

RICHIAMI DI ELETTROFISIOLOGIA DEI TESSUTI ECCITABILI

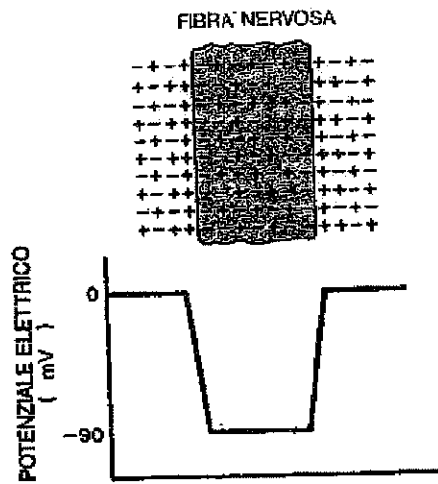
Introduzione

La bioelettricità ha le sue origini dalla differenza di potenziale presente tra l'interno e l'esterno della cellula. Questi potenziali provengono dalle proprietà specializzate della membrana cellulare, che separa il volume intracellulare da quello extracellulare. Molte delle superfici di membrana sono composte da un doppio strato fosfolipidico, un materiale elettricamente inerte. Poiché la membrana è sottile (c.a. 75 Å), si ha una capacità, c.a. $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$. Tale capacità di membrana è minore nei tessuti nervosi, eccetto che nei nodi di Ranvier, a causa dello strato mielinico che rende la fibra più spessa.

La membrana cellulare come una capacità

Quando le cariche positive vengono pompate all'esterno della membrana, queste si allineano sulla sua faccia esterna, mentre lungo la faccia interna si dispongono gli anioni che sono stati lasciati al di qua della membrana stessa. Ciò crea uno strato di dipoli, cioè coppie di cariche con segno opposto, tra esterno ed interno della membrana, ma lascia un ugual numero di cariche negative e cariche positive in qualunque altro punto dell'ambiente liquido. È lo stesso effetto che si produce quando le armature di un condensatore elettrico si caricano elettricamente (cioè cariche positive e negative si dispongono in modo da rivestire le opposte facce della membrana dielettrica tra le armature). Perciò, il doppio strato lipidico della membrana cellulare funziona, in effetti, come un dielettrico del condensatore rappresentato dalla stessa membrana.

Il fatto che la membrana della fibra nervosa funzioni come un condensatore ha un'importanza di particolare rilievo: perché si stabilisca un potenziale negativo all'interno della cellula basta che vengano trasportati all'esterno solo ioni positivi in quantità sufficiente a dare origine allo strato di dipoli a livello della membrana stessa. Restano all'interno della fibra nervosa tutti gli altri ioni, sia negativi che positivi. Perciò, affinché si instauri il normale potenziale di -90 mV all'interno della fibra nervosa è necessario che venga trasferito attraverso la membrana un numero incredibilmente piccolo di ioni (all'incirca da $1/5\ 000\ 000$ a $1/10\ 000\ 000$ della totalità delle cariche positive all'interno della fibra). Così pure un numero ugualmente piccolo di ioni positivi che entrino all'interno della fibra è sufficiente a invertire il potenziale da -90 mV a +35 mV nel tempo di appena 100 μs .



Andamento del potenziale elettrico a cavallo di una membrana cellulare (tratto da Rif. (9))

Polarizzazione di membrana

Le pompe ioniche, dentro le membrane, operano costantemente per produrre concentrazioni ioniche marcatamente differenti negli spazi interni ed esterni della cellula. Un potenziale transmembrana, o polarizzazione, cresce attraverso la membrana a causa della differenza di concentrazione. Nello stato stabile, il potenziale transmembrana (V_m), in un sistema a 2 ioni è, secondo l'equazione di Goldman:

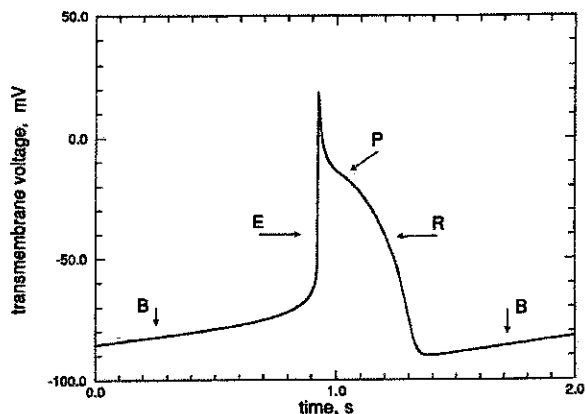
$$V_m = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_k [K]_e + P_{Na} [Na]_e}{P_k [K]_i + P_{Na} [Na]_i} \right) \quad (0)$$

dove R è la costante dei gas, T è la temperatura, F è la costante di Faraday ($RT/F \approx 25$ mV), P la permeabilità ionica, $[]$ le concentrazioni ioniche ed i pedici i, e indicano interno, esterno.

La creazione di un potenziale d'azione deriva, essenzialmente, da una variazione di membrana alla permeabilità di questi ioni, così da passare da uno stato stabile ad uno eccitato.

Potenziali d'azione cardiaci

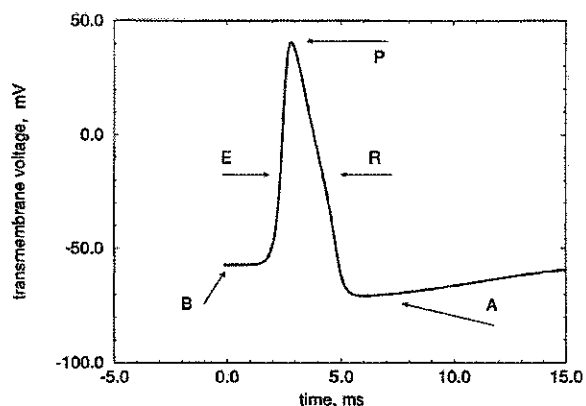
Un potenziale d'azione per il sistema di conduzione cardiaca stimolato con il modello del Nobel Di Francesco è mostrato nella figura seguente. Inizialmente V_m ha un valore base di c.a -80 mV. Durante l'eccitazione, la permeabilità di membrana cambia, e V_m cresce brutalmente. Dopo il picco sovrasoglia di c.a 20 mV, il potenziale mantiene un plateau di c.a -20 mV per una durata sui 300 ms e poi ridiscende rapidamente allo stato base. La durata complessiva del Potenziale d'azione è di c.a 400 ms.



Potenziale d'azione cardiaco (tratto da Rif. (8))

Potenziali d'azione di fibre nervose

Per confronto, un potenziale d'azione per il nervo stimolato col modello Hodgkin-Huxley è mostrato nella fig. seguente. Si evidenzia una corrispondenza tra linea di base, eccitazione, plateau e fase ridiscendente, nonché la variazione di potenziale tra stato stabile ed eccitato, nuovamente, di 100 mV c.a. Notiamo tuttavia che la fase di plateau è così breve da apparire come inesistente, come anche la durata totale del potenziale d'azione scatenato: solamente 4 ms.



Potenziale d'azione di un nervo (tratto da Rif. (8))

Onde e funzioni

Tutte le membrane eccitabili sono caratterizzate dalla loro abilità di variare la permeabilità di membrana e quindi la loro selettività. Sia potenziale d'azione cardiaci che nervosi dimostrano una rapida depolarizzazione, seguita da una più lenta ripolarizzazione associata alle variazioni di permeabilità di membrana e del potenziale di membrana di c.a 100 mV. Le differenze sopra riportate denotano, inoltre, delle notevoli proprietà. Potenziale d'azione cardiaci hanno una lunga durata che limita il più breve intervallo tra battiti. Questo intervallo deve essere sui 100 ms per permettere al sangue di fluire. L'esteso plateau è associato al movimento degli ioni calcio, ulteriormente associato

alla contrazione muscolare. Diversamente, un potenziale d'azione nervoso, configura una funzione di segnale. Ciò è supportato da una minor durata del potenziale d'azione, il che permette una maggior variabilità nel numero di potenziale d'azione propagati al secondo. Inoltre i nervi non necessitano di contrazione, né di un periodo plateau per il movimento degli ioni calcio.

Attivazione dei potenziale d'azione

Normalmente i canali di membrana sono controllati dalle variazioni del potenziale transmembrana. In particolare, quando il potenziale sale dai valori basali al livello soglia, la membrana inizia la sequenza di variazioni della permeabilità che portano alla creazione del potenziale d'azione. Il cambio del potenziale transmembrana che avvia il potenziale d'azione normalmente proviene da correnti originate nel tessuto adiacente, oppure da fonti artificiali come gli stimolatori.

Meccanismo del potenziale d'azione

Feedback positivo per l'apertura dei canali Na^+

Quando la membrana nervosa resta totalmente indisturbata, non si origina alcun potenziale d'azione nella fibra normale. Ma se un qualsiasi evento provoca un aumento iniziale, sufficiente, del potenziale di membrana dal livello di -90 mV verso il livello zero, è lo stesso voltaggio in aumento a far sì che molti canali del Na^+ voltaggio dipendenti, comincino ad aprirsi. Ciò permette un rapido ingresso di ioni Na^+ , che provoca un ulteriore aumento del potenziale di membrana, ed autoalimentazione questo processo in feedback positivo, almeno finché tutti i canali di questo tipo risultano aperti. A questo punto il potenziale di membrana in aumento provoca la disattivazione dei canali Na^+ e l'attivazione di quelli K^+ , così da cessare il rapido aumento del potenziale.

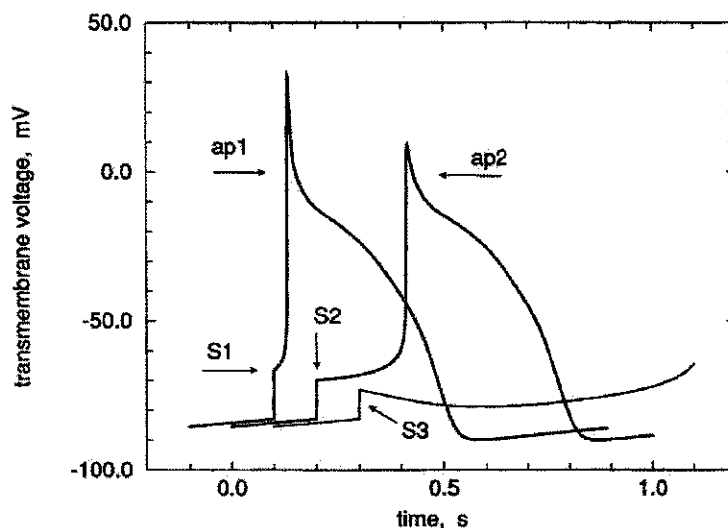
Soglia per l'insorgenza del potenziale d'azione

Non si produrrà un potenziale d'azione fino a quando l'aumento iniziale del potenziale di membrana non sia grande abbastanza da innescare il circolo vizioso sopra descritto. Di solito è necessario un brusco aumento del potenziale di 15-30 mV. Perciò, in una grossa fibra nervosa, con potenziale di riposo di -90 mV, un aumento improvviso del potenziale ad un livello di circa -65 mV di solito provoca lo sviluppo esplosivo del potenziale d'azione. Tale livello è detto *soglia di eccitazione*.

Soglia

Un importante risultato generale, dimostrato nella fig. seguente, è quindi la generazione del potenziale di azione che ha un comportamento soglia, al di sotto della quale, ogni forma di stimolo del potenziale di membrana, non comporta effetti risultanti al fine di innescare un potenziale d'azione. Questo comportamento è noto come "legge del tutto o del nulla", in quanto l'effetto risultante è indipendente dalla differenza di valore sovrasoglia, poiché reagirà sempre allo stesso modo.

Varia, invece, il valore soglia specifico per ogni tessuto in base a fattori come la durata dello stimolo, l'ammontare delle membrane coinvolte e il gradiente di potenziale intracellulare che riguarda il decadimento dello stimolo.



Effetto della applicazione di stimolazioni di differente ampiezza (S1, S2, S3): un potenziale d'azione nasce soltanto per S1, S2, (stimolazioni soprasoglia) (tratto da Rif. (8))

Fenomeno dell'accomodazione

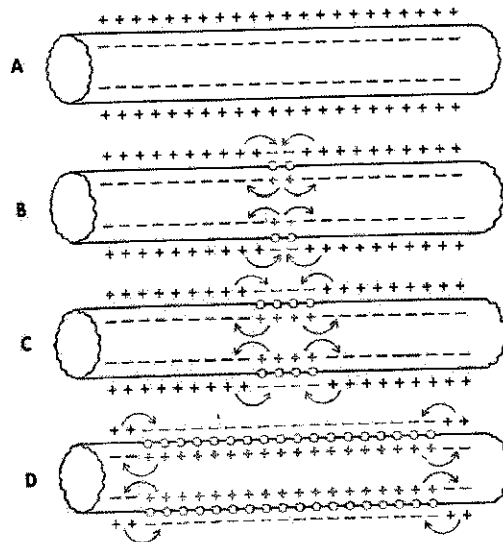
Se il potenziale di membrana aumenta molto lentamente (in un tempo di millisecondi anziché frazione di millisecondo) le lente porte di inattivazione dei canali del Na^+ avranno il tempo di chiudersi nello stesso tempo in cui si stanno aprendo le porte di attivazione. Di conseguenza, l'apertura di queste ultime non sarà così efficace come di norma nell'aumentare il flusso di ioni Na^+ giacché molte delle porte di inattivazione saranno già chiuse. Perciò, un lento aumento del potenziale interno di una fibra nervosa o richiederà un voltaggio soglia più alto del normale per provocare un potenziale d'azione oppure, a volte, ne impedirà del tutto l'insorgenza anche con un voltaggio aumentato in misura tale da raggiungere il livello zero o addirittura valori positivi.

Biofisica di base

Nonostante la propagazione nei nervi sia spesso paragonata alla propagazione delle onde sonore o luminose, alle onde nell'oceano, o alle onde elettriche nei cavi, la propagazione bioelettrica non ha un'analogia base fisica. Nelle prime categorie, l'energia usata alla sorgente crea un disturbo che propaga fino all'osservatore attraverso un mezzo passivo sopraggiunto. La velocità di propagazione dipende dalle proprietà di questo mezzo. Nella propagazione bioelettrica, ciò che avviene, è che la sorgente stessa si sta muovendo fino ad un mezzo eccitabile, attraverso la membrana, in un processo più simile all'esplosione di una catena di petardi. La velocità associata con la propagazione bioelettrica relazione all'ampiezza della corrente transmembrana passante attraverso un sito sulla membrana e fluente ad un altro, alla velocità con cui avviene una risposta attiva della membrana nei siti di deflusso. Nonostante siano richiesti brevi intervalli per la propagazione passiva in conseguenza agli eventi attivi attraverso il tessuto circostante, questi intervalli sono minuscoli se confrontati ai tempi richiesti per gli scambi attivi. Di conseguenza, molti degli eventi bioelettrici, sono analizzati come una sequenza di stati "quasi statici".

Propagazione dei potenziali d'azione

Un potenziale d'azione, in qualsiasi punto della membrana insorga, generalmente eccita le parti adiacenti della stessa membrana, con il risultato che esso si propaga. Il meccanismo è chiaramente dimostrato nella fig. seguente. Al punto A troviamo una normale fibra nervosa a riposo, mentre in B la fibra viene eccitata nella sua parte centrale. Le frecce rappresentano un *circuito locale* con un flusso di corrente tra le zone depolarizzate e quelle ancora a riposo della membrana. Cariche elettriche positive veicolate dagli ioni Na^+ che diffondono verso l'interno fluiscono attraverso la membrana depolarizzata, e poi per diversi mm lungo la parte centrale dell'assone. Queste cariche positive fanno aumentare il voltaggio all'interno, per una distanza che per le fibre grosse è di 1-3 mm, facendo salire al di sopra del livello soglia per lo sviluppo di un potenziale d'azione. Perciò, i canali del sodio di queste nuove zone vengono immediatamente attivati, e, come mostrato in C e D il processo esplosivo del potenziale d'azione si propaga. E queste nuove zone depolarizzate danno origine a nuovi circuiti locali riavviando il processo in modo consequenziale da entrambi i lati della membrana, creando flussi che provocano una progressiva depolarizzazione, estendendosi per tutta la fibra. Tale processo è definito come *impulso nervoso* o *muscolare*.



Propagazione di un potenziale d'azione in entrambe le direzioni di una fibra nervosa (tratto da Rif. (9))

Plateau di alcuni potenziale d'azione

In certi casi la membrana eccitabile non si ripolarizza immediatamente dopo la depolarizzazione, ma il potenziale d'azione resta su di un plateau quasi all'altezza del picco ed a volte vi rimane per diversi ms, prima che abbia inizio la ripolarizzazione. [fig. col plateau] Questo tipo di potenziale d'azione è quello che si riscontra nel cuore dove il plateau ha una durata di due o tre decimi di secondo, e la contrazione del muscolo cardiaco copre quasi interamente tale periodo di tempo. Il plateau che si osserva nel potenziale d'azione dipende dal concorso di diversi fattori. In primo luogo, nel muscolo cardiaco due distinti tipi di canali intervengono nel processo di depolarizzazione: i comuni canali Na^+ attivati dal voltaggio, chiamati *canali rapidi*, e i canali Ca^{2+} - Na^+ , anch'essi attivati dal voltaggio, ma meno rapidi nel processo di attivazione, e per questo chiamati *canali lenti*. Questi ultimi permettono la diffusione, principalmente, di ioni calcio, ma anche di qualche ione sodio. L'attivazione dei canali

rapidi è la causa dello spike, mentre l'attivazione lenta, ma prolungata, dei canali lenti è principalmente responsabile del plateau.

Un secondo fattore, in parte responsabile dell'esistenza del plateau, è rappresentato dal fatto che i canali del K^+ a voltaggio dipendente sono lenti ad essere attivati in alcuni tessuti eccitabili, spesso non aprendosi fino all'estremo limite del plateau. Ciò ritarda il ritorno del potenziale di membrana verso il valore di riposo.

Ritmicità di alcuni tessuti eccitabili

Scariche automatiche a ripetizione (*autoritmicità*) si osservano normalmente nella maggior parte dei muscoli lisci, nel cuore ed anche in molti neuroni del sistema nervoso centrale. Sono scariche di questo tipo che provocano il battito cardiaco, che causano la peristalsi, e che stanno alla base di quelle attività neuronali come la regolazione ritmica del respiro. Ma anche tutti gli altri tessuti eccitabili possono generare scariche a ripetizione se la loro soglia di eccitabilità scende a livelli sufficientemente bassi.

Affinché si verifichi tale ritmicità, la membrana deve avere già di sua natura una permeabilità agli ioni Na^+ , o agli ioni Ca^{2+} e Na^+ attraverso i canali lenti $Ca^{2+}-Na^+$, sufficiente a consentire una depolarizzazione automatica della membrana stessa. In fig. 5-14 il potenziale di membrana a riposo è di -60 o -70 mV. Questo non è un grado di negatività sufficiente a mantenere chiusi i canali Na^+ e $Ca^{2+}-Na^+$. Quindi, 1) ioni Ca^{2+} e Na^+ penetrano all'interno, 2) ciò fa ulteriormente aumentare la permeabilità della membrana, 3) ancora più ioni entrano, 4) la permeabilità aumenta ancora, e così via, innescando il processo autorigenerativo dell'apertura dei canali Na^+ e $Ca^{2+}-Na^+$ fino alla generazione di un potenziale d'azione. Poi, alla fine del potenziale d'azione, la membrana si ripolarizza. Ma, subito dopo, il processo di depolarizzazione comincia di nuovo, fino all'insorgenza spontanea di un altro potenziale d'azione. Il processo si ripete più e più volte, determinando un'autoeccitazione ritmica del tessuto eccitabile.

Ma perché, dopo che si è ripolarizzata, la membrana non si depolarizza immediatamente, invece di far passare quasi un secondo prima che insorga il successivo potenziale d'azione? [fig. 5-10] Verso la fine del potenziale d'azione, e per breve tempo dopo, la membrana diventa eccessivamente permeabile al potassio. L'eccessivo efflusso di ioni K^+ trasporta all'esterno della membrana un grande numero di cariche positive, generando all'interno della fibra una negatività considerevolmente maggiore di quella che altrimenti si creerebbe per un breve periodo dopo che è cessato il precedente potenziale d'azione, portando così il potenziale della membrana più vicino al potenziale di Nernst del potassio. Tale condizione è detta di *iperpolarizzazione*. Fin tanto che questo stato permane, non si avrà riecitazione; ma gradualmente, l'eccessiva conduttanza per il potassio (e con essa lo stato di iperpolarizzazione) regredisce, permettendo perciò che il potenziale di membrana aumenti fino a raggiungere la soglia dell'eccitazione. Allora bruscamente esplode un nuovo potenziale d'azione.

Velocità di propagazione

È difficile predire la velocità di propagazione per una particolare struttura tessutale a priori dalla sua misurazione. Velocità di propagazioni sperimentali riportano range da meno di 0.01 m/s ad oltre 10 m/s, in base alla particolare membrana, alle strutture coinvolte e al suo ambiente. Dentro un particolare nervo o muscolo, comunque, la velocità è varia poco sotto condizioni normali. Variazioni nella velocità di propagazione θ come risultato di variazioni nel diametro della fibra a o della resistività specifica R_i può essere approssimato dall'equazione:

$$\theta = \sqrt{\frac{Ka}{2R_i}} \quad (1)$$

Dove K è una costante determinata dalle proprietà di membrana, a è il raggio della membrana, e R_i è la resistenza specifica del mezzo intracellulare, e l'equazione assume una resistenza extracellulare relativamente bassa. Un'importante relazione data da questa equazione è la proporzionalità tra la velocità e la radice quadrata del raggio della fibra. I sistemi viventi sono vantaggiosi da questa relazione grazie ai grossi diametri delle fibre, dove è essenziale una velocità superiore.

Table 1. Morphology and electrophysiology of the fibers in Peripheral nervous system

Fiber type	class	MCV ¹ (m/s)	Diameter (µm)	Function
Aα	myelinated	70-120	12-20	motor somatic muscle fibre; proprioception; muscle spindle annulospiral; proprioception; Golgi tendon organ
Aβ	myelinated	70-120	5-12	proprioception; muscle spindle flower spray; exteroception; touch & pressure
Aγ	myelinated	30-70	3-6	motor somatic muscle spindle
Aδ	myelinated	12-30	2-5	exteroception; pain temperature (some) touch
B	thin myelinated	3-14	<3	motor autonomic preganglionic
C	unmyelinated	5-2.5	0.4-1.2	exteroception; pain reflex responses
C	unmyelinated	5-2.5	0.3-1.3	motor autonomic postganglionic sympathetic

¹Mean Conduction Velocity

Correnti transmembrana

Sfruttando il principio di conservazione della carica possiamo sviluppare un'equazione per la corrente di membrana I_m che dipenda dalla distribuzione locale di potenziale intracellulare piuttosto che sulle correnti passanti per la membrana. La conservazione della corrente richiede che la corrente attraverso la membrana nella posizione assiale z sia la differenza tra la corrente entrante e quella uscente dal sito. Poiché le correnti intracellulari seguono la derivata prima di ϕ_i , allora per un flusso monodimensionale avremo che:

$$I_m = \frac{1}{2\pi ar_i} \frac{\partial^2 \phi_i}{\partial z^2} \quad (2)$$

dove r_i è la resistenza assiale per unità di lunghezza, a è il raggio della fibra, e ϕ_i è il potenziale intracellulare.

Inibizione dell'eccitabilità

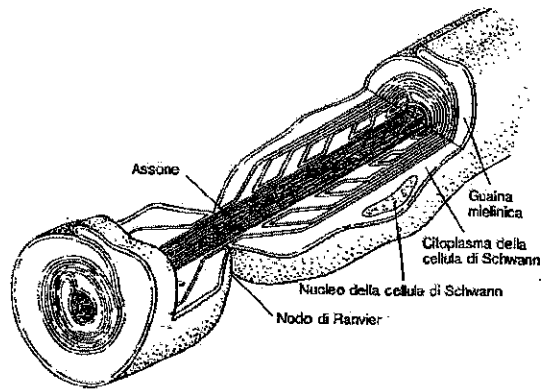
A differenza dei fattori che esaltano l'eccitabilità della fibra nervosa, dei fattori stabilizzanti della membrana, capaci di deprimerla. Per esempio, una elevata concentrazione di ioni Ca^{2+} nel liquido extracellulare riduce la permeabilità della membrana e nello stesso tempo anche l'eccitabilità. Perciò gli ioni Ca^{2+} si dicono "stabilizzanti". Parimenti, una bassa concentrazione di ioni K^+ , nel liquido extracellulare, poiché ha l'effetto di ridurre la permeabilità dei canali del K^+ , agisce anch'essa da "stabilizzante" e deprime l'eccitabilità della membrana.

Esistono molte sostanze usate clinicamente come anestetici locali, tra cui la procaina e la tetracaina. La maggior parte di esse agisce direttamente sulle porte dell'attivazione dei canali del sodio, rendendone molto più difficile l'apertura, e perciò riducendo l'eccitabilità della membrana. Quando l'eccitabilità ha raggiunto valori così bassi che il rapporto tra entità del potenziale d'azione e soglia di eccitabilità (detto appunto "fattore di sicurezza") risulta inferiore a 1, l'impulso nervoso non riesce più a passare attraverso la zona anestetizzata.

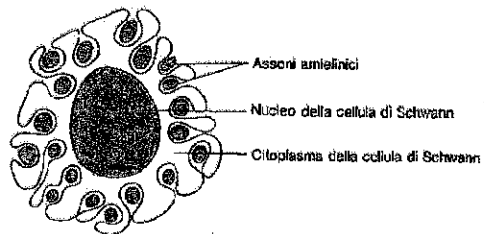
Fisiologia dell'eccitazione

La stimolazione elettrica del tessuto eccitabile è ottenuta con una depolarizzazione artificiale della membrana contenente canali capaci di generare il potenziale d'azione. Il potenziale d'azione è normalmente prodotto dalla corrente sinaptica che subito dopo depolarizza la membrana somatica. I canali del sodio responsabili della fase di depolarizzazione del potenziale d'azione sono a voltaggio dipendenti. Una volta iniziato nel soma il potenziale d'azione viaggia lungo tutto l'assone senza attenuazioni fino al suo obiettivo che sarà un altro neurone o una giunzione neuromuscolare. Gli assoni non mielinati hanno sulla superficie di membrana una serie di canali ionici che permettono di trasportare il potenziale d'azione lungo tutta la loro lunghezza senza difficoltà.

Le membrane degli assoni contenenti i canali agiscono come elementi resistivi e capacitivi limitando la velocità di conduzione. Gli assoni mielinati sono avvolti da una guaina mielinica che diminuisce la capacità della membrana aumentando la velocità di propagazione inoltre fa sì che la conduzione del potenziale d'azione non proceda in modo uniforme ma per steps in quanto il potenziale d'azione si rigenera solo nei piccoli tratti di assone nudo non mielinato che si interpongono tra un avvolgimento di mielina e l'altro, i nodi di Ranvier.

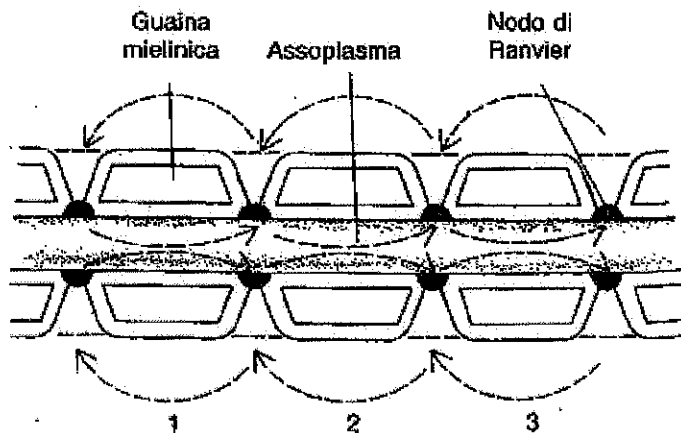


A

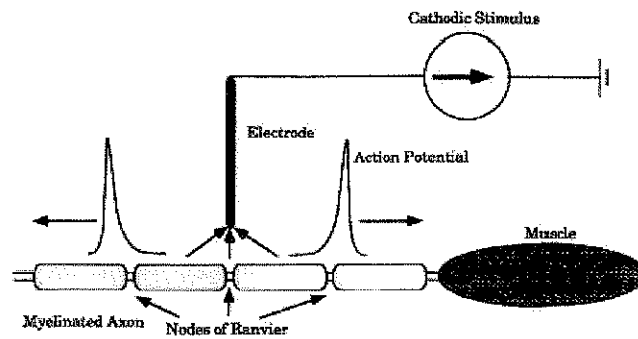


B

Struttura di assone ricoperto da una guaina mielinica (tratto da Rif. (9))



Conduzione saltatoria lungo una fibra mielinica (tratto da Rif. (9))



Stimolazione elettrica di una fibra mielinata. Un elettrodo è posto vicino all'assone ed è applicato uno stimolo catodico all'elettrodo. Il flusso di corrente nell'assone e intorno ad esso è descritto in questo capitolo e causa la depolarizzazione della membrana vicino agli elettrodi. Potenziali d'azione sono generati al di sotto dell'assone e si propagano ortodromicamente e antidromicamente

Il potenziale d'azione può essere generato artificialmente posizionando elettrodi direttamente dentro la cellula. Il flusso di corrente attraversandola produce una depolarizzazione seguita da un'eccitazione della cellula a condizione che la quantità di corrente sia sufficientemente grande. Questa tecnica non può essere usata per la FES perché non esiste ancora una tecnologia per un interfacciare gli elettrodi con un gran numero di assoni. Perciò gli elettrodi devono essere posizionati nello spazio extracellulare vicino al tessuto da eccitare. È dunque possibile attivare più cellule simultaneamente. Comunque la stimolazione deve essere selettiva. La *Selettività* è definita come l'abilità del sistema di stimolazione di attivare ogni serie di assoni scelti. Per esempio il sistema nervoso sceglie di arruolare le fibre più piccole connesse con le unità motorie più piccole e in seguito le più grandi connesse con le unità motorie più grandi per un controllo motorio migliore. Gli impulsi di corrente applicati attivano prima le fibre più grandi e poi le più piccole con una corrente crescente (arruolamento inverso) per ragioni descritte in seguito. L'arruolamento inverso e la nostra impossibilità di reclutare un gruppo di assoni all'interno di un fascio nervoso rende la stimolazione elettrica uno strumento potente ma di difficile controllo.