda) & x > 0 \\ B \exp(+x/\lambda) & x < 0 \end{cases}$$

Inoltre, per simmetria, dovrà essere  $A = B$ . Dalla conoscenza della corrente  $I_e$ , imponendo la derivata della tensione  $V$  nell'origine, e infine possibile ricavare la costante  $A$ , che risulterà naturalmente proporzionale alla corrente. Si omette la dimostrazione (si veda ad, esempio, Dayan and Abbott, Theoretical Neuroscience). Risulta  $A = \frac{I_e}{2} \frac{r_m}{2\pi a \lambda}$ . La forma generale della soluzione è allora la seguente:

$$v(x) = A \exp(-|x|/\lambda) = \frac{I_e}{2} \frac{r_m}{2\pi a \lambda} \exp(-|x|/\lambda) \quad (22)$$

Consideriamo infine il caso in cui si inietti un impulso di corrente di durata limitata. Sia cioè adesso:

$$i_m(x,t) = \frac{I_e \tau_m}{2\pi a} \delta(x) \delta(\tau)$$

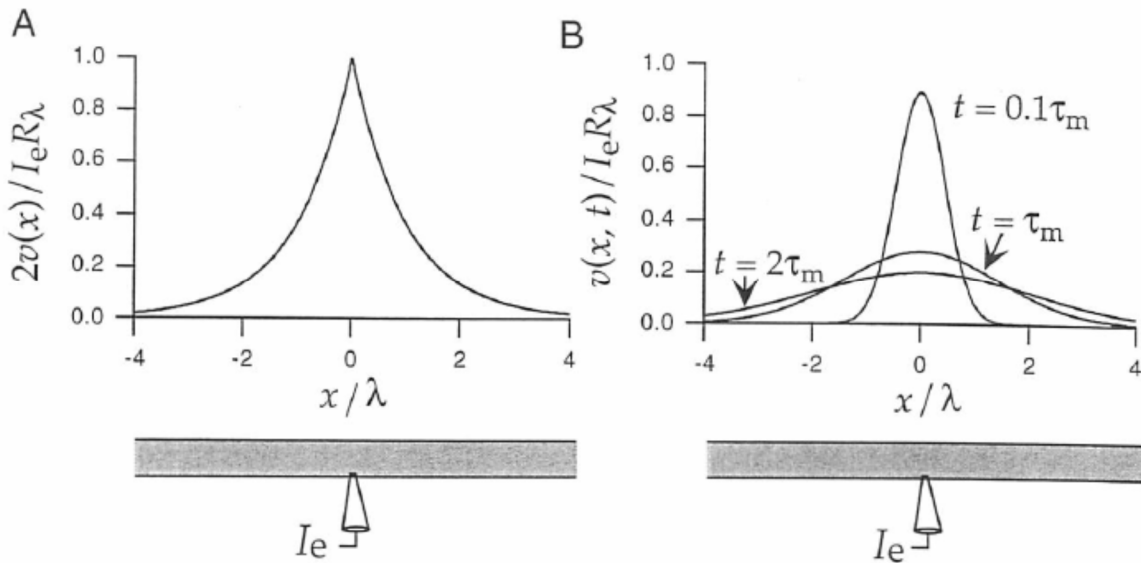
Il che significa che la carica totale iniettata (corrente per durata) risulta pari a  $I_e \tau_m$ .

Forniamo la soluzione, omettendo la dimostrazione (si veda, ad esempio, Tucker, 1988). Naturalmente adesso, trovandoci in un caso non stazionario, la soluzione dipenderà sia da  $x$  che da  $t$ . Risulta

$$v(x,t) = \frac{I_e r_m}{2\pi a \lambda} \exp\left(-\frac{\tau_m x^2}{4\lambda^2 t}\right) \exp\left(-\frac{t}{\tau_m}\right) \quad (23)$$

L'Eq. (23) ci dice che la soluzione è fornita da una gaussiana la cui varianza cresce con  $t$ , ma la cui ampiezza si attenua esponenzialmente con costante di tempo  $\tau_m$ .

Un esempio di soluzioni (22) (corrente costante) e (23) (corrente impulsiva, è presentato nella figura sottostante.



Andamento del potenziale di membrana propagato lungo un assone cilindrico, supposto di lunghezza infinita (da Dayan and Abbott, "Theoretical Neuroscience", pag. 209). A) La figura a sinistra si riferisce al caso stazionario, con iniezione di corrente costante alla coordinata  $x = 0$  (Eq. (20)). Il potenziale decade esponenzialmente lungo entrambe le direzioni. B) La figura a destra si riferisce al caso dinamico, caratterizzato dall'iniezione di una corrente impulsiva e puntiforme all'istante  $t = 0$  e alla posizione  $x = 0$  (Eq. (21)). Il potenziale è descritto da una Gaussiana, la cui deviazione standard cresce nel tempo, ma la cui ampiezza decade progressivamente.

Si noti infine che ad una espressione simile alla (20), ma più generale, si può pervenire trasformando l'Eq. (19) secondo Laplace (e approfittando del fatto che il modello è lineare). Si ottiene (assumendo condizioni iniziali ovunque nulle)

$$(\tau_m s + 1)v(x, s) - r_m i_e(x, s) = \lambda^2 \frac{d^2 v(x, s)}{dx^2} \quad (24)$$

Se ora supponiamo una corrente impulsiva, e quindi ovunque nulla per  $x \neq 0$ , otteniamo un'espressione simile alla (20) ma nel dominio di Laplace:

$$v(x, s) = \frac{\lambda^2}{\tau_m s + 1} \frac{d^2 v(x, s)}{dx^2} \quad x \neq 0 \quad (25)$$

la cui soluzione ha la forma:

$$v(x) = A \exp\left(-\frac{x\sqrt{\tau_m s + 1}}{\lambda}\right) + B \exp\left(\frac{x\sqrt{\tau_m s + 1}}{\lambda}\right) \quad x \neq 0 \quad (26)$$

Il primo termine della (26) rappresenta un'onda diretta (che si propaga nella direzione delle  $x$  positive) mentre il secondo termine un'onda inversa. Le costanti  $A$  e  $B$  vanno assegnate sulla base delle condizioni al contorno (forma della corrente iniettata, eventuali impedenze di carico della linea o eventuali biforcazioni, ecc...).