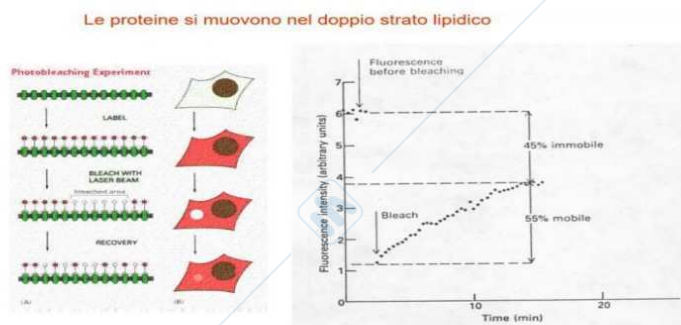




Fisiologia Generale - Esperimenti e Grafici

Fisiologia
Università degli Studi di Firenze (UNIFI)
12 pag.

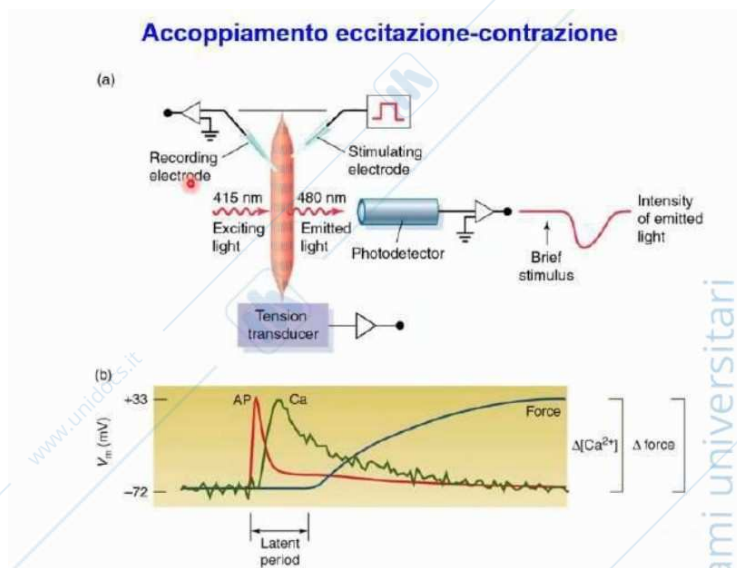
ESPERIMENTI FISILOGIA GENERALE



Esperimento di recupero della fluorescenza in mioblasti trattati con una proteina fluorescente in grado di legarsi alle glicoproteine di membrana. La ricomparsa della fluorescenza in un' area circoscritta della membrana permette di definire la percentuale di glicoproteine mobili e la velocità con cui diffondono.

Esperimento del photobleaching: dimostra la fluidità di membrana, l'esistenza di proteine mobili e a che velocità esse diffondano. Nella figura A abbiamo gli step in cui avviene l'esperimento. Si inizia rendendo fluorescenti le proteine di membrana e osserviamo così una fluorescenza diffusa, dopodiché si utilizza una fonte di luce di

intensità molto elevata e proiettandola in una regione circoscritta della membrana si osserva che la regione diventa scura a causa del danneggiamento (perdita di fluorescenza). Abbiamo poi il recupero della fluorescenza che avviene nel tempo grazie alla fluidità della membrana che permette lo spostamento di alcune proteine marcate. Si ha il recupero della fluorescenza che però non è come quello di partenza questo perché alcune delle proteine marcate e danneggiate sono immobili e non possono spostarsi dalla zona scura, il rapporto dell'intensità di emissione della fase di recupero con l'intensità massima iniziale definisce la percentuale di proteine immobili della membrana oggetto di studio. Dal grafico vediamo che il 55% sono proteine mobili e il 45% immobili.



L'aumento della $[Ca^{2+}]_i$ è promosso dalla depolarizzazione del sarcolemma

esperimento che descrive l'accoppiamento eccitazione-contrazione. Per avere contrazione serve avere aumento di calcio e depolarizzazione della membrana. Quando si ha depolarizzazione della membrana si ha il rilascio di calcio che promuove la liberazione della forza. Per l'esperimento si utilizzano fibre intatte e si va a misurare la variazione di calcio durante la contrazione. La misurazione della variazione della concentrazione di calcio è possibile utilizzando delle sonde

fluorescenti sensibili al calcio. Le sonde fluorescenti emettono diversa quantità di luce in presenza o assenza di calcio. Si usa un colorante fluorescente che è iniettato al suo interno, è poi eccitato a 415 nm ed emette a 480 nm, in presenza di calcio la luce emessa diminuisce. Quantificando la fluorescenza emessa durante la contrazione possiamo seguire l'andamento temporale della variazione di calcio durante il processo. Contemporaneamente si misura anche il potenziale d'azione e produzione di forza, i cui valori sono riportati nel grafico di sotto. La linea rossa indica il pda che precede l'aumento di calcio indicato con la linea verde, si ha un transiente di calcio, il quale ha

un picco per poi diminuire e dopo l'aumento della concentrazione di calcio si ha la produzione di forza a temperatura ambiente.

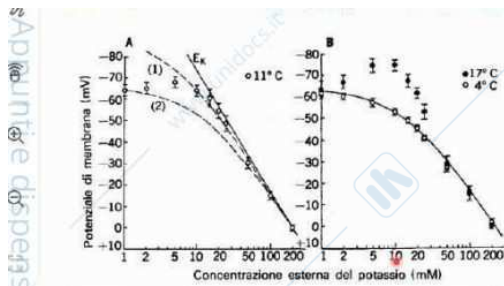


Fig. 1-10. Dipendenza del potenziale di riposo dei neuroni di mollusco dal $[K^+]_o$. A. I potenziali di riposo misurati a $11^\circ C$ non sono corrispondenti né al potenziale di equilibrio per il potassio, E_K , né a quello che ad alto $[K^+]_o$ ne all'equazione di campo costante, si due valori di P_{Na}/P_K . B. A $4^\circ C$ invece i punti (cerchi vuoti) corrispondono all'equazione di campo costante $P_{Na}/P_K = 0,033$; $[K^+]_o = 235$ mM nella curva a linea continua, ma non a $17^\circ C$. (Da Marmor & Gorman; Copyright 1970 American Association for the Advancement of Science.)

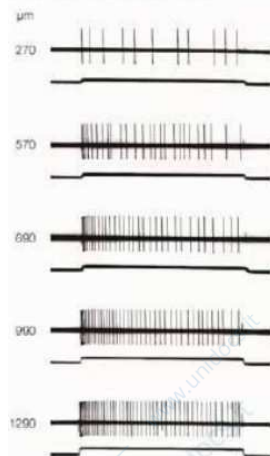
Quando la temperatura è bassa, il contributo della pompa al V_m è molto basso e la relazione tra V_m e $[K^+]_o$ è descritta dall'eq. GHK; quando la temperatura è più elevata i_p aumenta e il contributo della pompa a V_m diventa significativo. L'andamento bifasico di V_m a $17^\circ C$ e a $11^\circ C$ è dovuto alla diminuzione della velocità di trasporto causata dalla riduzione della $[K^+]_o$.

I due grafici esprimono l'attività della pompa sodio potassio in funzione della temperatura: la velocità con cui avviene il trasporto di sodio e di potassio dipende dalla temperatura a cui la cellula si

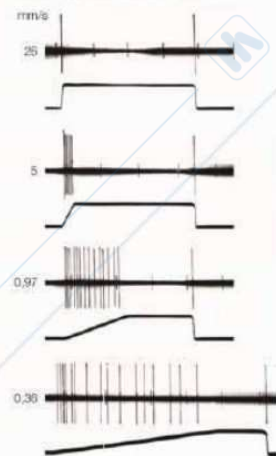
trova e la velocità di trasporto aumenta con la T, allora il contributo della pompa cambia. Se il potenziale di membrana cambia in base alla T allora mi aspetto che sia maggiore a T elevata. Nei grafici si misura il potenziale di membrana in funzione della concentrazione esterna di K a tre diverse T. Nel pannello A l'esperimento è svolto a $11^\circ C$. La concentrazione di K è in scala logaritmica. I valori misurati sono rappresentati con cerchi vuoti e le misure sono caratterizzate da un errore sperimentale, indicato con le barrette verticali. La relazione descritta dai cerchi vuoti rappresenta la dipendenza del potenziale di membrana alla concentrazione esterna di K a $11^\circ C$. Il potenziale di membrana diventa meno negativo all'aumentare della concentrazione esterna di K. Non è descritta né da Nernst né da GHK perché se provo a far passare una curva descritta da quest'ultima equazione non ci riesco. Nel pannello B: esperimento a $4^\circ C$ ottengo una relazione un po' diversa a prima, ma soprattutto l'equazione di GHK passa per tutti i punti sperimentali, a $17^\circ C$ nuovamente non si trova un valore del rapporto che mi permetta di passare per i punti sperimentali. Sappiamo che i processi attivi, molti dipendono dalla temperatura, quando la temperatura si abbassa il processo attivo rallenta quindi a $4^\circ C$ la pompa ha velocità così lenta che il suo contributo al potenziale di membrana è nullo e posso esprimere il grafico con GHK, ma aumentando la T aumenta anche l'attività della pompa; quindi, la sua attività elettrogena diventa più cospicua e il potenziale di membrana si discosta da quella attesa dall'equazione di GHK. L'andamento delle relazioni a $11^\circ C$ e $17^\circ C$ ha una forma a campana bifasica. L'attività della pompa sodio-potassio dipende dalla concentrazione di K quando la concentrazione extracellulare è molto bassa l'attività della pompa è molto rallentata e non si sente più l'effetto della temperatura.

Risposta proporzionale (A) e risposta differenziale (B)

A Recettore a lento adattamento



B Recettore a rapido adattamento



I **recettori tonici** segnalano l'intensità e la durata di un particolare stimolo (**risposta proporzionale, A**), mentre i **recettori fasici** registrano la velocità con cui l'intensità dello stimolo varia (**risposta differenziale, B**). Un meccanorecettore a lento adattamento risponde per tutto il tempo durante il quale viene applicato lo stimolo (pressione con uno specchio, A): la frequenza di scarica aumenta con l'aumentare della pressione e, dopo una fase iniziale in cui è più elevata, si mantiene pressoché costante per tutta la durata dello stimolo. Un meccanorecettore a rapido adattamento risponde soltanto all'inizio e alla fine dello stimolo (applicazione e rimozione dello specchio) ed è silente quando è lo stimolo è costante: la scarica di PdA si osserva solo durante il periodo in cui la pressione esercitata dallo specchio cambia e la frequenza è tanto maggiore quanto più rapidamente avviene il cambiamento.

Differenza fra recettori a lento adattamento (Tonici) e recettori a rapido adattamento (fasici). Dalle registrazioni si nota che i meccanorecettori reagiscono in maniera diversa ad uno stimolo. In A sono applicate 5 pressioni diverse che corrispondono a 5

deformazioni, queste sono rappresentate dall'onda quadra. La traccia sopra ciascuno stimolo è la frequenza di scarica dei potenziali d'azione extracellulari alla fibra cellulare. Notiamo che i pda rimangono per tutta la durata dello stimolo, all'applicazione dello stimolo la frequenza è più grande. In B si applicano degli stimoli tutti della stessa ampiezza, però varia la velocità in cui questo è fatto. L'onda quadra raggiunge sempre lo stesso livello ma è applicata con diverse velocità e si osserva che la scarica dei pda è presente solo durante il periodo in cui la pressione sta variando.

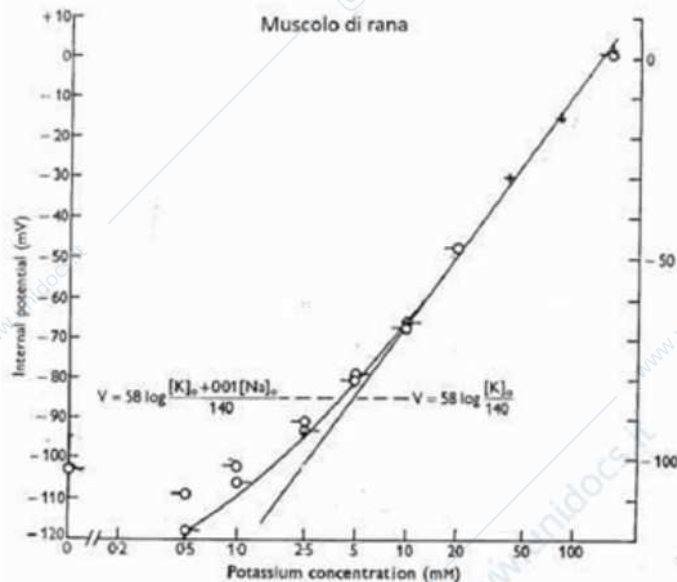
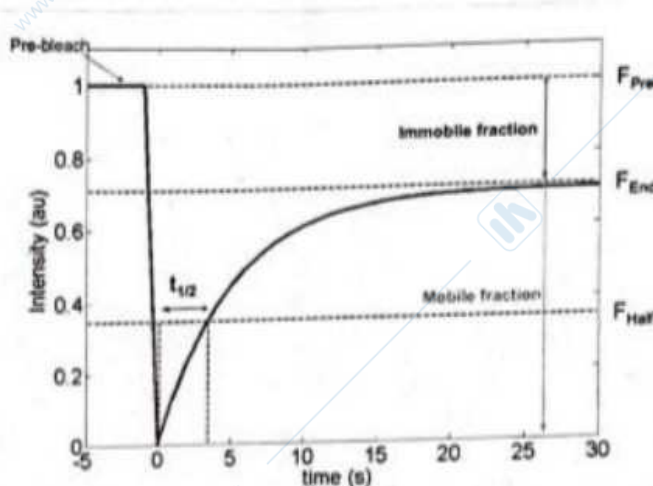


Grafico di potenziale di riposo: la retta è data dall'equazione di Nernst e non da un insieme di valori sperimentali, l'equazione definisce il variare teorico del potenziale di membrana a valori diversi di K^+ esterno. L'equazione ha validità se il potenziale reale di membrana lo si può far equivalere al potenziale di equilibrio del potassio. La curva, anch'essa teorica, esprime come varia il potenziale di membrana se vale l'equazione di GHK dove si considera anche il contributo del sodio. I punti sul grafico sono valori ricavati sperimentalmente

e si può osservare che le due curve coincidono fino a un valore di circa 10mM e simulano bene anche l'andamento dei punti sperimentali, questo significa che sopra i 10mM di potassio extracellulare posso esprimere il potenziale di membrana usando l'equazione di Nernst, questo perché a concentrazione esterne elevate di potassio, concentrazioni molto basse di sodio sono influenti perché il contributo del sodio è molto basso, se riduco la concentrazione di potassio si vede che i dati sperimentali si allontanano sempre di più dall'andamento rettilineo descritto dall'equazione di Nernst, questo perché aumenta la concentrazione di sodio e il suo valore non è più trascurabile. Dal grafico si osserva che in questo caso è la curva GHK che simula meglio l'andamento, perché considera l'apporto degli ioni sodio.



Sempre photobleaching descrizione grafico: l'intensità della fluorescenza è riportata in funzione del tempo. L'intensità sono unità arbitrarie ovvero non è il valore assoluto, ma si misura l'intensità prima dell'irraggiamento, ovvero la fluorescenza dopo il trattamento con il colorante e questo sarà poi il valore di riferimento, tutti i valori di fluorescenza sono divisi per la fluorescenza iniziale. Al T0 la fluorescenza è 0 perché è il momento in cui è erogato

l'irraggiamento, nei tempi successivi si misurano i valori di fluorescenza sempre nel punto di irraggiamento e a tempi diversi si osservano diversi valori di fluorescenza. A 28 secondi è raggiunto il massimo di possibilità di movimento delle proteine oltre le proteine non si muoveranno più. Il 70% delle proteine nell'area sbiancata è stato sostituito da proteine, resta un 30% non mobile che indica la % di proteine legate al citoscheletro.

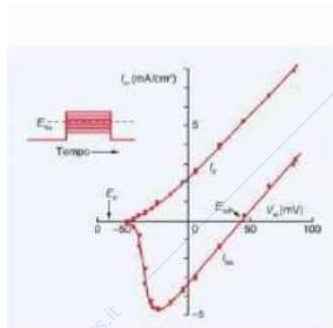


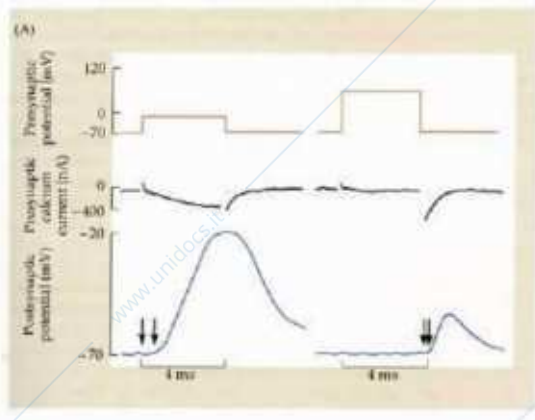
Figura 4-28 ► Relazioni I/V ottenute da Hodgkin e Huxley nell'assone gigante per le correnti stazionarie di K^+ (I_K , sempre uscenti) e per il picco della corrente di Na^+ (I_{Na} , prima entrante, poi uscente).

Nel grafico sono riportati i valori della corrente di membrana registrati in funzione del potenziale di membrana. Ho due relazioni, quello indicato con i_K e quella con i_{Na} . Quello che è riportato per il potassio è il valore della corrente di potassio misurata quando la corrente ha raggiunto il suo valore stazionario durante il gradino. Per la corrente di sodio che varia nel tempo è riportato il valore massimo, cioè quello di picco; quindi il valore della corrente di sodio misurato al picco e può essere in tempi diversi. La relazione non riguarda il tempo. La corrente di potassio aumenta con la depolarizzazione della membrana, si vede che per valori di potenziali minori di -50 millivolt la corrente del potassio è zero perché qui si registra la corrente che

passa per i canali voltaggio-dipendenti, si vuole capire cosa succede durante un pda. Esiste una soglia che fa aprire i canali del potassio, poi depolarizzando vedo che la corrente è sempre più grande, però vedo che quando io faccio un piccolo cambiamento di potenziale la variazione di corrente di potassio che registro è minore rispetto a quando il potenziale di membrana è intorno a 0 mV. La relazione è lineare per valori di potenziale sopra a -20 mV, al di sotto devia dalla linearità, la pendenza nella fase iniziale sta cambiando, la pendenza alla fine è la conduttanza quindi la conduttanza del potassio non è costante ma è voltaggio-dipendente, all'inizio aumenta di poco la conduttanza ma poi aumento la depolarizzazione e quindi aumenta la conduttanza fino a raggiungere un valore massimo, da un certo punto in poi l'aumento della corrente è lo stesso, il rapporto ΔI su ΔV è costante mentre inizialmente cambia. Quindi la conduttanza del potassio è voltaggio dipendente, i canali del potassio sono voltaggio dipendenti e quindi la probabilità di aprirsi è bassa quando il grado di depolarizzazione è piccolo, è alta quando il grado di depolarizzazione è elevato, la corrente è sempre in uscita.

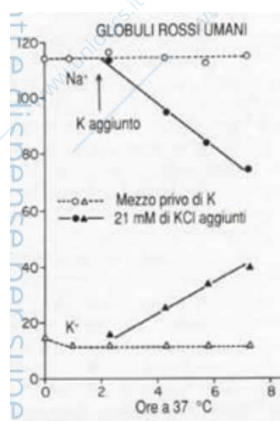
Per il sodio vediamo che esiste un potenziale soglia di -50 mV al di sopra del quale si aprono i canali, vedo una corrente che attraversa i canali del sodio. Inizialmente è in ingresso, che mostra un aumento repentino con l'aumentare del gradino di potenziale, tra -50 e -20 mV aumenta molto, raggiunge un valore massimo quando il potenziale di membrana è bloccato a -20 mV, e circa a -20 mV la corrente del sodio è sempre in ingresso ma la sua ampiezza diventa minore. Tra -50 e 45 mV la corrente è in ingresso, però fino a -20 mV la sua ampiezza è più grande per gradini di depolarizzazione più grandi dopo di che aumentando i gradini la corrente diminuisce, è zero a 45 mV (potenziale di equilibrio del sodio) e per gradini oltre i 45 mV la corrente del sodio diventa in uscita. Quando il potenziale di membrana è superiore al potenziale di equilibrio del sodio la forza elettromotrice netta lo spinge ad uscire e maggiore è il valore del potenziale di membrana maggiore è la forza che agisce su esso. Ma c'è anche la componente conduttanza. La fem all'aumentare della depolarizzazione tenderebbe a diminuire e quindi una diminuzione della corrente ma ho un alto valore di conduttanza a moltiplicare. Quando il numero di canali sono tutti aperti allora osservo l'effetto della riduzione della fem che si riduce con la depolarizzazione, la

conduttanza del sodio è diventata più o meno costante e quindi vedo una riduzione della corrente e la corrente rimane in ingresso finché la fem spinge il sodio verso l'interno, diventa una corrente in uscita quando la fem spinge il sodio all'esterno quindi questo andamento bifasico della relazione corrente-voltaggio è dato dal fatto che la fem si riduce con il potenziale mentre la conduttanza aumenta, comunque corrente del sodio e del potassio non sono relazioni lineari e mi dicono che sia per il sodio che per il potassio ho dei canali che sono voltaggio dipendenti.



L'esperimento dimostra il ruolo del calcio nella liberazione del neurotrasmettitore, questa relazione è stata studiata anche con esperimenti di blocco del voltaggio fatti in presenza di TTX e TEA per vedere la corrente associata al Ca e andare a vedere in funzione della corrente di Ca nella cellula postsinaptica quale sia la risposta a livello della cellula postsinaptica ed è stato messo in evidenza che gran parte del ritardo sinaptico che si osserva a livello delle sinapsi chimiche rapide è legato proprio al tempo necessario affinché i canali voltaggio dipendenti del Ca si aprano in risposta alla depolarizzazione della membrana.

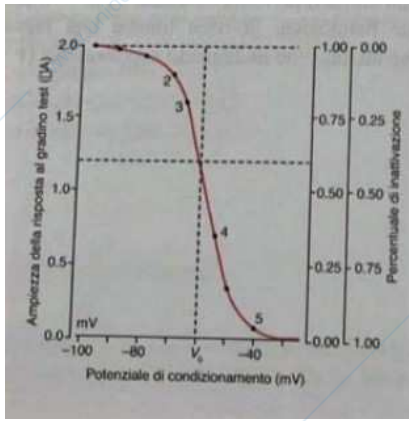
Parte destra del grafico: l'impulso presinaptico da -70 mV a -18 mV (prima traccia) determina nella fibra presinaptica (seconda traccia) una corrente in ingresso trasportata dal Ca^{2+} , e nella fibra postsinaptica, dopo un ritardo di circa 1 ms (freccie), l'EPSP (ultima traccia, risposta ON). Sinistra: una depolarizzazione presinaptica maggiore, da -70 a -60 mV, sopprime l'ingresso di Ca indicando che la sola depolarizzazione non è sufficiente a determinare la liberazione del NT. Alla fine dell'impulso si osserva una breve corrente dovuta al passaggio di Ca attraverso i canali che ancora non si sono chiusi. Questa corrente è seguita da un EPSP nella cellula postsinaptica (risposta OFF) con un ritardo di circa 0.2 ms. Il ritardo sinaptico osservato nella risposta OFF rispetto alla ON è spiegato dal tempo necessario all'attivazione dei canali del Ca.



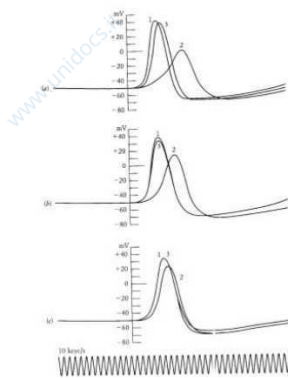
Il rapporto di scambio 3:2 della pompa Na/K è stato mostrato in globuli rossi umani. Prima degli esperimenti le cellule sono state mantenute per 9 giorni a 2 °C in modo da inibire l'attività della pompa e raggiungere l'equilibrio con la soluzione extracellulare. Le cellule venivano poi perfuse con una soluzione a 37 °C. Il contenuto intracellulare di Na^+ e K^+ veniva misurato a tempi diversi dall'inizio della perfusione. Se nel mezzo era presente K^+ , la concentrazione intracellulare di Na^+ diminuiva ad una velocità 1.5 volte più grande della velocità con cui la concentrazione intracellulare di K^+ aumentava.

L'esperimento descrive la pompa sodio-potassio che dimostra il passaggio di tre ioni sodio verso l'esterno e due ioni potassio verso l'interno. L'esperimento è stato fatto su globuli rossi umani, sapendo che i processi fisiologici che implicano consumo di energia dipendono dalla temperatura; infatti, abbassando di molto la temperatura i processi attivi vanno a zero.

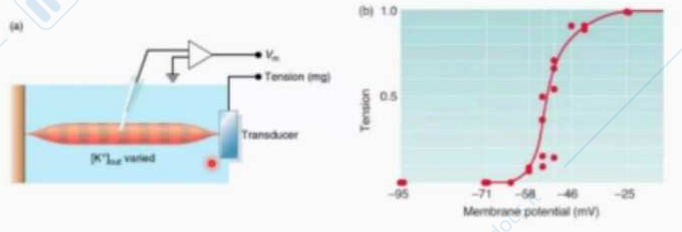
Nell'esperimento viene preso un certo numero di globuli rossi, che nel corpo stanno a 37°C e svolgono la loro funzione, vengono messi per 9 giorni in una soluzione fisiologica a 2 gradi e si vede che a questa temperatura è inibita l'attività della pompa sodio-potassio, restano solo i trasporti passivi e si raggiunge una situazione di equilibrio con l'ambiente extracellulare in cui c'è più sodio che potassio. Si eseguono due prove: nella prima i globuli rossi sono



messi in una soluzione senza potassio. Sul grafico si indica con i cerchi vuoti la concentrazione del sodio e con i triangoli vuoti la concentrazione di potassio. Senza sufficiente potassio fuori blocco l'ATPasi, quindi si blocca il ciclo, non si ha variazione intracellulare della concentrazione di sodio e potassio, la pompa non è attiva anche se la temperatura è di 37°C. La seconda prova è in presenza di potassio messo come sale KCl (grafico cerchi e triangoli pieni), nel tempo si vede che cala sodio intracellulare e aumenta potassio intracellulare, facendo il rapporto tra i coefficienti angolari delle due rette notiamo che risulta 3/2 ovvero 1,5. Questo valore indica che la velocità di estrusione del sodio è 1.5 volte maggiore della velocità di entrata del potassio.



Nel grafico la corrente test è riportata in funzione del potenziale condizionante. La curva indica l'apertura dei canali. Parte da un alto livello di apertura a potenziali più negativi e diminuisce rapidamente man mano che il potenziale si avvicina a 0.



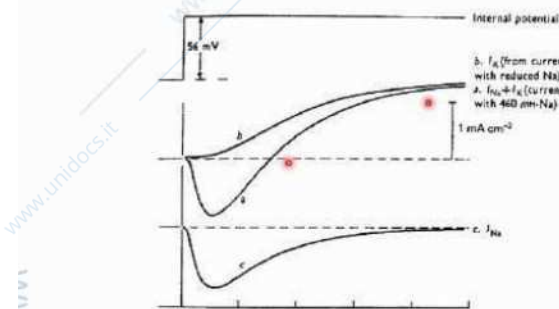
Il grafico esprime la dipendenza

dell'ampiezza del potenziale d'azione dell'assone gigante di calamaro dalla concentrazione di sodio nel mezzo extracellulare. Le tracce 1 e 3 rappresentano pda ottenuti in presenza di soluzione extracellulare normali, la traccia 2 è stata ottenuta in presenza di una soluzione in cui una parte del sodio era stata sostituita isosmoticamente con destrosio. La traccia in basso rappresenta la calibrazione della scala dei tempi ottenuta con un oscillatore ad alta frequenza. Abbassando la concentrazione extracellulare di sodio la velocità con cui si instaura il pda è minore.

Il pda non è indispensabile nel determinare la contrazione muscolare. Per ottenerla, anche in assenza di pda, possiamo depolarizzare la membrana con un aumento della concentrazione esterna di potassio che porta a un cambiamento del potenziale di equilibrio del potassio che diventa meno negativo. Il potenziale di membrana è controllato dal potenziale di equilibrio del potassio e la membrana depolarizza. In questo esperimento metto il muscolo in una soluzione fisiologica che ha concentrazione normale di potassio e registro con un micro elettrodo il potenziale di membrana e con un trasduttore di forza la forza isometrica quando cambio la

concentrazione esterna di potassio, non stimolo il muscolo e quando la concentrazione esterna di potassio è quella fisiologica il potenziale è -95 mV, poi aumento la concentrazione esterna di potassio in modo da avere vari valori di potenziale di membrana. A -71 mV la forza è ancora zero. Un certo grado di forza si sviluppa quando il potenziale di membrana va a -58 mV, cioè aumentando la concentrazione di potassio. Aumentando ancora la concentrazione di potassio cambia ancora il potenziale di membrana, da -60 a -25 mV la forza sale da zero a un valore massimo, se vado oltre -25 mV la forza non cambia. In condizioni fisiologiche la contrazione è evocata da un pda.

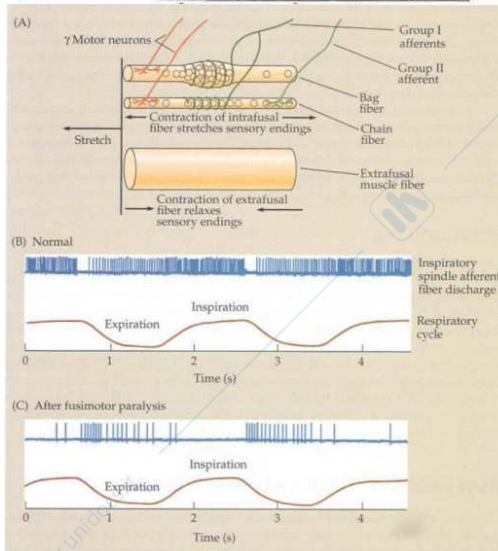
Separazione delle correnti iniziale e ritardata



$$E_{Na} = \frac{RT}{z} \ln \frac{[Na]_o}{[Na]_i}$$

$$i_{Na} = g_{Na} \times$$

esperimento fatto per separare la corrente iniziale da quella ritardata. Sappiamo che il potenziale di inversione per la corrente precoce varia con la concentrazione di sodio esterno e coincide con il potenziale di equilibrio elettrochimico del sodio. Quest'ultimo varia in base alle concentrazioni di sodio interno ed esterno. Si cambia (di solito si riduce) la concentrazione esterna di sodio e si calcola quindi il nuovo potenziale di equilibrio del sodio con



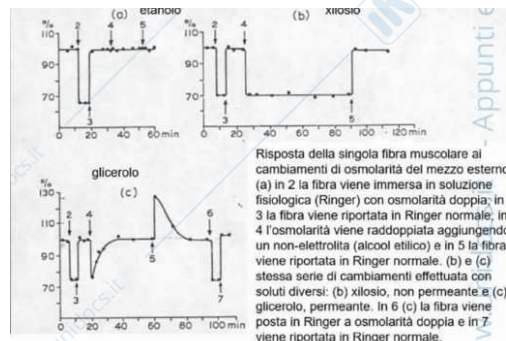
l'equazione di Nernst, si blocca quindi V_m a tale valore. Essendo il sodio in questa situazione in equilibrio, la corrente di membrana sarà dovuta al solo ione potassio (si registra quindi il valore i_K) che è la traccia b. Allo stesso valore di V_m , si ripete la misura della corrente stavolta portando la concentrazione esterna di sodio a valore fisiologico. In questo caso, la corrente di membrana I_m è dovuta ad entrambi gli ioni (traccia a). Sottraendo la corrente dovuta al solo potassio da quella totale (I_m), si ottiene la traccia c, che è la corrente di sodio a quel particolare valore di V_m (che io ho scelto decidendo una concentrazione esterna di sodio nota). È una

corrente transitoria.

I motoneuroni gamma fanno mantenere i fusi sensibili all'allungamento del muscolo. Nella figura vediamo il muscolo schematizzato con fibre extrafusali e il fuso in parallelo alle fibre extrafusali con moto neurone gamma e afferenze di tipo primario e secondario a livello dei due diversi tipi di fibre, durante un ciclo respiratorio avviene alternanza di inspirazione ed espirazione rappresentata dalla linea marrone, durante un ciclo respiratorio normale il muscolo implicato nella respirazione è il diaframma, quindi è la contrazione del muscolo diaframma che si contrae durante inspirazione e si rilassa durante espirazione. Durante questo ciclo si ha contrazione con accorciamento delle fibre muscolari del diaframma che poi riassumono la lunghezza durante la fase di rilasciamento, se si registra l'attività dalle fibre afferenti del fuso neuro muscolare si vede che la sequenza di scarica aumenta durante l'inspirazione quindi quando il muscolo si accorcia, questo è dovuto al fatto che quando si ha attivazione dei moto neuroni alfa per il diaframma si ha anche l'attivazione dei moto neuroni gamma che

innervano i fusi neuromuscolari presenti nel diaframma, perché solo se gamma allunga la porzione centrale del fuso io posso avere un aumento della frequenza di scarica quando le fibre muscolari extrafusali si accorciano.

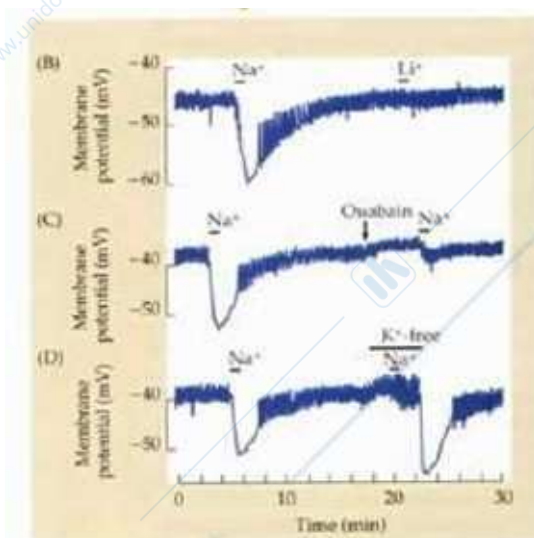
Se inibisco l'attività dei moto neuroni gamma con anestetico locale quello che vedo è che l'attività dei fusi aumenta durante l'espiazione ed è assente durante l'inspirazione, cioè viene a mancare la co attivazione dei moto neuroni gamma, la



contrazione delle porzioni polari dei fusi neuromuscolari e vedo la risposta tipica del fuso neuromuscolare allo stiramento quando il diaframma si rilascia i muscoli sono tesi e ho un aumento della frequenza di risposta quando i fusi neuromuscolari non rientrano nel processo di attivazione della contrazione, il diaframma si contrae come quando i gamma sono attivi quindi la funzione dei moto neuroni gamma è quella di mantenere il fuso sensibile alle variazioni di lunghezza del muscolo e non di intervenire

nell'attivazione della contrazione che avviene indipendentemente dalla paralisi fuso motoria che mi mette in evidenza che se non ho attivazione di efferenze gamma, la risposta dei fusi è quella classica con allungamento e accorciamento del muscolo e mi dice che durante la contrazione normale del diaframma attivo le fibre fuso motorie che aumentano la frequenza di scarica da parte delle fibre di tipo Ia, mantiene questo recettore capace di segnalare la variazione di lunghezza del muscolo.

Esperimento fatto su fibre muscolari di anfibio isolate. La soluzione isotonica utilizzata è quella fisiologica detta di Ringer in questo caso. Utilizzo 3 sostanze diverse a cui la membrana presenta permeabilità diverse. Sull'asse delle x abbiamo i minuti e sull'asse delle y la percentuale di variazione del volume. Le frecce con i numeri sono i tempi a cui la fibra viene immersa in soluzioni diverse. In tutti e 3 i pannelli al punto due la fibra viene immersa in una soluzione con concentrazioni doppie rispetto a quella di Ringer. Se l'osmolarità della cellula di anfibio è di 230 milliosmolare anche la soluzione di Ringer è 230 milliosmolare, al tempo due viene immerso in una soluzione a 460 milliosmolare. La soluzione diventa ipertonica, il volume si riduce e va circa al 60% perché c'è una certa percentuale di acqua che non partecipa che non partecipa agli scambi, io mantengo la cellula in questa soluzione ipertonica per un certo tempo e per questo tempo il volume cellulare rimane minore rispetto a quello di controllo perché la concentrazione è doppia rispetto a quella di partenza e quindi ho una concentrazione all'esterno di soluti non permeanti doppia rispetto a quella all'interno, richiamo di acqua e riduzione di volume. Al tempo 3 si riporta nella soluzione di Ringer normale e quindi il volume ritorna al volume iniziale, quindi il cambiamento di volume è reversibile se riporto la tonicità a quella iniziale. I tempi 2 e 3 sono uguali per tutti i pannelli. Al tempo 4 l'esperimento cambia: 1. Nell'etanolo. Raddoppia osmolarità della soluzione esterna con soluti permeanti o non permeanti e se sono permanenti con diverso grado di permeabilità attraverso la membrana. In questo caso alla soluzione di Ringer con 230 milliosmolari di Sali aggiungo 230 milliosmolare di etanolo, quindi all'esterno ho 460 milliosmolare. Nel caso dell'etanolo non ho cambiamenti di volume infatti al tempo 5 la rimuovo e torno a Ringer normale. Non ho cambiamenti né quando raddoppio osmolarità né quando la dimezzo, non vedo la variazione transitoria perché l'etanolo è molto permeante quindi richiamerebbe acqua all'esterno. Non vedo variazione perché l'acqua che esce è subito controbilanciata da etanolo che entra che



permea la membrana così velocemente da non determinare nemmeno una variazione transitoria del volume e lo stesso quando si rimuove l'etanolo perché la permeabilità dell'etanolo è simile a quella dell'acqua. 2. Con Xilosio. Al tempo 4 aggiunto 230 milliosmolare di xilosio con Ringer 230 milliosmolare, quindi ho 460 milliosmolare all'esterno. Il volume si riduce e al tempo 5 quando ricolloco la cellula in una soluzione di Ringer normale osservo che anche il volume torna normale. 3. Con glicerolo. Al tempo 4 aggiungo 230 milliosmolare di glicerolo quindi ho sempre 460 milliosmolare all'esterno. Il volume prima diminuisce e poi recupera; quindi quando aggiungo glicerolo a Ringer inizialmente ho

uscita di acqua perché la membrana cellulare è molto permeabile all'acqua, e se la concentrazione esterna è maggiore l'acqua sarà richiamata da essa. Poi si ha il ripristino del volume perché il glicerolo è permeabile e entra nella cellula quindi l'osmolarità intracellulare diventa più grande, si ha richiamo di acqua e ripristino del volume iniziale.

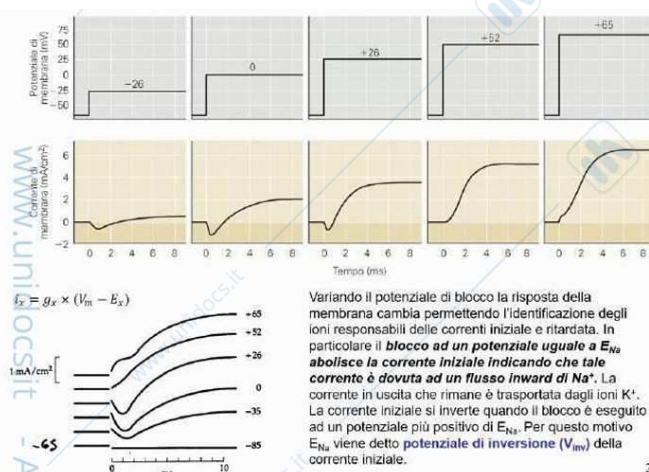
Nel caso dello xilosio la soluzione è ipertonica. In questo modo posso vedere la permeabilità della membrana senza usare elementi radioattivi.

Esperimento su neurone di lumaca per dimostrare la natura elettrogenica della pompa sodio-potassio. I neuroni di lumaca sono spontaneamente attivi, cioè non esiste un potenziale di riposo costante nel tempo, la cellula non è mai a riposo, sono cellula che danno origine spontaneamente a potenziale di azione, gli impulsi nervosi nascono spontaneamente con una certa frequenza, si registra un potenziale di membrana che cambia e dà origine all'impulso nervoso che è una inversione del potenziale di membrana. Da -47 mV il potenziale cambia e va a $+30$ mV grazie al potenziale di azione e torna a -47 mV. Si osserva nel grafico una fascia di potenziale di riposo, questa è dovuta al fatto che quello che si registra è la parte bassa della variazione di potenziale che appare come una striscia rumorosa, il potenziale di membrana poi risale ma il sistema di registrazione registra solo la fascia bassa della variazione di potenziale: ecco perché le tracce sono rumorose. Si osserva che tra un potenziale di azione e il successivo la membrana raggiunge un valore minimo che è il potenziale di riposo e possiamo considerare che il potenziale di riposo è -47 mV, nei pannelli di sotto è un po' meno negativo. Questo è in condizioni di riposo, cioè in cui il neurone non subisce alcun trattamento particolare nella sua condizione fisiologica naturale; per verificare se effettivamente la pompa sodio-potassio contribuisce al valore del potenziale di membrana nella cellula sono iniettati ioni sodio, nel neurone è inserito un microelettrodo per misurare il potenziale di membrana, sensibile al sodio e vengono inseriti due microelettrodi per l'iniezione di ioni sodio e litio. Prima si inietta nella cellula una certa quantità di ioni sodio, gli ioni intracellulari aumentano e aumenta anche l'attività della pompa si determina quindi un aumento dell'attività della pompa che provoca una iper-polarizzazione della membrana, il microelettrodo registra un potenziale che da -47 mV va a -60 mV quindi di 13 mV differenza, inizialmente la pompa aumenta l'espulsione poi via via che gli ioni sodio sono espulsi lentamente il potenziale di membrana torna al valore iniziale di -47 mV. Se viene iniettato litio nella

cellula e non è riconosciuto dalla pompa non avviene nessuna variazione del potenziale di membrana quindi l'iperpolarizzazione è dovuto all'aumento dell'attività della pompa innescato dall'aumento della concentrazione di sodio. Metto poi *oubaina*, bloccante della pompa sodio-potassio che sappiamo va a legarsi con i siti del potassio impedendo lo scambio accoppiato sodio-potassio e vedo che emtre iniettando il sodio in assenza del bloccante ho iperpolarizzazione di membrana, dopo il bloccante ho una iper-polarizzazione molto piccola che dipende dalla quantità di oubaina: se ne metto tanta potrei vedere un blocco completo del sodio. Nel pannello c vedo che iniettando sodio nella cellula in una soluzione in cui non c'è potassio, vedo che se durante la perfusione con soluzione priva di potassio inietto sodio non ho nessuna risposta, la pompa sodio-potassio opera un trasporto accoppiato quindi mi serve i potassio affinché la pompa funzioni.

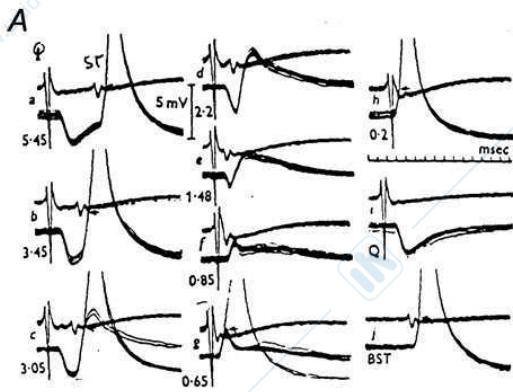
Esperimento identificazione correnti iniziale e ritardata: Blocco il potenziale di membrana al potenziale di equilibrio di uno dei due ioni che attraversa la membrana. La corrente è la conduttanza moltiplicata per la forza elettromotrice che spinge lo ione attraverso la membrana quindi quello che può essere fatto è bloccare il potenziale di membrana a valori diversi e verificare se una delle correnti è uguale a zero a uno dei potenziali di blocco, se il potenziale di blocco produce corrente uguale a zero vorrà dire che siamo all'equilibrio di quello ione. Quindi porto il potenziale di membrana da -65 mV a -26 mV, poi 0 mV, 26 mV, 52 mV e infine 65 mV e misuro la corrente e sotto la disegno. Prima la corrente precoce in ingresso e poi la corrente ritardata in uscita. Passando da -26 mV a 0 mV si vede che aumenta l'ampiezza di corrente in ingresso e lo stesso da la corrente in uscita. Da 0 a 26 mV l'ampiezza della corrente in ingresso si riduce e quella in uscita aumenta. A 52 mV quella precoce è uguale a zero e quella in uscita è ancora più grande. Dopo di che a 65 mV quella che era una corrente precoce in ingresso diventa corrente precoce in uscita seguita da una corrente tardiva di ampiezza ancora maggiore. La corrente precoce diventa uguale a 0 quando il potenziale di blocco è 52 mV, siccome sappiamo che la corrente precoce che attraversa la membrana con una conduttanza diversa da zero perché il potenziale di membrana è uguale a quello di equilibrio dello ione, 52 è un potenziale positivo che è il potenziale del sodio, quindi la corrente iniziale è trasportata dal sodio e il valore di picco è in accordo. Quando io ho il blocco a 65 mV, è un potenziale più positivo rispetto al potenziale di equilibrio e quindi la forza elettromotrice è 65-52 quindi 13 mV, è una fem positiva e quindi lo ione sodio che è positivo non entra per gradiente elettrochimico ma esce e la corrente trasportata dallo ione è in uscita. 26 mV è meno positivo di 52 mV, è più piccolo dell'equilibrio e la corrente è in ingresso perché la fem è -26 mV e il sodio entra. È stato anche visto che se l'esperimento era condotto in una soluzione priva di sodio non si aveva corrente precoce iniziale.

Nella figura in basso si vedono le registrazioni originarie sovrapposte ma in questo



caso spostate per farle osservare meglio e vediamo che a 52 mV la corrente in ingresso è assente, a 65 mV ho corrente transitoria in uscita che è invece in ingresso quando il blocco del potenziale è fatto a valori più piccoli rispetto al potenziale di equilibrio del sodio. Questo esperimento ci fa capire cosa sia il potenziale di inversione che è quel

Variando il potenziale di blocco la risposta della membrana cambia permettendo l'identificazione degli ioni responsabili delle correnti iniziale e ritardata. In particolare il blocco ad un potenziale uguale a E_{Na} abolisce la corrente iniziale indicando che tale corrente è dovuta ad un flusso inward di Na^+ . La corrente in uscita che rimane è trasportata dagli ioni K^+ . La corrente iniziale si inverte quando il blocco è eseguito ad un potenziale più positivo di E_{Na} . Per questo motivo E_{Na} viene detto potenziale di inversione (V_{inv}) della corrente iniziale.



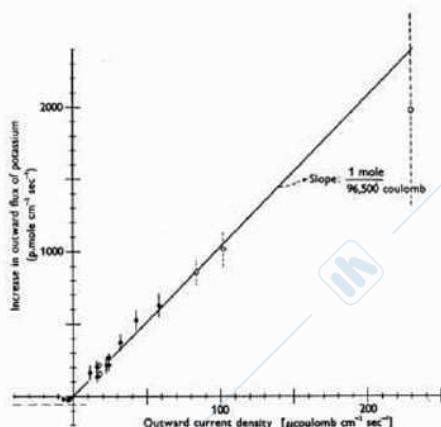
potenziale a cui la corrente che attraversa il canale è uguale a zero. In questo caso il potenziale di inversione del canale voltaggio dipendente del sodio è 52 mV perché la corrente è zero → quando il potenziale di membrana è più positivo di quello di inversione, la corrente che attraversa il canale è in uscita se lo ione è positivo, se il potenziale di membrana è più piccolo di quello di inversione la corrente è in ingresso se lo ione è positivo, quindi a cavallo del potenziale di inversione si ha inversione della

direzione della corrente attraverso la membrana.

La corrente ritardata deve essere trasportata dagli ioni potassio. La dimostrazione che la corrente in uscita ritardata sia trasportata dal potassio fu ottenuta misurando il flusso in uscita di potassio radioattivo (lo marco per poterlo misurare) in uscita quando la membrana è bloccata a potenziali diversi quindi con correnti in uscita di ampiezza diversa come nel caso della corrente in ingresso. Si fa la relazione flusso in uscita di potassio e corrente in uscita e si vede che è lineare, la cui pendenza è 1 mole su 96500 Coulomb, quindi tutta la corrente in uscita è trasportata dagli ioni potassio: una mole fuoriesce quando la carica trasportata è di 96500 Coulomb che è proprio la carica di una mole.

Esperimento che mostra interazione tra risposta inibitoria ed eccitatoria a livello del midollo spinale di gatto. La registrazione del motoneurone bicipide-semitendinoso detto BTS. Passando da A ad H la stimolazione dell'afferenza dal quadricipite è seguita a tempi diversi dalla stimolazione del muscolo BTS quindi la via eccitatoria. Si osserva inibizione della nascita di potenziale d'azione nelle registrazioni d, e, f, i: risposta alla sola stimolazione inibitoria, j: risposta alla sola stimolazione eccitatoria. In J io attivo solo la via eccitatoria. In I risposta alla sola stimolazione inibitoria, abbiamo un potenziale inibitorio che non è un potenziale d'azione quindi questa V mi genera la

IDENTIFICAZIONE DELLE CORRENTI INIZIALI E RITARDATA



frequenza di un altro potenziale. In A i numeri indicano il ritardo della via eccitatoria, 5.45 millisecondi che cosa succede al potenziale di azione? Si genera, anche se con 5.45 millisecondi di ritardo, però si genera il che significa che io quando ho mandato il segnale inibitorio tra i segnali è passato troppo tempo, quindi mi è bastato il mio segnale eccitatorio per generare un potenziale. In B abbiamo 3.45 millisecondi, accade la stessa cosa di A. In C

abbiamo 3.05 millisecondi e il risultato è abbastanza simile ai precedenti. In D il tempo diminuisce ancora di più fino ad arrivare da 2.02 millisecondi a 0.65 millisecondi, l'effetto del potenziale inibitorio è massimale. Più si va a tempi minori più il potenziale è registrato. Quindi vuol dire che la sinapsi inibitoria che abbiamo visto occupa questo

tempo qua. Da qui in poi (quindi da 0.65 millisecondi a 0.2 millisecondi) il potenziale viene inviato. Di conseguenza nel pannello A nella registrazione d'iperpolarizzazione della membrana associata al potenziale post-sinaptico inibitorio, impedisce al potenziale post-sinaptico eccitatorio di raggiungere la soglia. Mentre nella registrazione f le correnti eccitatorie e inibitorie sono in contemporanea e si annullano. In e ancora è presente l'effetto della corrente inibitoria e l'IPSP è di ampiezza ridotta, il tempo di conduzione nella via inibitoria è di circa 1 millisecondo più lungo che in quello eccitatorio per la presenza di una sinapsi in più.