

Part 1: Course Logistics and Introduction

Section 1: Opening Remarks and Course Language Okay. Thank you. Even without a microphone, without this microphone, is it okay?

Since I'm recording, I don't know the effect of this Bluetooth microphone on the amplification device. If, however, at a certain point, my voice is going to decrease for physiological reasons, I'm going to show you and I'm going to put the microphone on.

For vice-versa, I'll give it a couple of minutes because I don't know if all of your colleagues are already here. You are perhaps less than the total number, someone is missing. Do you know if someone is not here?

Anyway.

Hello everyone, I'm Michele Giugliano. The G is redundant. You will learn this because I'm obsessed with the fact that people write it correctly. Also because on Google, otherwise, there are 25,000 results if you want to have contact or search for me.

The intention would be to do the course in English. I'm not Shakespeare, you'll hear it. It's an opportunity, if most of you agree, to offer something more. Most of the courses in bioengineering and in general, in master's degrees, in *laureate*, in Italy, are in English. You can acquire passive English. I don't ask... if you have questions or comments, you can do it in English. You can do it in English. For an exam, idem. I will give you more details in a few minutes. You can do it in English. In English, all the world is in English. You can be exposed for free, not to a native speaker, *non a un madrelingua*, but to someone who learned it and chewed it up on the road, *a qualcuno che l'ha imparato e l'ha masticato sulla strada*, and you simply get more practice. You have the recordings of the lectures, maybe I will even provide the audio myself, I can provide you with the transcript, so the speech-to-text. And then you can, if at a certain point my pronunciation changes from London Cockney to Edinburgh, becomes Scottish, maybe you can give me a sign and tell me you didn't understand. We have to be together every week from now until mid-December, it will be tough, with this slog of four hours of non-stop lectures. So you can absolutely interrupt me and say, "I didn't understand, can you explain it again?"

If you agree, I'll switch to English. A technical English is not so different. Not only does the world revolve and function in English—the scientific literature is in English, the textbooks are in English—you have a quantity today in your pocket, you have all the knowledge, the PDFs of any article, you don't have to go to a library to make photocopies, and it's all in English. You have a huge amount of tutorials, of videos on YouTube, besides videos of kittens and other various nonsense, but it's all in English. Bombard yourselves, if you can, with English. It's an extra professional skill. You can have it, or not, and you could be better than your colleagues who don't have it. And it's not rocket science.

Okay, I switched to English.

So welcome. I am the coordinator of this course and I'm teaching you this module, which is called "Electrophysiological Signals." In general, please come

to me if you have problems with any other module, particularly at the end when you have to take all the exams for each module. If you have any problems or if you have any advice or criticism on how we can improve the entire course, please speak up.

Section 2: Attendance, Communication, and Course Materials So I'm going to track attendance. Please download, if you don't have it already, the app. I don't do it for controlling you; I do it for my own sake to understand whether it's true, like in the past few years, that after the first couple of classes people got scared and they stopped. No, I'm joking, they did not stop attending, but I would love to see whether also in terms of timing, in terms of schedule, this is doable for you. So at every class, I will give a different code. Today it is **9PSTK**. You put it in the app and basically, it's tracking your attendance. And I think if you send it to a colleague of yours who is not here, it will not work. Please. No problem, I don't care. It's just roughly for statistics. The same thing happened last year, so for attendance tracking, I don't care. For me, it's just roughly the case.

What I do care about, but not for controlling you, just to offer you a communication channel, is Teams. So if some of you are not yet registered, let me know. If you can join in a moment... I'll give you... I'll change the slide in 30 seconds. There is a QR code for you to join the Teams, and in principle, via Teams, we can chat. You all should constitute some sort of mini-community. You should help each other if you have questions about the content of the class and in general the content of the course. You're more than welcome to post your questions and try to help each other, but in general, you can reach me via instant messaging. So... And those who are not yet registered officially might have troubles. So if you do not have a unimore.it email address, please contact me, send me an email with your, say, Gmail account, and I will add you manually in the meantime.

So this is the QR code to join Teams. I think most of you, if not all, were on Teams. And you can do it in two ways. One is by the QR code; it should bring you directly to the Teams of the course, of this module. Well, sorry, no, it's of the entire course, but it's probably only me using it. And then otherwise, if you have already Teams installed, you can join the room, join the chat, the group, the team with that code. All of this, you have on the overhead, which I will post up front before the start of each class. It could be the day before, it could be maybe two days before, it might be five minutes before. So you will have the slides, so don't worry. You don't necessarily have to write down everything, because you are going to have the slides. And the slides are not posted on Teams, although I might say, "Hey, I posted..." We have a website for this module, which is... I'm coming to that in a moment. So if you're not a Unimore student yet, send me an email—remember the extra G, otherwise you don't find me on the internet—and you send me your, say, Gmail account, whatever, your email, because that is needed for me to add you to Teams. Please.

You Google it. You're digital natives, you should be able to search "Michele Giuliano Unimore"—it should be me. Give it a try if you don't. The only thing you have to remember that unfortunately is I am redundant. There is an extra G. So I will show you in a moment.

We have a course website, and we have a GitHub repository. Does any of you know what GitHub is and what a repository on GitHub is? It's a website where people can store files. So if I want to give you something, I put the PDF of my presentations there. Or if I want to share code, I can do it and I do it there. And everybody will, if the repository is free, be able to download the files. In the technical environment, in the technical professional sector, sometimes not only geeks but also people involved in software development, but also nowadays hardware, also in open source, also in open science, it is becoming permanent to have a GitHub account. It's your portfolio. So you're encouraged to create your own GitHub account profile. And if, whatever, if some of the courses at this university are suggesting you or requiring you to do a mini-project, for instance, you can put the code or the electronic schematics or the chemical solution, whatever, as well as your report, if you want to publish it to the world, on the GitHub repository. You can put your GitHub repository, your GitHub username account on your CV. Nowadays people are curious; not only do they find the email of almost anyone, but they can kind of see, "Okay, who is this guy or this lady? What did he or she do?" So having a web presence might be professionally something cool.

I don't remember whether this QR code is pointing to that website, which is posted on GitHub pages, or on this. So github.com is the site where you might want to be curious. It's owned by Microsoft. It has been acquired recently, and it's free for students. With your student email, you can get some sort of free account that allows you to have unlimited public or private repositories. So you can even have your private stuff there. And the website looks like this, so it's a boring website where you have several tabs. One is with just a few lines on aims, what you hope to get from this module. There is a schedule; it's almost every, every, every week on Tuesday. We still don't know the room, the logistics for the other days. I will post it as soon as I have this information. What else is on this website? There is the exact content of all the topics at the end of the semester. You may want to check on this list because this list is what I will have in front of me while asking you questions. But more on the exam later. Now I scared you with this, you say, "Oh my god, you will ask me about the definition of mobility of an ion in solution." I could, but it's a trivial thing, it's a conventional thing, as we will see possibly next week.

Not only the content, and by the way, there is some sort of chapter 0, which I'm not covering. It's about mathematics: differential equations, calculus, basically. So, derivatives, integrals. It's very brief, it's a series of brief videos amounting to, I don't remember whether it's two or three hours. Use this material, it's a refresher if you need it. I'm not a mathematician, I'm an engineer, but sometimes we will use the language of mathematics. I don't know whether you're fond of or familiar with Richard Feynman, Nobel Prize winner, a very famous physicist. He basically said, "Sorry, but nature speaks the language of mathematics." If you want to understand how nature speaks, and since we are talking about biological systems, well, you have to, and it's a natural system, you need to use the language of math. Possibly your background, I will ask you in maybe 10 minutes to tell me in 30 seconds who you are. Maybe your background is all in engineering; you should not be particularly scared about mathematics. There, anyway, you have material to support you. And at any point, even if it's something really stupid, like "Sorry, I don't remember algebra," come to

me and ask questions. I prefer, maybe during class or in the breaks, or later during office hours, that you come to me and maybe I can help you by giving an explanation. And you can maybe catch up and finally remember algebra, instead of carrying over the problem for several weeks or months and having issues with maybe otherwise mathematical parts of the course.

Not only the content, you also have resources. So here it's something where I will put some stuff: PDFs, links to videos, links to papers from the literature. I cannot post PDFs of books, of course, as you know, and I invite you never to look at pirate websites because on these websites, being illegal, you can find almost any book. And if you want to quickly have a look at some book, you should not go on these illegal websites. So this is also a place where I posted some links to tutorials, say about programming in Python, or maybe you are or are not familiar with using computers with a keyboard, with the so-called command-line interface, instead of with a mouse and a graphical user interface. We will not use it, but if you want, there are some links here. And there are also some videos that I will show you today about examples of electrophysiological signals. But the most interesting part are these two links. If you click on either of them, you are brought to the GitHub website where you see it's a sort of file system. Here you have files, here you have notebooks (and I will tell you what notebooks are), and here you have the overheads. And this is the slide that I posted yesterday and then updated a couple of hours ago to add some stuff. Okay, so this is very convenient. You do not need necessarily to reach GitHub; you can reach the website. What else is there? I think that's it. So here, Teams, I'll disable it. Before it was thought to be on Discord, but I will disable this. There is no Discord group anymore.

The Spirit, and here you might see some rambling on why online, regardless of the fact that I'm there also in the same team, but you should be a decent person, you should not harass your colleagues, and my hope is that maybe, depending on how shy or extroverted you are, maybe you can help each other. Maybe someone has a question about, "Well, I did not understand what the guy meant with this mobility of ions in a solution, did you understand it?" "Yes, look, I explained it to myself..."—I'm just thinking of a colleague of yours who might answer—"I explained it to myself as a person, as a body swimming in the sea and finding friction." If you don't talk in real life, maybe try to talk in your digital life. But try to talk, and particularly talk to me if possible. So this is the website. And the website is also reachable from Teams, which has a crappy interface, but at the top, there is a tab that I added where if you go on that tab, you go to the website. And the mathematical preliminaries and the handouts, so the slides, as well as the notebooks, are posted there.

Section 3: Practical Work and Prerequisites Notebooks are, for those of you who know what this is, but I invite you to have a look at a YouTube video in a moment, it's a sort of practice involving Python. But this is not a class on scientific computing, so I don't necessarily want you to become proficient in Python. I will show you something and we'll do it with Google Colab, so you don't have to install anything on your computer and you use Google's free cloud computing time. If you want to install something on your laptop and you have troubles because you're not a computer scientist—neither am I—but you can

come to me and say, “Look, I have troubles, I can’t manage.” I’m not an IT guy but I’m happy to help. In other universities, in the room, there would be like two or three people, sort of teaching assistants, who will be there to say, “Let me, I will do it for you, I will help you.” We don’t have that, it’s just me. And don’t be shy, you can hopefully count on me.

So this is about the mathematical refresher. I suppose, I assume you don’t need it, but it covers very basic things like what a mathematical function is, what a plot is, what does it mean if you take a mathematical function and you add something or subtract a quantity—maybe the graph is going to shift vertically, horizontally, etc. And some notable functions like straight lines, exponentials, logarithms, blah blah. Derivatives, they will be very useful, and integrals will also be very useful, both definite and indefinite. As I said, I’m not a mathematician; this is not a course in mathematics. There was something on the blackboard from a previous class that was geometry. Although we are in the Institute of Pure Mathematics, I’m not in love with mathematics to that extent. And then there are other things you might not have seen. Well, you should, being engineers. Those of you who are engineers should be familiar with the Dirac delta function, typically used in linear systems to probe the response to a pulse, and the convolution integral. Again, it’s something that you might have heard about, maybe people call it filtering, but it’s the same thing. And again, differential equations—only one differential equation, what I will call over and over the only, boring, typical, usual differential equation that I would love you to get acquainted with, and it’s this one. Say this is a function of time; it’s this one, maybe plus something. This first-order differential equation, the coefficients are constant, and I don’t ask you whether you remember what the solution is. I only invite you to refresh your knowledge, not mnemonically, but just by understanding it and reading aloud what it is. It says: what is the function f —since differential equations are equations where the unknown is not a number like in an algebraic equation, but it’s a function, so it’s a collection of... well, it’s a rule, it’s a mapping, it’s not only a collection of numbers—what is this function that when you take its derivative you get the function itself? There are also some memes on the internet where there is a function that no matter if you differentiate it, it just stays the same. Only geeks... do you remember which function this is? It’s the only function that is worth... yeah, I like the exponential. Exponential, yeah, indeed. I thought you said logarithm, $\ln(x)$. No, it’s the exponential, perfect. So you don’t need it, but we’ll see even during some parts of the course where I’m going to derive some mathematical formulas, I’m not going to assume that you are very skilled or at ease with mathematics, hopefully.

So there is no guarantee... I thought that maybe that stuff over there was a camera, but it’s not a camera, so I brought my own cameras and I’m trying to record with my own microphones. Hopefully, it will work. Sometimes there might be some glitches, so there is no guarantee, but after... so I’m not streaming, I’m recording, and at the end... let me check that I’m recording because otherwise... yeah, I am... otherwise, it will be disastrous. And maybe the day after, a couple of days later, depending on when I can upload the file to YouTube, you will find it on this channel. There will be a playlist with the name of the course. But again, I hope so. Last year, nothing happened. You never know, the computer, the battery, everything can go wrong. Sometimes I might forget to... well, in

this case, it will not happen because I changed the setup, but say I might... you will only see my face and not the slides. You do have the slides, so it's not the end of the world. And maybe you don't see my face, and okay, fine, you can survive not seeing my face.

Section 4: Class Structure, Exams, and My Teaching Philosophy

Okay, practicalities. Classes are in person, slides, and chalk. I hope they are interactive, really, I mean it. I don't give a damn if you ask a stupid question. I don't care. I forget. I really don't care. I will not remember at the exam, saying, "This person..." No, I honestly don't care. I have other things on my mind and I cannot read yours... I cannot read your mind. So I have some experience from many years of teaching, so I can see whether you are completely blanking and you're brain-dead. Right now, maybe a little bit scared, but not yet. So if you don't speak, I cannot help. I cannot try again, being clearer, explaining myself in a different way. So I ask you to be interactive. And of course, it will be boring if I have to talk for four hours straight, although there will be breaks, don't worry. And I will propose there are some alternatives for breaks depending on what you... what you do. So I don't mind stupid questions. And again, if you need help, maybe you're shy to ask in front of your colleagues. It's normal, everybody, to some degree, is shy. You can contact me. And even if you have some problems with whatever... okay, not your personal problems hopefully, but if you have interests or if you are passionate about something or if you realize that you don't know about something else, ask. I'm happy to help. In principle, that's my main job: to transfer knowledge. And so if you want information about some topic or even in general about bioengineering or about neuroscience or about neuroengineering, come to me.

So handouts, I told you, they are made available to you upfront. Videotaping, hopefully. For all of you in the class, if the slides were the only things required to pass the exams, then I would basically be better off staying at home, and you probably as well. So I'm going to add more stuff, and you can stop me. And I'm not, say, super intelligent or super knowledgeable, but I know a little bit and I can tell it to you, and particularly by reacting to your questions, there might be way more stuff than what's on the slides.

So the hands-on, there will be some practical parts just to make your life a little bit more interesting, hopefully. It doesn't need to be... I mean, you can listen to this stuff completely passively. Again, you don't need to install anything on your computer. I would maybe suggest those of you who are really interested to do that, and it's about installing, for instance, Python and some distribution of Jupyter. I don't know whether you know what this is, but otherwise, if you don't and you only want to use a web browser because you only have, say, a tablet and you don't want to bother, you can use a website which is hosted by Google and it's free to some extent. It's called Colab. And of course here I don't have any notebook to show you. It's some sort of web interface where you can use their computers to crunch numbers, to plot functions, to plot data. And you also can mix text, code, which is not around, which I don't see the code here. Okay, here it's code, whatever it is. I'm not particularly familiar or fond of Python, but okay, so this is Python code and this is a plot. So on the same document you have text, explanations, annotations, code, and the result of this

code. This is becoming a common practice in general in science where people are not only giving you the data—so a few years ago they were not even giving you the data. “Here is the paper, study the paper, trust the authors for the results.” No, today, hoping to have reproducible science and research, we give you not only the data that we acquired, say in an experiment—say plugging myself into some electrodes in a moment, although it will not work—and then not only give you the data, I give you the code that I use to analyze the data and I put it on the same page, really for dummies. For dummies in the sense that it doesn’t require people to install stuff on their machines and hopefully it will possibly be reproducible. A few years ago, there was this image of the black hole that was reconstructed by means of algorithmic means. Probably you all remember this sort of donut, it’s a sort of *ciambella*, it’s red with a hole in it. And that was the first image of a black hole. They gave the data and they gave what they call notebooks, so this thing, to people together with their publications. This is what the hands-on parts are, and these notebooks are already posted, all of them. If you want to be curious and you want to sneak a peek, they are on the GitHub repository in the folder called “notebooks.” And again, for prerequisites about math, coding, and particularly biology, which I suspect you might not be ultra-strong in, ask. There is some material for the next, not necessarily for the next week but in general for the next couple of weeks, that I posted. It is on the GitHub repository and you’ll also find the links. It’s some reading material that you may or may not read. It’s not something that I will ask at the exam, but it’s something that you will need if you feel weak in terms of biology, neurobiology in particular. So on these slides, I gave you the link to that YouTube video from a guy, a blond guy if I remember, that in like two or three minutes explains what Google Colab is, what notebooks are. And this was the solution that I... so the alternative... so if you are in between, if you’re not completely scared by computers and so you use that, and if you’re not a computer geek that you install your own distribution of Python using Anaconda or virtual environments with UV or pip or whatever, then this is intermediate. And it was a standalone application that you could download on your computer to have, on your computer, your machine, the same thing that’s over there in the cloud. It was called JupyterLab Desktop, and a few months ago they stopped developing it. So it still works, but I don’t know for how long. You may give it a try. When you download it, it downloads Python inside itself. And so you have Python on your computer encapsulated, wrapped inside this software. This is because installing Python may not be entirely trivial, particularly if you have, say, a Mac or if you’re on Windows where there are also another series of complications. If you are using Linux then you probably are sleeping now because you’re supposed to be more expert about installing stuff.

So the exam for this module is an oral interview, informal. I don’t like quizzes, I don’t like written tests, because I’m not there to help you. If you go blank because you’re getting emotional, you don’t remember things, I’m not there to see, “Okay, okay, good, I want to help.” And maybe you need just a bit of information just to restart. It happens all the time, it happened to me as well. I hated particularly the closed-answer questionnaires. This is humiliating to me. You have to be given time, 20 minutes, half an hour, that I’m sitting there and I listen to you while you recreate on a blackboard in detail what I do or present to you during the class. And the overall... I will show you the statistics

in a moment, although it's based only on last year, but it's still something that you might be interested to know. So the final score is the score of individual modules, and it's weighted by the credits, by the CFU. So depending on how many credits, the score, the mark that you get in one module, has a bigger weight. *Cum laude* means that you have to get 32 out of 30 in total, although in my module I gave several *cum laude* last year. And we round to the closest integer. So we don't look at the ceiling, the integer that is approximating by excess or by defect by floor. We just use the closest integer. And it requires, you cannot skip any module, and you're supposed to complete the entire thing in 24 months, in two years, which is reasonable. So for the moment, since it's basically the start of the second year, we don't know, there are only two or three people out of 20, if I remember correctly, who did not complete all the modules. They are missing mine or another one, I don't recall.

So statistics from the past. So that's the average mark. So I think that you can lower your anxiety, particularly because I was told that you are quite smart. I don't know, other lecturers had a good impression and I'm curious to interact with you, just to learn from you. So you see I'm not particularly strict and all the people were good. And one out of three got *cum laude* because they were interested, not because I gave it as a gift to them. And overall, across all the modules of this entire big course, you see the final mark was not particularly low. And so this might lower your anxiety.

Exams and exam sessions. I think I will have six sessions of exams in January-February. I did not manage to add them yet on the ugly online platform called ESSE3, which is very crappy, but that's the only thing. And I will ask you to register with great advance, maybe during the month of December you decide when you want to take your exam, my part, just my part. And you see there are 12 slots a day and there are... 14 from 8:00 in the morning until 1:00 p.m., one after the other. It takes the time that it takes. Unless you're really abusing the time, I will stop you. So if we go 40 minutes instead of... so I will try to be fair, so that all people get 20-25 minutes. So I will try to be fair in that respect. I cannot add sessions in June or July yet, but you will see it's plenty of opportunities. And exceptionally, you can contact me and we can schedule one appointment on a day that you want if this is fulfilling some sort of need. I would love to avoid having this as a rule because otherwise, you will say, "Okay, maybe today, maybe tomorrow, what do you do tomorrow? Can I do the exam?" and maybe you don't show up. If you register, if you contact me, then you must show up. I will not fail you if you don't show up, but as I'm going to help you, you help me not blocking time.

Now for the... I know that you finish the previous class at 1 p.m., so you have only one hour for lunch. My preference is to start at 2 p.m. sharp and finish a little bit earlier—well, 50 minutes earlier, but better than nothing. But it's your call. The alternative would be that we can even start at the famous academic quarter of an hour or even at 2:30. Of course, we would then exceed because I need the amount of hours. And the idea is you can think of it, you don't have to... we don't have to decide. Well, today we started around 2:05, and you tell me what's your preference. Maybe make a poll, make a Doodle, do whatever, and let me know.

Breaks. Normally I do, because I'm used to it... I taught for 11 years in Belgium

to students of several curricula, but they were not bioengineers like you are. And they were a bit intimidated and they were going blank after a while. So the style was that I was stopping, like I'm planning to do today, every 45-50 minutes for a 10-minute break. A 10-15 minute break. We will do three of these breaks. Maybe you have a stronger stamina, I don't know. There are alternatives. We could only stop after one hour. Probably I cannot do four hours in a row, but a couple of hours I can do. I can do it, particularly if I get... you will see some topics will get me excited and I hope that I can at least pass this enthusiasm to you, or at least that you learn, "Okay, this topic is cool but I don't care and I don't want to do this in life." Fine. For me, it would be a success to tell you what you might or might not be good at, or might not be passionate about. So that's another possibility, that we only do one break. For the moment we have another 10 minutes to go and then if you want, we'll break. Otherwise, you let me know. When the timer rings you will tell me whether you want me to continue for another, say, 45 minutes or you want to stop.

Part 2: Instructor and Student Introductions

Section 1: About Me, Your Instructor So I'll tell you a little bit about myself. I'm an electronic engineer by training. At the time I studied in Genoa, I started in 1992, which seems like a really long time ago, and there was no bioengineering, there was no biomedical engineering, but there was already some sort of specialization that was biomedical engineering, and this was what I took. I'm very proud that I did not take some classic exams as engineers do, like economics and construction science, because I didn't care, and I wanted to study biology. I wanted to study some topics that I chose. At that moment it was bioelectromagnetism, and there was another one that was bioelectronics. I wanted to do that. That seemed to be the future. And indeed, that's the case. But it's me. That was me. Then I continued with a PhD, a doctorate in Genoa, well in reality it was in Milan, but it was under the supervision of a pioneer of bioengineering and neuroengineering in Italy, the late Massimo Grattarola. And I basically did a PhD in bioengineering and it was basically about computational neuroscience, which is a discipline related to using models and computers to study the brain. And then I left Italy. That was a very good decision. And I regret that I'm back, but that's another story.

So I did my first postdoc, which in the academic trajectory is what you do, you continue doing research. And I did it in an institute of physiology at the Faculty of Medicine in Switzerland, in Bern, at the University of Bern. To joke, I say that I was looking for the best chocolate. In Genoa, although it's not Liguria, there is this Novi Ligure chocolate, which is still my favorite, but I wanted to try other things. So Switzerland was a clear step to take, so I did that. And then after a few years, I moved to the Swiss Federal Institute of Technology, the EPFL in Lausanne, which is a terrific place. I was a group leader and both during my postdoc and my second postdoc I was doing experiments myself, doing electrophysiological experiments. So that's why I'm here to tell you about electrophysiological signals. And I'm particularly interested in cells, not the entire thing. So I will try to show you something, but it will not work, of course, but I'm more intrigued by the mechanism, in the same way that transistors in this device are sort of microscopic units that determine the

computational features, the properties of the device. Then I moved to Belgium, so the other step for chocolate is Liguria, which is Novi Ligure, it's not in Liguria, but anyway, so Switzerland, then Belgium, although Belgian chocolate, I don't know whether you know it, it's a bit complex. It's not plain good or bad, it's with stuff inside. It was not my thing, but I stayed there 11 years, 10-11 years, and I was a professor of neuroscience. And then I came in 2019, just in time for the pandemic and for the lockdown, as a professor of physiology at SISSA, that is like Scuola Superiore di Pisa. It's special, it's only a PhD, research-intensive institution. And in 2024, I joined Modena because they wanted to, and they did, start bioengineering, and as you know, there was no bioengineering before. So I basically... this is my trajectory.

And as I said, I'm intrigued by the mechanisms, particularly of cells and nerve cells that we will have ample time to talk about and to discuss. They are electrical devices, and to me, it blew my mind as a student, more or less... maybe I was one year younger than what you are now, to learn from a professor that not only were they electrical devices, they were sort of generating signals very fast. This is one millisecond, and on the y-axis... it's a picture from an oscilloscope in the old times. You were not able to record the data with an analog-to-digital converter like this one that is now very small and conveniently attached to a USB cable. At that time you were taking a picture on either a paper recorder or an oscilloscope. So very brief, one millisecond, and about 100 millivolts. That's the amplitude of a nerve impulse. And 100 millivolts is 0.1 volts, and it's not so different from what the internal voltages of a microprocessor are. Maybe you're familiar with your power plug which is 5 volts, or you maybe know if you play with electronics that some stuff is powered by 3.6, 3.3 volts, whatever. Modern microprocessors have internal voltages that are even smaller. And there you eat a banana or chocolate and you fire that. You don't need a small nuclear plant like ChatGPT does. So this blew my mind, and the other thing that blew my mind was that it was possible to write equations. And it was, for me, amazing. How could you study biology with mathematics and physics and chemistry? Well, after all, it is physics, chemistry, and mathematics, so it may not be surprising, but to write an equation that maybe can describe the electrical activity of neurons, maybe one neuron or a network of neurons, really inspired me a lot. And so that's why I basically got into this field, with the dream of understanding how the brain works—of course, this is still a dream—and to make some sort of difference or to sort of bring some positive things in, say for patients, for patients with neurological disorders.

And again, I'm intrigued by cells. These cells that you see here have been filled with a dye. They are from the cortex of a human, but no students were sacrificed at that stage. It was from a patient, and they are called pyramidal cells. They are called pyramidal cells because their soma resembles a pyramid, and you see a lot of cables. Nerve cells are cables; they have a lot of wires, and this is impressive. And when you look at this, you will not see exactly this image under a microscope with living tissue. It's remarkable how dense this network is. And if you open an electronic device, maybe you should try at some point to break something and open it, because nowadays the printed circuit boards are very complicated. You will see that there are a lot of cables, a lot of leads, a lot of contacts. And one of the famous, well, the most famous neuroanatomist that studied these cells was at the end of the last century, or sorry, at the

beginning of the last century, around 1901, 1905. He was from Spain. His name was Ramón y Cajal, and he looked at this and he understood and he got it right, that these things are kind of fetching inputs from there, and something that you don't see here, there is another fiber that is bringing signals out, and that's the output. And the guy, just by looking at these images, understood the function, well, understood some features of the function, which is remarkable. But the reason why I thought of telling you about this is because he called them the "butterflies of the mind," of the brain. And indeed, they are beautiful, as opposed, say, to sperm cells that are the example of minimalism. They have nothing, it's just a cell body and a tail to swim. These guys are baroque, they are so complicated and they reminded him of trees. So particularly all of this branching and bifurcations, like trees. Unfortunately, we don't have windows to look outside; there are trees. Next, as you go out, have a look at trees. In that case, trees are bifurcating, are branching, probably to fetch light, to expand the surface to fetch light. Over there, maybe these cells are expanding to fetch inputs. And over there, it's the top where my hair is, so it's called layer one, or the pia mater, which is one of the dura and pia mater. It would be what is immediately below the bone, below the scalp. And what you have here is the white matter, which is kind of in my ventral part. And so somehow this guy is having this sort of fiber which is called a dendrite, from the Greek word for tree, *albero*, *dendros*, and then it's kind of towards the top, it's bifurcating, it's branching to fetch inputs.

What do we want to do? We stop or we continue? For me, it's the same. Just don't be shy, I'm fine whatever you say. Who wants to stop? So let's stop. So we come back in 10 minutes. Thank you.

Section 2: My Research and Student Introductions So, I lead a laboratory, an experimental laboratory, that you're welcome to visit if you're interested, upon appointment in the coming months or even next year, whenever you want. And we do three things, we combine three disciplines. One is experimental neurophysiology. So we want to study *logos*, the physiology, the functioning of nerve cells, or the electrical function of nerve cells, and we do it experimentally. And then we also use mathematical models and physics and computers to make sense of the data that we record, as well as to make new experiments that involve a computer. We do hybrid circuits where some part is a biological neuron, some biological cells, and some part is simulated cells. And I also work at the interface with neurotechnologies, so nanomaterials or non-conventional tools such as optogenetics. Did any of you hear about optogenetics? I will tell you what it is. In a few years, I'm pretty sure they will give a Nobel Prize to these two people, two American scientists. They invented a way to make a protein that normally real neurons do not express—well, they express it in the retina in some cells of the retina—and you shine light with a laser beam... I do have it, this... well, it's not really a laser beam... hello, yeah... so you shine light with a laser beam literally and non-invasively you are able to excite or inhibit the electrical activity of a cell. Imagine that you are suffering from seizures, we will probably discuss it later today, and you have a seizure that means a very sudden, highly synchronized electrical activity in your brain. In principle, I could shine light with a fiber optic and I could switch it off. It's not yet reality but they will get the Nobel Prize. So today we don't use it for therapeutic

reasons, we don't put it in the faulty retina of blind patients to restore... well, somebody does and they were successful in restoring vision, but we use it as a way to probe cells and circuits and networks because we can interrogate by stimulating or inhibiting just in a non-invasive way. Imagine literally I can have a laser beam and I can move it to different positions, so I can excite this neuron here and I can maybe inhibit this neuron there, but I will tell you in due time, I will tell you more.

Now you tell me... okay, first, before asking you to tell me about yourself in 30 seconds, in my free time, when I have free time, I'm a geek and I'm particularly intrigued by radio transmissions. And I... it's now a few years that I'm trying to learn... it's a stupid thing because you never heard of it, but it's all pedagogically thought out, so you will see that it makes sense. One of the reasons is that I'm fascinated because the way neurons encode information is clearly not by a man-made code, but they do it in a way that seems to depend on the frequency of this nerve impulse. Now I have no idea whether in the cars, say of your parents or your own car, you still have something that is called a radio. When I was younger and even today I have a radio and the radio had two bands, so it's not only podcasts and not only Bluetooth connection to a device, but you could literally hear radio transmissions from a radio DJ or whatever. And it's FM instead of AM. Have you ever heard of this? So AM, maybe those engineers among you who studied electrical communication, they might even have studied the nitty-gritty of it. So with amplitude modulation, the carrier, which I won't tell you what it is, is modulated by the information content by changing its amplitude. Now for a nerve impulse, it seems this is not the case. All the nerve impulses have this 100 millivolt, 0.1 volt amplitude, but what changes is the frequency, like in FM. And in fact, you know that AM is sort of noisy, sloppy. I don't know whether you ever... if you have a radio, try to put it on AM and you will hear a lot of noise. Instead FM, when you are on the right frequency, the quality of the sound is very nice. So encoding information in frequency is more robust in terms of signal-to-noise ratio. And maybe this is not a surprise that my foot is controlled by some neurons in my motor cortex by frequency modulation. And instead in my retina, where the distances are very, very tiny, very small, neurons also communicate by amplitude modulation. It's not really the nerve impulses and other things, but this is very interesting. That's why I'm a geek, because I take things from work home and vice versa. Maybe it can be of interest.

Each of you, I would love to hear for 10 seconds who you are, what is your background. Some of you already told me that they are not engineers and I'm fine, actually I'm very happy that there is diversity. I hope that the engineers among you will help those who are biologists or physiologists and vice versa, the physiologists could help the engineers who might be ignorant in other things. And why bioengineering? That would be very interesting. And if you don't know why, that's fine. I did not know for a while what to do in life, for many years, even during university, and so that's fine. And if you want, what do you do in your free time, if you do sports or whatever. So please, let's start like this, otherwise you will... you will have a start. I don't care, even if you can do it in Italian, in English, whatever, feel free.

Thank you. I can't. Thank you. Chocolate? No, just kidding, just kidding.

Thank you. Thank you. Thank you. Thank you. Yeah. Thank you. Thank you. Thank you. Thank you. Thank you. Thank you. Okay, thank you. Thanks everyone, I really appreciate it, you're a tough crowd. So I hope to work well with you and that you can find interesting ideas in what I tell you.

Part 3: Study Materials and Course Structure

Section 1: Recommended Reading Okay, so as study material, there is one book that covers most of the topics. Of course, it does it in a very structured way, not necessarily in the way that I will follow, but it's the first one. And I think I ordered... well I think, I'm pretty sure I ordered at least two copies last year and they are available in the libraries. Do not attempt to find it on PDF on illegal websites, but sometimes some of the books are good to have, and so that one is a nice book. It is authored by a series of researchers, particularly one from Norway. And of course, I forgot the name of... Okay, it will come to me. So he's a pioneer, the last author of that book. Gaute Einevoll is a pioneer on some of the techniques that we will also discuss later on, the extracellular signals in the brain.

There are other books that you can look at. So these are classic books for... and again, I wrote chapters, so it doesn't... I don't mean from chapter 1 to chapter 20, and some of the books are really, really... it's a sort of Bible. So this is the Bible of cell biology. It's really a tiny big book and it has a lot of details. Same as Kandel, Schwartz, and it has now other authors, possibly it's not 2012, but it's *Principles of Neuroscience*. It's again a Bible and it's only for references. This is a light introduction to neuroscience and the first four chapters might be useful for those of you who are not necessarily that familiar with the biological aspects. And *From Neuron to Brain* by Nicholls et al., 1996, is about... it's a two-volume book and it's about biophysics. Again, not the entire book would be required, but you will find the content of the classes over there.

There are a few things, a few readings that are available on GitHub as well as linked on the website as PDFs. So one is just a few pages... for those of you, probably you don't use it anymore and it's not a thing anymore. When I was a student in high school, there was a company called Bignami and they were making very tiny booklets for Latin or history or philosophy, whatever. So this is a sort of Bignami. So it's very condensed and it's an immensely incomplete summary, but in two pages, it tells you what a neuron is, what a synapse is, what a receptor is. You might want to just have it, to use it, and I think it's just maybe two or four pages, if I remember correctly. This is more blah blah, it's not even aimed at students, it's for the general public on brain facts, and it's an introduction on the... a little bit on the working of the brain, particularly the early parts that are not dealing with behavior. Of course, you can read it, you can read all of it, but for the topics of the course, only the first couple of chapters are relevant. And then there is also the entire PDF, because it was put in the public domain by one of the Nobel Prize winners of several years ago, I think it was in the 60s, Hubel. Have you ever heard of Hubel and Wiesel? I will show you later what they did. So this guy wrote a very tiny book, very high level, very, say, science communication, so it's not a technical book, called *Eye, Brain, and Vision*, and it tells about the part of the brain that we understand

the most. And for me, as a student, it was a very nice primer, a very nice introduction to the neurobiological concepts that came up over and over again. So you might find it relevant. You don't have to study it. I'm not going to ask about material from these things. They are readings for you. You should be selfish. You should study for yourself, not for the exam. And as you could see, the exam at the end is not going to be impossible to pass. You should now try to study for your own professional life, not as a strategy to pass the exam. There is no point if you study just to pass the exam; in a matter of a couple of weeks after, you will forget everything. If not, if you study for yourself, maybe you will learn and remember things for your lifetime.

Section 2: Practical Data and Demonstrations So, what I will also do, because the demo that I would like to attempt now in the next 10 minutes will not work for a series of reasons. The last one is that I had the bad idea to rehearse it last night. And as those who have experience with electronics, they know the term "magic smoke." "Magic smoke" is what happens at some point when something burns and you see smoke coming up out of electronic circuits. And so I don't think it will work. And there are other reasons that I will tell you why it will not work. But you have data on the GitHub pages, as well as you have a notebook that I will invite you to play with. "Play" means you load it into Python, you plot it, and maybe then it's up to you. You can do the Fast Fourier Transform to get rhythms in these traces, although they are crappy traces. It's something that I recorded last year. And another thing that you could say, being an electrocardiogram, there are peaks. It was my electrocardiogram from last year. Maybe you could find a way to count how many peaks there are, but we will see that later. So, you even have a YouTube tutorial that will sort of illustrate this notebook. This is not compulsory. I encourage you to do it. Again, if you don't do it, I don't care, but it has been done just to pique your curiosity. But let me skip this for the moment. Where is the demo? I want to do the demo now. But okay, first I have to talk about frogs, otherwise I cannot say whether I am like a frog or not. Okay, so maybe we do, say in 10-15 minutes we'll break, and then we'll do the demo later on.

The demo has a little bit of a component of risk, that's why I'm not asking any volunteer to be plugged in, because in principle, and maybe I will ask for your help in the future, everything could be working with a battery, because I could disconnect the power supply of the computer, and the computer now is standalone. But the computer, unfortunately, because of the video projector, is attached to this HDMI cable, and that one is a source of potential risk, because the ground of this cable, the reference electrode of this cable could be floating, so I could electrocute myself. I hope it doesn't happen, but I don't want to electrocute you. It would be one bioengineer less, so it could be less competition, but it will not be fair to do this at the university. And this may not electrocute me, but it will create a lot of noise. You will see how bad noise is. So, I'll talk about signals that I'm going to show you, maybe, or maybe not. And I'll talk about noise.

I ask you, what is a signal? What is a biological signal? You have the slide, so you can read what the slide says. Do you have any suggestions? Some of you have been already exposed to signals. I don't remember who, but you told me

that you did data and signals. So you should be familiar with this definition, a rigorous definition of signals that maybe you will see again, you have seen it in the last couple of days, from my colleagues. But I would love to set the topic on what is a signal. What do you think is a signal? What could that be? Thank you. Perfect. And this series of data points, maybe they could be in time, assuming that my heart beats, and at some point now and half a second later, and half a second later, I might record a different kind of distribution of electrical potential. Or it might be a set of numbers that are changing in space like an image, like an fMRI—well, fMRI would be in time as well—let's say like an MRI scan. There will be an image, it's a collection of... it's a bi-dimensional collection of numbers. In every coordinate (x,y) you will have one number, for instance, like this image. So that's correct, thank you. So it's a physical variable, it's an observable perhaps related to a biological system that is subject to some sort of variation. Otherwise, it would be boring, it would be just a value, it would be 26. 26 what? 26 millivolts maybe, or let's say minus 70 millivolts that will come over and over. It will be boring if it's always minus 70 millivolts. If it changes over time, that might be interesting. Maybe you're alive or maybe you're dead. At least I can tell whether you're dead or alive. So variations in time or in space. And it can be represented analytically by some formula, a mathematical function, but it does not need to be. The story of introducing or reminding you of the concept of the function is because a function is a really interesting mapping for mathematics that says from this value of the input, the independent variable, you have only one number in a scalar function. So at this moment in time, the temperature here is probably 22 degrees, only one. And so the independent variables could be one or more; if it's the plane of an image it could be x and y , if it's time it's one. And if the function is not scalar but it's a vector function, maybe at this moment in time I'm getting the oxygen concentration, the temperature, and the heartbeats. So it might be multiple, might have multiple dimensions. Something that... all concepts... this has been discussed in mathematics 1000 years ago, so they were useful even before inventing any device to measure these signals.

These are known functions, mathematical analytical functions like the exponential or a sinusoid. By the way, if time is measured in seconds, what is the frequency of the sinusoid? You know? Or the period? I wrote it in this way because for many years at the university people told me about sinusoids, sine and cosine. Okay, but if I want the sine of 20 Hertz, how do I write it? So T is in seconds and you probably know that inside this function, things have to be without physical dimensions. Well okay, yeah, π is in radians but it's not really a physical dimension. So here inside, a physical unit cannot survive. It cannot be time. I don't know what the sine of 23 seconds is. It's like an exponential of three apples—it doesn't make sense. I don't know. So this 0.1 is the value of the frequency, it's 0.1 Hertz, which is 100... so it's one... so it's 10 milliseconds... so sorry, 100 milliseconds. Anyway, this collection of data points might also be collected in a file on a disk or on paper or on an oscilloscope. It does not require to be described analytically by a mathematical function. And so these are some examples of scalar functions, like electromyography, that maybe is the only thing that will work. I will try to see whether I can get electrical activity in this muscle. Music, so a voice recorded, now it only has one channel, it's not right or left, it's not stereo, so at every moment in time I'm basically

sending via Bluetooth just one number that is the intensity of the sound. A black and white photo is another scalar example of a signal because you have two independent variables, but for each x and y you have one value that is the brightness, the gray level. If it's black and white, it is only one level. And there are other examples. So if it's a vector function, it might be some sort of observable of a fly that is moving around, and at every moment in time, I can measure the instantaneous velocity. And the instantaneous velocity might be a vector, talking about some direction, some intensity, and some *verso*. So, some direction and intensity. So, it's vectors, you know, that might be described by three numbers in a Cartesian system. So, for every moment in time, I have three numbers. That's the meaning of a vector, sorry, a vector signal.

Section 3: The Historical Roots of Electrophysiology Now for the specific case of electrophysiological signals, it's very interesting and intriguing. I don't know whether you have watched this silly little talk that I gave a few years ago at a science festival. We owe it to... so the entire field of electronic engineering, of electricity, of electromagnetism is actually due to people who embarked on measuring electrical phenomena in biological systems, which I find surprising. And probably you know that these two guys, two Italians, were considered the fathers, the pioneers, and particularly Galvani was the one that just by chance found that there must have been some sort of "animal electricity," because when he touched the nerve of a resected leg of a frog with a metal, then the frog's muscle contracted. So it seems to be... well, it must be some electricity. Now Galvani, unfortunately, got it wrong in one interpretation because he thought that it's a fluid, it's the animal fluid. It's not the same phenomenon that Alessandro Volta, they were more or less contemporaries, was studying in a different lab. He said, "No, this has nothing to do with metaphysics or with some animal principle." It's the exact same electricity that this guy, Volta, got by, inspired by Galvani, placing different metals together. It's the same electricity. And so, but they were anyway giants, despite this rivalry and despite the... yeah, despite that Galvani got it wrong. And he actually died in bad conditions, depressed and convinced that he was, he had been a failure. He was not. So this is a stupid movie to show that by sort of closing the circuit and applying some sort of electricity or metal, the leg of the frog was indeed contracting. And these are the starting observations. So spasms, so mechanical contractions, muscle contractions—today I should maybe call it cellular excitability, but we will see later what this is—is characterizing biological systems, particularly muscles and not only muscle tissue but also cardiac tissue, pancreatic, some pancreatic cells, nerve cells of course. They're all cells that would react if you would be given some electricity. And particularly the story was originally from different metals that were in touch with the... and so creating some sort of difference of electrostatic potential or electric field. I will review during next week's class some elementary concepts of electromagnetism such as electrostatic potentials, electric fields, Coulomb forces, so don't worry too much about that physics. And the interesting thing is that passing a current through the leg was creating a visible reaction, so much so that they would be measuring the speed of propagation. And as if you watch this video, this talk of mine, it basically... they invented neurophysiology. So it's not only them, it's people following, and they were in a... you know, historically, in a situation where people were still convinced that

there was some sort of metaphysical principle in living organisms. And so the brain had this “animal electricity,” “animal principle,” “animal fluid” that was not knowable. So it could not be understood or measured, it was metaphysical, so it could not be measured. And people said, particularly people like Helmholtz or others, they were convinced that it was understandable by the laws of physics and chemistry, and they proved it. And they started a field that bioengineering is somehow building on today.

So I will stop and then we’ll start later. So the question is that, I’ll tell you what I will show you and then... so it will be... the question is that I will also have some electrical signals and it’s just to entertain you and to make this four-hour class a little bit less heavy. And do you know Murphy’s Law? So, of course, as I said, something that could go wrong, did go wrong. This is Murphy’s Law. And apparently, I read yesterday that the guy was serious in the sense that he was basically, it was not only just a joke, he was actually saying, in engineering, it’s guaranteed that things will fail. So, do organize so that things are not failing. In this particular case, it fails or it will fail, first of all, because I had a last-minute burnout. And secondly, in this environment, the noise is too large. I don’t have a Faraday cage that would shield the noise, particularly this damn 50 Hertz noise, which is related to the power, to the alternating current that is in the power outlet. So also here. But even if I disconnect the laptop, it still will capture this very slow, oscillating electromagnetic interference, which is at 50 Hz. And we will see it immediately. And then there is also the ground loop that will prevent me from getting data. And I will use an electronic amplifier. I think that you are more than competent to understand that I need to amplify signals that are very, very tiny. I need to make them much stronger. It will not work if I plug my fingers in the input of this analog-to-digital converter. So the analog-to-digital converter, maybe you’ve heard, it will acquire analog signals. “Analog” because they are changing over time; they are signals that are changing in analogy to the physical quantities of the real world. And they will basically convert them to digital signals. Not only will they digitize them, but they will also sample them. I think that you might be all familiar with Nyquist. Do you know Nyquist? So anyway, he’s one guy who made it very strict that in order to make signals usable on a computer, you cannot... with continuity, with temporal continuity... you need to observe it like with a stroboscopic flashing light at precise times, at precise moments in time. And the period is called the sampling period. And this guy here is sampling at... I will not tell you because it’s one of the questions that I would like you to see... so a few hundred or a few thousand times per second. And I need an amplifier. But let me stop, otherwise I’ll lose your attention. Let’s break for 10 minutes and let’s continue later. Thank you.

Yes? How are you? And this is for Teams but I think that you already have it or not? No, because in the university I have a lot of difficulty to start. Can’t be yet, not yet, not yet, not yet. Okay. I thought I would ask if there was also a code. I said no, but it was just... Okay, thank you. Nothing. Correct, because we are going from here at 8:00. And in the middle of Mirandola? - But you have to write it if you can present it? - If you want to write it, then you can write it. - Yes, yes, absolutely. I don’t know where it is, but it’s in the center of the... and there should be a few halls. - No, with pleasure. If you are there, then it’s... - If you have the fortune... - Okay. Maybe you can tell... Because in

the center of the community there is not one bar, in a bar there is only a coffee machine and then... if you have a microphone it still works. Thank you. Thank you. Thank you. Thank you.

Section 4: Live EMG Demonstration So I'm a little bit disappointed because there is no noise. It's Murphy's Law in the opposite sense because it's working much better than at home. And there is no 50 Hertz noise. I wanted to show you this... no, well, it is noisy, but it's not the noise that I'm used to. So I will show you what... so I will tell you later the details of what I'm doing. And in the video recording, I'm using the webcam to show that I connected two electrodes to this part of my arm and the third electrode, which is the reference electrode—and I will tell you what this measurement is—I connected here below my... just a little bit below my left shoulder. And there is no noise. So I might attempt also the ECG, the electrocardiogram, also called EKG, but this one is called EMG. And so I am a frog in the sense that the electrodes are amplifying... I think the amplification is 100 times, and I'll tell you how in a moment. It is amplifying signals related to muscles. We know nothing about muscles, we will not study muscles per se, but you probably know that you don't have one big muscle, you have many fibers, and each fiber has its own electrical activity. So it's conceivable that if I do a voluntary contraction of the muscle... and by the way, I'm not able with this setup to look at nerve inputs. I could if I had a needle going in my skin. And in Zurich, when I told you that I attended a few courses during my PhD, there was one very charismatic professor that was putting a needle inside his own muscle, but I'm not that brave. And so what is now recording is something that is probably... I don't know what that pulse was. It could be an electrical artifact. I want to show you what happens if I simply try to contract my fist. And your criticism could be, "Wait, but if you move the electrodes, so if you apply movement, then you have artifacts." So you have to really... in order to convince you that what we are measuring is maybe related to the electrical activity of the living tissue, I have to try to see whether I can stay very still. And the difference will be striking. You will see when I contract, you will see that the variance will increase. It's the crucial moment, come on. Now take your time, I'm joking. But it is the crucial time. So all of these are artifacts probably because I'm moving and it's probably the wires, even the wires. But look what happens when I contract my fist. So I'm not moving, I'm just... those of you who are maybe more expert than I am would probably call this an isometric contraction, so I'm not moving any... correct me if I'm wrong, maybe it's not isometric. And as I keep it contracted, you actually see this increased variance and it seems that there are several oscillations. I just release and it goes away. I contract and I release. I contract and I release. I'm very proud that this works. I would say it took hours to do that. That's it. I wanted only to show that I can maybe zoom in, changing the scale, the vertical scale... that it's not going smaller than 20 millivolts per division, but what I can change is the time base, so how much time is per division by those squares. I can go much faster on a time base that is faster. And here you will actually see that the signal seems to have primitives that are not arbitrarily fast. It's not white noise, it's not arbitrarily going up and down. It seems to have some sort of dynamics of signals that are going up and down within a few tens of milliseconds. Each square is 50 milliseconds. Thank you.

[NOTE: A section of the lecture was not recorded here due to microphone failure. The transcript resumes below.]

Part 4: Future Directions: Computation and Bio-Hybrid Systems

Section 1: The Bionic Dream and Sensory Prosthetics ...will be... you have to read the lips but okay, today is blah blah, you have seen it and I will try to find a way, presumably leaving the audio from the laptop and not having this one, so this is better and the audio will be a little bit lower quality but will not stop. I apologize, I charged it this morning but probably they cannot withstand three hours or four hours of class.

Okay, so... so even myself, I was particularly drawn to bioengineering or to the study of the brain for the same reason. In the 80s when I was a kid, there were ugly TV series like this one that was called *The Bionic Man*. It was an Air Force pilot that had a severe accident and because of the injuries, but he was so precious, the Secret Service said, "We can rebuild him." And they were actually replacing his visual cortex with an artificial eye, the arm that was amputated with a robotic arm that gave him super... like a fantastic force, the guy was... and particularly what was interesting is that they had an artificial eye connected to an artificial cortex. And okay, the legs, the limbs were trivial, okay, fine, you have robotic limbs, but it's okay. And then the guy was able to run at superhuman speeds. The funny thing is that they did the spin-off series, *The Bionic Woman*. Okay, this guy's title was *The Six Million Dollar Man*. It's ridiculous, particularly with today's exchange rate. The spin-off was *The Bionic Woman*, and they also had a mini-series on the bionic dog. It was fun.

So the story of being able to... we'll see later about motor prosthetics, but sensory prosthetics is another central point, and people over the past 50 years have made incredible progress. I don't remember, I think in November on Friday in Mirandola, we will host one guy working in Austria, in... I forgot the name of the city, it's not far from the border in Alto Adige. Okay, doesn't matter, and he works in a company that is doing cochlear prosthetics, cochlear implants, and making it possible for deaf patients to hear again. And here it seems to be a relatively easy problem because the cochlea is shaped like a *chiocciola*, from the animal, and it is related to the anatomy of one part of the auditory system, the periphery of the auditory system. And it is special because nature evolved it in a way that if you are able to unroll it—it's all wrapped on itself—but if you are able to make it a line, you have some sensory cells that have mechanical cilia, and these cilia are long or short depending on if you are in one spot of the cochlea or another. And you can probably guess that the longer or the shorter you are, you will change the resonance frequency if these things are sort of in touch with mechanical vibrations due to auditory sounds. So we have the tympanum and we have some liquid system and ultimately we have mechanical vibrations from the air related to these cilia. And depending on their length, they are able to perform as filters. They would not resonate... so the very short ones will not start to oscillate for my pitch of voice, but they would if, say, somebody would start speaking with a very high pitch, and they would because in that case, the frequency of the mechanical oscillation will be higher. You probably know that... okay, you don't anymore... you're not fond

of house music, it's a different generation, so I don't know what you do when... when you don't go to the disco, but there it's very low frequencies, very low bass sounds, and in order to resonate, being an existing relationship between frequency and wavelength, you need long oscillating rods or cilia to detect and to oscillate, so to filter out this signal. So here you have what is called a tonotopic organization. So it's "topic" meaning there is some place, a placement that is mapping tones, which is very surprising. You have, say, violins here and the bass drums of house music or whatever you hear today at the other extreme. So it's conceivable that if you have not just one electrode like in DBS, deep brain stimulation, but if you have an array of electrodes in a way, because you may want to stimulate different spots, maybe you can process my voice, decompose it by Fourier transform into fundamental frequencies and stimulate different electrodes electrically depending on where they are. And of course, since the cochlea is not straight, you may design your electrode array in a way that is flexible and it's also kind of resembling the anatomical structure. So and it will be roughly being able to replace the nerve cells, the sensory neurons that are no longer working. So you don't have this... well, they might still be there, but they don't work anymore. And if you stimulate here, the underlying neuronal circuitry would still be expecting to get activated, because they would expect these guys physiologically to get activated when the frequencies are bass sounds, instead of the other ones from the other extreme, violins.

And the result is surprising, and there have been so many advances in signal processing to make it possible to learn or to adapt the way that sounds are processed in order to be converted into a frequency domain stimulation. And as you can imagine, now I'm making it as if we know how to electrically stimulate nerve cells. Maybe this is a sort of very tiny electroshock, like it is the electroshock here. I'm just exaggerating, it's not an electroshock, they're very, very tiny currents, but it is as if I'm blasting a very loud sound at you, expecting that you will answer a question. You are neurons, the question would be answered by emitting, say, some sort of encoded signal by having an action potential like this or like that, and I shout, and you probably are responding something, but first of all, I'm not able to speak to one cell at a time. I shout, all of you hear me, and maybe I traumatize you. You are shouting back, you are startled, and you are shouting back. So we are far from being able to talk to neurons. The story that I mentioned before, using light and optogenetics, is a more elegant thing, because not only can you shout, you can excite, but you can also silence, something that you cannot do with electrical stimulation.

The same concept has been explored for retinal prosthetics, where instead of having just a monodimensional array, you have a bidimensional array, like a fakir's bed. Have you ever seen an image of a fakir? *Un fakhro, un letto da fakhro*. In India, there were people, if you Google it, you will see people sitting on a bed of nails. So a bed, not with a mattress, but with a lot of individual nails. It's a comparison that I do very often. And it's sort of similar to what, in this case... this is not to be implanted in the eye of a patient, but in this case, it's an array... take a look and pass it around... it's a bidimensional array of microelectrodes. It's so tiny, made with CMOS technology, that you can't see it with the naked eye. And the green stuff that you see around is a printed circuit board, and it has a lot of contacts, and you can individually activate different electrodes in the retina. So here, a surgical operation is inserting this array of

different electrodes on the floor of the retina. And if you have a camera mounted on glasses, you could maybe transfer by inductive coupling images processed on the camera to electrical pulses in the retina. And the guy is, of course, smiling because it was a promotional video from the company. But I think, if I'm not mistaken, this is the guy, or it's a different guy. This is the guy being able to see the moon again.

In the cochlea, I told you about tonotopy, so a tonotopic organization. In the retina, you have a retinotopic organization. So, points that are nearby in the world, just because of the optical properties of the lens, are projected... the light is projected to a nearby point in the plane of the retina. And so, if you stimulate nearby cells in the retina, technically they are called ganglion cells, then you are presumably eliciting some sensation, what are called phosphenes, of sensory stimulation. A blind person will actually see two small lights, two pixels, lighting up, and they will also be close by in the perception of the patient. So the concept is very simple and it's basically the same as a cochlear prosthetic device. Here, you stimulate depending on an image. Maybe the image was pixelated. And so if you stimulate different pixels, for instance, there is a light there that I see, and then there is darkness here, or vice versa. Here I see that it is bright, and here it is darker. I can stimulate a little bit stronger on the left, and then on the right, I stimulate less to give the same transition between bright and dark.

Something very interesting is that this company decided at some point, for reasons that are related to the market, which is another very interesting component that I hope can be discussed again on Friday, one of the Fridays of these colloquia in bioengineering at the end of December, middle of December. The last one will be one person that was responsible for these implants in Italy, and basically, they decided that it was not worth it. And to me, that is amazing. So, of course, I'm not motivated by and I'm not working in a professional, non-academic context, but to think that you, from one day to the next, you decide, "Look, the specific disease that these guys were suffering, Retinitis Pigmentosa, affects... it's a genetic disorder, it's a degenerative disorder related to a genetic condition, is only affecting a small number of people. So, there is no business." So, I don't know who was to make money. In reality, you could get... problems for making money. Because you would restore vision in blind people, which is amazing. I mean, isn't it the dream of everyone? Or you would be able to make a sort of artificial arm for an amputee patient. But then at least this was the situation about 10-15 years ago and Professor Silvestro Micera, I hope he will answer this question. We ran a project, a European project, and in this project, there was a big company called Otto Bock. It's a multinational but has its headquarters in Germany, and we were actually having them on board in this consortium of universities and partners. And they told me very clearly, "Fine, you can do whatever,"—at least 10 years ago, I don't know now if things are different—"you can do whatever robotic arm that you want, you can make a fantastic electrode-neuron or nerve cell or axon coupling as advanced as you want. I'm not going to sell it. I'm not going to sell it for you because health insurance in different countries will not pay for the robotic arms." The only thing that they would cover—again maybe this is different, it was like this 15 years ago—what they would cover is passive prosthetic things made of silicon that maybe have the possibility for a patient to, just with the other hand, contract it so that... so not something like in the *Star Wars* movie that would become in-

dependent, so you could control it by thought. And this was a very big surprise here. They decided that they didn't have a market, and this article says that the company withdrew, and there are still people with this device implanted. And it is like when a company, say, if Apple would go bankrupt, we would have computers and things for maybe a few more years, and then there would be no spare parts and no new computers. What they did, they did not go bankrupt; I think that they are focusing on a different approach that is more rewarding financially. That is, I'm not targeting only blind people because of that specific disorder of the retina, that can be Retinitis Pigmentosa, but also maculopathy, degenerative maculopathy. It's a very specific thing in the periphery, and maybe that's the reason why it worked nicely, because it's so simple. In the periphery, it works nicely. If you go higher in a hierarchy, it might be more complicated. I might be able, perhaps, to understand how to interface some sort of amplifier to the computer because I'm connecting via USB. It's a stupid comparison. I might have a hard time opening my computer and just operating on the motherboard. It would be a mess. It's so complicated. I don't have the schematics.

And here the idea is that they want to stimulate in the visual cortex. So even people that have, maybe they were born without eyes, they have a visual cortex. Okay, it will be more complicated, but they could receive this stimulator. So they would have glasses, and the glasses with the camera would transmit information directly to the visual cortex. How and where to stimulate in the cortex? Good luck. And particularly, so technology in terms of hardware, can be very advanced. Here you see another company... so this is, sorry, it's another company... it's a, if I remember correctly, it's an Illinois technology university. It's so small and this array of electrodes is even long, so they are not just like the one that you see, planar, that I'm circulating. These are able to go intracortically, they go inside the tissue, they don't stay in what is called subdural, so below the dura mater. That's a way to possibly stimulate different spots in the visual cortex electrically and obtain some sort of images, counting on the fact that you have retinotopy not only in the retina but you have it also in the visual cortex. The problem is that we don't know how to stimulate, what is the code. And another reason is that you may not want to electrically stimulate in a tissue that is excitable because if you stimulate a little bit too much, people could have a seizure, an epileptic seizure. And they, and patients had epileptic seizures during the clinical trial. Maybe it's easy because you basically stop stimulating, but the brain is a highly excitable tissue, so if you stimulate a little bit too much, then you have the entire cortex that goes nuts. So there are pros and cons.

Another thing that I invite you to think of is that if you have a camera in the frame of your glasses, and you're blind, okay, so you're blind, anything would work. You can no longer count on saccadic movement. Saccades are the rapid movements that we can do with our eyes, and you don't. Well, you could do that, but you don't have a functioning retina. So what you have to do is you have to move your head. And your brain is not used to moving the head while keeping the eyes straight. The eyes, particularly in a blind patient, would be constantly moving. And there are physiological mechanisms that are compensating for the fact that even if my eyes are moving, my perception is of a stable room. And even if I can move my head, there is a corollary compensation mechanism.

Thank you. Thanks a lot. So this is also something that is worth devoting some thought to, because it's not trivial at all.

Section 2: Motor Prosthetics and Brain-Computer Interfaces Let me move to motor prosthetics. Do you know this guy? Do you like him? I don't like him particularly, for many, many reasons. One thing is that he founded a company, Neuralink, and he started saying, this was several years ago, starting saying, "Neuroscience is over, we only need bioengineers." Okay, that would be good for you, but neuroscience is not solved. We don't know exactly how to make sense of electrophysiological signals. We know a little bit. And Neuralink made very big statements, promising, "We treat all diseases. Not only this, everybody will have, like in science fiction movies, *The Matrix* or *Johnny Mnemonic* and others, people will have a connect... well not necessarily a connector in the back of their head, but they will be able to interact with computers just with their brain, just by Bluetooth." And I don't know whether this is going to be the case, whether, yeah, you could maybe make sense of signals in my motor cortex if I'm a tetraplegic patient, and you can maybe decode if I had the arm, whether I would move it to the right or to the left. Maybe this you can decode, you can make sense of it, but forget about the complex multiple degrees of freedom. I don't remember how many degrees of freedom my hand has. It's probably about 20, 25, of that order of magnitude. And yeah, it's very complicated and we don't understand the motor system so well to say... "Of course, the guy is doing some... so I avoid that... so of course, this is encoding, we can decode his or her thoughts." Bold statement. And they also claimed that they were the first to have, last year, the first human implant. No, it's 20 years that people have done that in humans, even wirelessly. True, Musk, together with Apple, together with Samsung, they have access to amazing technology that would make it possible to do these things. This is just at the level of university consortia that don't have access to clean rooms where microchips are fabricated. And you know how small mobile phones have become. They have state-of-the-art hardware, but they don't yet have state-of-the-art neuroscience, because neuroscience is tough and it cannot necessarily be solved by injecting billions of euros or dollars.

So this is there, it was January last year. The problem is that by looking at specific parts of the brain in the motor cortex, a tetraplegic, paralyzed patient would have been able to use a cursor on a screen. By having electrodes connected to Bluetooth hardware, these are the electrodes that are implanted. So they are soft and they are not implanted by, like in some neurosurgical operations for deep brain stimulation, but they are implanted by a surgeon robot. I hope that it comes... It doesn't come. It's not this video. And of course, they call this telepathy, the first device. And I'm pissed off because this is clearly creating false illusions in patients. Sometimes, it doesn't happen so often, I have people writing via email saying, I've seen... so laypeople, so private citizens, writing to me and saying, "I've seen that you published this paper, could I bring you my mom that is suffering from Alzheimer's or from dementia?" No, I have no way to do it. Maybe what I do will make sense in 10, 20, 50 years. Instead, this guy is calling it telepathy, saying we cure all diseases.

So, I think it's this one. And in a moment, you will see that these electrodes are implanted. This is very cool, implanted by a robot surgeon that is able to

avoid hitting the blood vessels and thereby avoiding causing a hemorrhage. This is very cool and it's done by infrared illumination. Blood will actually... fine, it's wireless so you actually don't see it in these animals, and you can record and stream via Bluetooth tens or hundreds of channels, and each dot is a nerve impulse detected in the sensory area of the animals. Here it's in the motor areas of the animal, and what you actually see... what you actually see... why? I need one of these. So what you actually see is there are markers. They could be stickers placed on a specific place of the limbs or by, say, image classification algorithms, if you want deep learning algorithms, but it doesn't matter, you can process a video, extracting at every single moment where the location of specific points is. And the algorithms are so smart that they could follow across frames in the video where my, say, my knee is in different frames. So if you do that you could plot the angle or the position as a function of time. And here the animal is not paralyzed; the animal is walking on this treadmill. And at the same time, you're recording in the motor cortex in the area that you know is responsible for controlling locomotion, and particularly the articulation of all those degrees of freedom. So you have the ground truth and you have the signal that you know contains that information. And so you build a neural classifier by learning, by training, and you compare it and you say, "Look how cool it is." It is cool that you can predict with high accuracy—so the continuous line is the actual position and the gray, the lighter line is the decoded signal from the brain. It is fantastic. But do this for a patient that is completely paralyzed. You cannot ask, "Okay, can you do a few hours of video walking because I need to... or moving your hand because I need to train my algorithm." And you know that machine learning is successful because it is now fed with huge, large datasets. If you have no dataset at all, it might be more complicated. Let me run it again.

So here you could decode a paralyzed patient. In this case, it's a motor action of the limbs of the animal. It's not particularly relevant or crucial, but it's a fantastic proof of concept. And in a moment you will probably see not only reading, but writing. When you see those bulbs, those cells, lighting up, it's because one particular electrode has been electrically activated. And one thing that you notice is that we are very far, even with Elon Musk, we are very far from the dream of playing the piano keyboard. Imagine that you hear, I don't know, Beethoven's Symphony No. 9, and you say, "Okay, fine, now I would like to replicate it and I have a piano keyboard." Maybe you will never be able to replicate it exactly unless you are a very good musician, but at least you would like to press the piano buttons, the neurons, one at a time. You don't want to just go there with your elbow and press five or six keys of the piano keyboard. Here, you stimulate and you have a bunch of cells that are lighting up. It doesn't matter why they are bright. And this is, again, it's only a demonstration. So all these retinal prosthetics or cochlear prosthetics, sensory prosthetics, they are far from saying, "Oh, look, there is a small fly there and it's now changing direction, I know how..." We are very far even from the point of just the means of electrically eliciting a nerve impulse when we want. And this is the comparison with a keyboard, with a piano keyboard.

And at the same time, again repeating an experiment that was done 20 years earlier, here is the monkey. The motor cortex is again fed into an artificial... to a machine learning algorithm, and it's playing Pong. Pong from the 1970s, I

remember it, it was the first video game. And the animal is not having a joystick; it's a small tube where it gets the reward. And so if you're a patient that is paralyzed... Wait a second, let me show you this. This was in 2012. If you're a tetraplegic patient and you're paralyzed, it might be worth experimenting on animals. And this lady is controlling this two or three degrees of freedom with a connector. So it was 2012, it was not Bluetooth, it was with a wire. I'm just showing you all this because maybe I perceive that some of you were correctly, understandably annoyed by the animal experiments, yet this is the goal, it's not the animal per se.

So, motor prosthetics is not only a cursor on the screen but also this robotic arm. This is massive, it's just because it's convenient to use something, this robotic arm that is already available, it's a commercial platform. And I think here, 2008, so many years ago, a different concept would make a patient, a tetraplegic patient... now this patient unfortunately died for other reasons, he didn't die because of this implant, he died because he did not survive heart complications, I think. And he was using computers almost 20 years ago by his thoughts. He was replying to emails, and here it's simply a different concept. You have an array of microelectrodes, this is like a bed of nails, each can be controlled individually and you're listening to the electrical pulses. It was a question but I think I answered it already. If you could read thoughts, what would you do? And I think in all your introductions, there was the idea of using it for therapeutic applications, and particularly in the case of tetraplegic patients, basically restoring some form of movement. Again, if you can read the thoughts but you have AI or you have some classification algorithm, you could maybe hope to gain insight even if you don't know the code. Maybe you could train with a patient saying over and over: "Please do whatever you want, but think of, if you had your arm, moving it, say, north or south." And at the same time, I record the electrical activity. There are huge problems. When do I start recording? When does it make sense? Maybe I can ask the patient, "When I play a sound, you start doing it." But one thing is to see the monkey there. The monkey was just getting the reward and he was no longer acting on a joystick that was used before for training. But for the tetraplegic patient that is not moving, it's a big deal to infer what the neural control is because we don't understand thoughts. We understand why just a tiny bit of an area of the motor cortex is getting activated a little bit, and we think that we are capturing the movement, move to the right or move to the left. In reality, probably the motor cortex is maybe even planning the trajectory. Motor actions are complex. It's not just "I move right or move left." I control all degrees of freedom to get my actuator in one point. Only to overwhelm you with a situation of complexity.

Swiss and Belgian chocolate in the supermarket, we have the code. We don't have the code for the spike train that was measured a few years ago in our lab. We don't know what it means. It's a rate code, does it matter? Is it the frequency of this nerve impulse that tells about the information? It's also this, but it's also the exact timing of the nerve impulse. And how? We don't know. It depends on where. In your spinal cord, you have neurons that if you have one kilogram, they will start firing at one frequency. And if I add another kilogram, two kilograms, the number of spikes per second—spikes, I call them spikes because they look like needles, action potentials, nerve impulses—the frequency would double. So it would correlate with the weight. But this is in

the periphery. Very, very evolutionarily simple compared to motor planning in a primate. By the way, I'm standing as an inverted pendulum, I'm still gesturing and I'm not falling on the ground. It needs to be more complicated. So we don't have the Morse code, the Rosetta Stone, to make the comparison, what is what. This, we don't have. And yet, I think it's in this video here, I'll emphasize that the monkey... so this is from a pioneer from Duke University many years ago in 2008. I think it's a combination of these two videos. The guy is on YouTube and he has many, many talks and it was particularly impressive because he said, he described the surprise that the monkey at some point... here it's controlling the cursor on the screen with the joystick. At some point, the researchers basically swap and they say, "Okay, now we've trained the machine learning algorithm and basically we'll disconnect the joystick." And as the monkey continued to perform the task, what was interesting is that at some point—and the guy has a very strong Brazilian accent that I won't try to imitate—but he says, "We realized that we were making history because the monkey realized that he was no longer touching the joystick." And again, this is amazing. So the monkey learned to use a tool just by thought, realizing that it was no longer the hand, it was something else in the motor cortex that was controlling it. I show it to you because it's from more than 20 years ago and yeah, somehow we did learn a lot about this.

Section 3: The Limits of Current Computing and Neuromorphic Engineering

Before closing, maybe I will give you at the next week... we'll finish a little bit. There is another very crucial perspective that is not therapeutic, it is more related to a novel paradigm for computation. You probably learned that the so-called... what is the name... Moore's Law of doubling the number of transistors on a chip is predictable, so every year or every five years, I don't remember, there is progress in integration and therefore miniaturization and therefore power consumption. Now Moore's Law is no longer... it's starting to fail because transistors are getting so small that we are hitting quantum mechanical effects. They don't work anymore because they are maybe one or two atoms and they are no longer behaving like classic physics. So at some point, forget about having iPhone 19, iPhone 20, iPhone 21. At some point, it's not going to work. We have to end up with what we have. So computer scientists would immediately rise up, maybe some of you as computer scientists would tell me, and that's why now you have architectures with multiple cores, because we are anticipating this. Fine. Multiple cores implies that you need to become proficient in parallel programming. And again, good luck, because it's a very hard field to make, to transform any algorithm to make it parallel. There is still no recipe, and it may be that some things could be made parallel but other things may not.

But the real problem, and I'll show you this... this is from a movie a few years ago, I don't even remember what the movie was. They built robots that were sentient, that were intelligent, and the guy was learning and was scared. Interesting, it was in a nice context of a, say, degraded area of the city, and the guy started bonding with criminals. It's fun. He looked for imitation from cartoons of the 80s or started painting. Yeah, so it was fun. So this is still a dream of building artificial systems. The problem is that we don't yet have an artificial system with the same performance as the human brain. For some aspects,

we are even beyond. For image recognition, we are definitely beyond human capabilities. The culprit, however, is the huge amount of power that you need to not only train but to run this device. I get by with three watt-hours from eating something, and you are probably starving now because four hours with me are heavy. For ChatGPT, you have on the order of two gigawatts per hour, and it's very intensive. There was a paper, an article in the news just reinforcing this story of unsustainable development. So the cloud, I'm sorry for the computer scientists in the room if they consider that to be... it cannot be the solution, it's not sustainable, even if you have nuclear plants that you are producing, because you need maybe 20 years to build one. And resources on the planet are starting now to already be less than what we need to operate our own civilization. So it's simply unsustainable.

There is another problem: the more you integrate electronics on a chip, the more heat dissipation is required. And in fact, you can only run a data center that is very large, maybe as large as this room, and to cool it down, maybe, you probably know Microsoft and many other providers are doing this, they are kept underwater, just in the water, for having a heat sink, just to dissipate heat in a better way. I don't... I can... my brain and your brains are happy, there are blood vessels that are definitely dissipating heat.

There is a sort of direction where bioengineering is going, which basically is skipping the application on humans, and it's basically taking the mimicry that has been very successful in nature. Planes, although they have not been directly inspired by birds, I'm pretty sure they were motivated because people wanted to fly. So here, it's a little bit more similar, so it's way more accurate. There is a field of engineering called neuromorphic, in which the same artificial electronic devices, or maybe even quantum devices, or even spintronic devices, are used or engineered with principles that are exactly the ones of how signals in the brain operate. So much so that they are able to mimic. In the early 2000s, there was one paper that appeared in *Science* entitled "A silicon neuron." It was one electronic circuit made of CMOS that was behaving sort of indistinguishably—although this is a very big statement—from a biological neuron. And if some of you are fond of playing with Legos, it's conceivable that if my brain is a collection of simple elements assembled in a complex way, maybe I can build in electronics neuromorphic circuits, which are a complicated assembly of elementary systems that are behaving and consuming very little power, like the brain. For those of you who are fond of or competent in or have reminiscences of electronics, digital electronics, ChatGPT, von Neumann architectures, use transistors as switches. Switches, and they switch between zero and one, and you probably know that there is a huge power load when you switch. Neuromorphic engineers use transistors as analog devices in a regime that is called weak inversion, and another way to call it, to identify how they operate, is called sub-threshold. So they use them as analog devices, for instance, to compute exponentials in hardware. You don't need to write a program; you have one transistor that is per se behaving as an exponential. Similarly, in a nerve cell, we will see it, one protein that is called an ion channel, it's a protein that is interleaved into the membrane of a cell, that one is a component, it's a protein, and it's performing as an exponential function. So this one-to-one mapping is inspiring a lot. And this is one paper that was published a few days ago, or maybe today or yesterday, where a neuromorphic system involving not a von Neumann architecture, not

deep learning, not backpropagation, not large language models, attention, etc., but involving spikes, is able to perform similarly to the visual system. I'll omit what this predictive coding and what this is about.

Section 4: The Biological Inspiration for Artificial Intelligence So, before closing in five minutes, I would like to emphasize two things you may not be aware of, but a large fraction of, at least at the beginning, how artificial neural networks started, and in general artificial intelligence, but more specifically machine learning, has been inspired by biology. The famous perceptron was invented by psychologists that were aware of how neurons were performing, that they were sort of all-or-none units and they were maybe emitting an action potential if their inputs were reaching some sort of threshold. Now from that point onwards, things diverged, because even the promise of building a circuit... this was John Hopfield many years ago, he got the Nobel Prize last year, probably you should know who he is. I mean, he's very important. He is the person in the 80s responsible for the end of the winter of AI. Marvin Minsky and others in the 60s killed AI, saying a perceptron cannot solve the XOR problem, so it's crap. Today we know that it's not entirely crap, but also because we have a lot of data and we have a lot of computational power. And Hopfield was, however, expecting or anticipating that we would have been building devices, physical devices, even materials that would perform like brain circuits. In reality, we end up having PyTorch, which is a very... it's a Python library and it's used, or yeah, I think it's the one of reference. So we end up having software, which again, it's not a very good idea because of power consumption. So the possibility of continuing to look at biology to extract principles is very, very timely and very relevant, because still, my brain is performing a variety of tasks and I don't need to see all of the internet in order to start speaking in a language. Admittedly, they are useful, but it's not... the holy grail is not going to be the current artificial neural networks.

I won't tell you about Neo, the character in *The Matrix* that is learning Kung Fu, because we are uploading knowledge. Maybe, that would be fantastic, but we are not yet there. The guy is able to have his cortex reprogrammed. We're not there. The guy knows Kung Fu. And unfortunately, we are not there. So, Elon Musk, sorry, but yeah, it's a very nice dream. Maybe what you did, that for sure, you advanced the hardware part, the technological part, in such a way that we can maybe now, if you are able also to release it to researchers, to experimental labs, maybe we can tweak it, maybe we can use it. Because so far, the best that you could do is moving a cursor like people have been doing for over 20 years.

Section 5: The Frontier of Organoids and Biological Computing I think I'll stop here. I only wanted to mention this. Some of you mentioned the possibility of having stem cells or biotechnology, some of you. Something that we are also starting to do in the lab, and it was in the news yesterday or three days ago on the BBC... So, some of you will know that it's possible from skin cells, also from embryonic cells, to take cells and differentiate them into nerve cells, to build what are called induced pluripotent stem cells, and then differentiate them into whatever you want. And it's possible to do it and build mini-brains, although it's wrong, we should not call them mini-brains, although

they do, they are called organoids. There is a company, if you go on this website, FinalSpark, they have an interesting business model. They claim, which is also my view and also the dream of some projects that we started in the lab, that in 50 years we will not only have to charge our phone, we will also have to give it a drop of sugar, because inherently there will be some biological component, a hybrid component that would absorb much, much less power and would have maybe some neurons, some biological neuronal network processing information and working at the same time. If you go here you will actually see live signals that are very similar to what we got in the lab.

Thank you for your attention, see you next week.

Part 1: Course Preliminaries and Announcements

Introduction and Technical Difficulties Ok, I'm sorry that last week part of the lecture was not recorded. Those little microphones have a limited battery and they left me stranded. If you see it during the break with the microphone, please give me a signal because I will at least try to save [the recording]. I have a second ambient microphone, which is not great, but since it was not offered by the university, I have to buy it at my own expense. To be sure, there will be a bit of an echo, but you are here, so it shouldn't be a problem for you.

Okay, so today we continue and we finish this introductory content that I'm quite eager to present to you because in this way, concerning brain signals, you have at least an exposure to what kind of signals you can get.

Attendance Tracking So that is the code for the tracking of your attendance. I emphasize it again: I don't really care. It's just for me for statistical purposes, to see or to disprove the hypothesis that for the first couple of classes you are brave and attending. As soon as I start writing some equations—maybe we start already today—you get scared and you don't show up to class. So please disprove me. It's not the QR code. The QR codes, I should remove them. The QR code is to download the app. It's the numeric code, alphabetical, **DC8R9**, that you have to add. So, if you have troubles during the break, I will put it on the slide again.

Special Announcement: Guest Lecture An announcement. On Friday, we are very lucky, because we have quite a superstar coming to give a class for the entire morning. The program, as you know, is in Mirandola. This is part of the Colloquia in Bioengineering, which is actually a course that I give for the second-year students, or for your colleagues who started last year. And just because he's the one world expert—you can google him and you will see that he's very, very famous. He's a professor at EPFL, not only in Italy, at Scuola Superiore Sant'Anna. He's doing neuroprosthetics, particularly in amputees, restoring not only motor function but also sensation. He has a number of publications in very important journals: *Science*, *Nature*, and so on and so forth. The only catch is that it's in Mirandola. I don't know about the shuttle bus. Your colleagues from the second year told me that it was maybe for 25 seats. And they are less; there are probably 15 people, 16 people. They were fewer last Friday. So you could try to sneak in, and you could try to be on

the bus and to try to go to Mirandola, or you try to travel to Mirandola on your own. Maybe you could ask the university to get refunded. There is the other logistic problem: the room that they showed me that will be next for next Friday has 25 seats. So if you all decide to come, we will not fit. Maybe we can have extra seats, but I would say I hope that I can invite him again next year, but you never know, particularly with very important people. They have a very busy schedule, so there is no guarantee. Yeah, please. No.

Part 2: The Scale of Neural Interfacing

Section 1: Neurons and Electrodes: A Matter of Scale There are still worse infrastructures. I have brought up the talk about the brain; you want to talk to neurons. And I ask myself, I ask for you, if you know how big is “big.” So particularly, what is the rough size of a neuron, say the body, the cell body? Do you have any idea? How big is it? Nanometers? So, one nanometer... it’s a little bit bigger. It’s one order, three orders of magnitude larger. It’s on the order of maybe 1 micrometer, 10 micrometers. The soma, the cell soma is around, I will show you in a moment, a micrograph is around 10 micrometers in diameter. And the very fine processes, the branches that branch out, the dendrites or the axons, they can be much, much tighter; they can be a fraction of a micrometer. But nanometer, no. But anyway, this brings up very interesting observations. Maybe you heard about the field of nanotechnologies and nanomaterials. It means that today we do have materials and possible devices that are smaller, a thousand times smaller than living cells. So in principle, you could think of answering the second question about “what about electrodes?” So in this case, I’m particularly referring to the deep brain stimulation electrodes, which are massive, as I tried to tell you. But I think in 10 years, electrodes, even those of Elon Musk’s Neuralink, will become nanometer-sized. We can already build things that are nanometer-sized. One example, I don’t know whether you’ve heard of it, is called carbon nanotubes, which are very tiny, and also silicon nanotubes and other materials, but carbon nanotubes are particularly interesting because I work with them, trying precisely to interface them with neurons. If you’re smaller, like a Trojan horse, *Cavallo di Troia*, you could maybe think of putting something in the “stomach” of the neuron and maybe you’re not injuring the neuron. And we will see why the injuring, the stabbing, this idea that I had that with an electrode you may puncture a neuron, will become maybe more delicate if you just have a very tiny needle that the neuron will not even know is there.

Now, any idea about these deep brain stimulation electrodes? Last week, I showed you the guy with Parkinson’s that has an immense improvement in his motor symptoms. It’s purely symptomatic, of course. And I told you that that technology is directly taken from heart pacemakers, with small modifications. So what do you think if these neurons are 10 micrometers in diameter? So, on the order of micrometers, what do you think these electrodes should be? Micrometers, but in reality, do you know how big they are? Just for you to think that people undergoing surgery, neurosurgery, to have these things inserted, they don’t have a nanoscopic thing, but they have big stuff. Do you have any idea?

I’ll show you, I think in the next slide. This is a sort of cartoonish reconstruction

of a piece of cortex. It's only one type of cell that is depicted; it's the one that I like most. They are the pyramidal cells, and they are pyramid-shaped because their cell soma (somata, if it's plural) is shaped like a pyramid, and then you have this very long apical dendrite. It's called apical. From Greek, "apo" means "far." Right now we are going into the wintertime and the planet is getting closer to the sun, in the perihelion. But in summer we go to the aphelion. Anyway, so it's called "a privativa." And here you actually see the basal dendrites. And the axon here is not depicted, it's not reconstructed. This is a real example of a cell stained with a color technique, with a dye technique, invented by Camillo Golgi. And it's from the visual cortex of a cat. And here you see, purely by geometrical comparison, the very tip of a tungsten electrode. So if this thing is around maybe, again, tens of micrometers, then the tip here of this—this is an experimental tungsten electrode; it's a needle, it's an antenna—in research labs, it's probably maybe one micrometer or less. But see, in a moment, coming from there, you will see a huge deep brain stimulation electrode if it comes... come on... Yes. So it's immense. And imagine the big damage that it's causing. And the electrode is not like here, the very tip, that has not been insulated. There was here a USB-C cable that I wanted to play with. So you probably see that here it's all insulated with the exception of the tip. The tip, I'm just making it simple, the tip is metal. But here, so here I can get electrical signals; here no because there is insulation. So here is the same; here you don't, it's insulated by some plastic or Teflon. Here you have just this huge ring that is metal. It's typically platinum, and this is the insulation. There are maybe more than one active electrode. So you see, it's huge, and it is a massive damage to the structure of the brain where it is inserted.

Section 2: Challenges in Neuroengineering So the challenges of the future, some of you will face, and they're still open in neuroengineering, are the fact that with these big electrodes, if you want to talk to the neurons, you're not selective. It would be like me shouting at you, instead of wanting to give a message only to one of your colleagues. Not because of privacy, but because I want him or her to receive and to listen to my voice, not the entire class. Otherwise, if I scream "fire, fire!" all of you will get panicked and will leave the room. Instead, I want only maybe one of you to leave the room, just making stupid examples. It's one of many stupid examples that I do, but it maybe gives you the analogy of why the stimulation is non-selective. And by the way, I cannot talk to a neuron on the basis of its genetic identity. If you are excitatory or inhibitory, it doesn't matter, provided that you are in the range of action of this extracellular voltage stimulation, or current stimulation, electrical current stimulation, you will be reached by the stimulus. Instead, I would love to talk only to those of you who are excitatory neurons. I can't today. Not with electrical stimulation. I can do it with optogenetics, but we will talk about that another time. With recording, if you want to listen, they are discontinuous and again non-selective. It would be as if during the break I start to listen to you, whether you are bored, whether you are hating my classes or not. I cannot, I can hardly distinguish your voices and I will hear a huge summation of all the voices. For diagnostics, for the EEG, electroencephalography, maybe I can live with that, but I'm more interested in understanding the information content of individual cells, and today I cannot do that.

And then there is an important thing, which is the fact that any tissue, any biological tissue, after you put in an implant, you might have a sort of inflammation and therefore tissue rejection of the foreign body. So the electrode starts to be immediately recognized as a foreigner and, as you know, particularly the brain has a very peculiar immune system as opposed to the rest of the body. The brain is encapsulated in the blood-brain barrier, which is easy to remember because it's BBB, blood-brain barrier, and it has its own immune system where you have cells that are called glial cells, *cellule della glia*. They immediately engulf whatever foreign object or bacteria or whatever, because it's so severe that if an infection occurs in the brain, you're not surviving. So evolution made it in a way that is so exquisitely reactive and so tight. So there is no rule. It's like in a cloud where you cannot enter, not even if you're invited. Well, maybe the blood-brain barrier can be fooled, but that's another story. Drugs, neuroactive compounds, are smaller than the pores of the blood-brain barrier, and they can enter.

And then there are issues with the information content. I have no code, I have no translation, no dictionary, so I don't know how to decode the signal. And something that is still not particularly developed, but it's a topic of bioengineering and neuroengineering in general, is the fact that you can also match experiments with mathematical model computer simulations. There is an entire course in the second optional course, only for those of you with a neuro-curriculum that I'm teaching. I started teaching it on Friday afternoon in the fantastic venue of Mirandola, just because your colleagues are already there.

Part 3: Modern Approaches and Modeling

Section 1: Advanced Electrode Technologies So the alternative, these are experimental directions that I would like to tell you about in one minute, just because I work on these solutions. Instead of having a massive electrode, maybe you could use an array of nanoscopic or, say, microscopic needles. So these are microwires, and these are even silicon nanowires that are even smaller. Here you see a comparison; this is an electron microscopy picture, scanning electron microscopy. You see that these things are so tiny, so the aspect ratio, which is the ratio between one size and the other of the geometry, is very high, meaning that they're very tall and very, very small, very tiny. They could actually penetrate maybe the membrane. So in this case, you don't see those that are vertical and they are where this neuron is sitting on. And in general, over the past maybe 10 years or so, some of these concepts have been used. So not only you have a piece of metal like this one and you keep it as an antenna, maybe you try to get closer to the speaker, you get closer to the neuron, but you want maybe to bring... this is inappropriate to say... So if the deity is not coming to the mountain, maybe the mountain comes to the deity. And so the idea is to have needles or protruding, three-dimensional electrodes, and you try to get closer to the neurons. There is one particular research that we play with in which, because neurons are so reactive, and so if you are not friendly with them, they will try to reject you. What we thought is that if we were to have some sort of structure that was decorated—so these are gold protruding three-dimensional microelectrodes that could be connected in the substrate—so if you decorate, if you attach to them, by some surface chemistry technique,

some protein that makes the neuron think that that's food, it's not gold, it's not a metal electrode (in this case it's gold because chemistry is easier), maybe the neuron can be brought to embrace, to phagocytose. Technically it's called pinocytosis, but all cells are eating; it's called phagocytosis or endocytosis. But of course, if the neuron tries to engulf or embrace or phagocytose, the electrode will not be able to be broken by it. So it's not a particle or bacteria that the cell can, or food that the cell is trying to encapsulate, and then internally it cannot break it. But in this engulfment, the proximity between the electrode and the cell will be exquisite, will be very small, and if you pass a small current, you are guaranteed that you are talking only to one guy, because it's that one that is hugging you, not all of them. And it kind of works. So here you actually see, it's a work that was, it's a European project actually that I coordinated and it featured many collaborators from many countries. And I'll make a long story short. So here, indeed, at least in vitro, that means that we did not do it—well, we did not succeed at doing it in vivo in animals—cells, rat cortical neurons, seem to embrace these protruding things. This is the lateral section of one of these mushroom-like shape electrodes. And what you actually see here on the top of these electrodes, these are carbon nanocubes, for reasons that I'm not telling you.

Section 2: Mathematical Modeling in Neuroscience So another thing that is very important is about the modeling part. So not only improving the technology, microfabrication, nanofabrication or nanotechnology, but also looking at mathematical descriptions. And we are going to use, to exploit, even in this course, mathematical descriptions to understand things. And maybe you are aware of this, maybe not. So this is just for purely historical reason. The equations that in 1952, two physiologists—so not engineers, not mathematicians, not physicists, two physiologists—wrote, it's a differential equation that describes, if you solve it, if you have a computer solving it, how the nerve impulse looks like as a function of time. So it goes up very rapidly, and then it goes down, and then it recovers, and then it goes to around minus 70 millivolts. And these two physiologists were so cool, they got a Nobel Prize in the 60s. They were so cool that they formulated an electrical equivalent circuit model. Of course, neurons are not circuits. They are not capacitors. They are not resistors. But you can have, by analogy, that the biophysics of cells is behaving with the same equations as the physics of electrical circuits. And this is very powerful, for instance, inspiring a field, neuromorphic engineering, where people are building electrical circuits that are mimicking neurons. Both are electrical devices, so why not have them in hardware?

This is one example of a big 10-year project that was concluded recently, a couple of years ago. It's called the Human Brain Project, in which individual models, mathematical models, with all this morphology, can be incorporated in a supercomputer, in a high-performance computing system, and all these differential equations associated to these hundreds of thousands of virtual neurons can be solved, and the communication between neurons can be studied. Here, it's a pretty movie where the color is encoding for the electrical potential. If it's red, it means that the membrane potential is positive, say plus 20 millivolts. If it's blue, it means that the membrane potential was minus 70 millivolts. Of course, people did more interesting things than this three-dimensional fly-

through, which is purely aesthetic. To some extent, it's not particularly useful, because the only thing that you can see here is that maybe you get red, and then you get bluish, and then, okay, here it's too short to see. So maybe it's some sort of global... because the entire network was in a kind of synchronization, global oscillations, just to tell you that people are using that.

Out of curiosity, how many of you know what a supercomputer is? Any suggestion? Can you tell the others? Can you tell what particularly is fancy or not fancy about a supercomputer? "Ma perché hai un microprocessore bello carrozzato?" (But why do you have a nicely beefed-up microprocessor?) Things faster. So the only way, and I told you maybe last week that we are already doing it on, even on mobile phones, we are doing a sort of parallel computing with multiple cores, and a supercomputer is a collection of nodes, literally computers attached with Ethernet cables in a network. And so if you run a simulation, that's your responsibility, you can distribute the job. So you can distribute the program across many computers. So, and how would you run a simulation of a piece of brain on a supercomputer, having said that it's a collection of hundreds of thousands of computers, of cores or processors? Any idea, what would you exploit in this parallelism of the electronic hardware? How could you make it work? In principle what people have been doing is having one neuron per processor. To mention how difficult or how computationally intensive it is to simulate only one neuron. So if the brain is a collection of things and they are communicating, maybe you could do the same if you have a collection of processors and the processors are communicating with an internet local area network cable. Just for you to be curious.

Part 4: Electrophysiological Signals: From Single Neurons to Networks

Section 1: The Visual System: Hubel and Wiesel's Discoveries Now, I would like to give you some examples of brain signals that have this electrophysiological component. And I'll mention, I will start with the work in the 60s of two researchers. They were both, I think, medical doctors. And the guy here is the author of the book that I suggested to you, that is in the readings, in the GitHub repository. I strongly recommend you to read it. It's very light. Probably it will take a couple of weeks if you read a little bit of it. But it's a tiny book. Of course, as a PDF, you don't have any indication of how big it is. So David Hubel and Torsten Wiesel—this guy is today 102 years old, 101 years old, I was surprised. I am happy. They both got the Nobel Prize in 1981 for their discovery on the visual system. And they made experiments looking at the electrical activity, at electrophysiological signals of neurons in a cat, anesthetized, and they were recording from the occipital part of the cat's cortex. It would be as if, but I'm not suggesting it, someone would stick an electrode into your brain, into your occipital cortex, while you're staring at this screen. They didn't have a video projector, but they had a system where they could, you'll see in a moment, project stimuli, light stimuli, say for instance a small white dot, and they could change the position of the dot, they could change the diameter of the dot, etc. Maybe they could show a bar, we will see, while the animal, anesthetized with its eyes open, was staring at them. And of course, one objection is clearly the animal is anesthetized, so you're not guar-

anted that the brain is actually processing information in the same way, and this is a well-taken objection. On the other hand, sensory systems are normally not necessarily affected by anesthesia. What matters with anesthesia is that your cortex usually is like when you dream, particularly during slow-wave sleep, when you are in the second phase of sleep; you are basically disconnected from the sensory system. There is a station in between that is called the thalamus, and the thalamus is like a gate, and the gate is closed while you sleep. Possibly because if the phone rings, you are not necessarily reacting. The cortex is not... maybe the cortex can still dream, but it's disconnected from sensory systems, with the exception of one sensory system that is very ancient, which is olfaction. The olfactory bulb bypasses the thalamus. It's going directly into the cortex.

So I will show you some recording. Why the animals... and what they did, they had an amplifier, and they connected the amplifier to a loudspeaker. So if you have a very fast transient, you probably know that if sounds are made of frequencies, and Fourier proved this, and if the changes over time are very abrupt, it means that in the frequency domain you have a very broad distribution of energy. If it's broad, it means that it's also broad for high frequency, in the frequency domain for high frequencies, that means you will hear it. And you hear it as a sort of "tak-tak-tak-tak-tak." During the weekend I was playing radio and I was trying to make contact with Morse code. My radio has a decoder. Just to give you an example in which in this case you have small sounds that are short, "dit," and longer sounds that are longer and they are "dah," and you will hear it. And the guy in a moment is giving some numbers and gives his name. He says "operator is..." So here is different, because we don't know the codes that neurons are using. And we don't have two symbols. For Morse code you have brief and long, it's digital. You also have the pause, but that's another story. For a neuron, you only have when the neuron is firing. And the interesting thing is, okay, when does it fire? It could be that it fires not once, it fires a given number of times, and so maybe the frequency of firing is making sense.

Now you will hear about one neuron that is very close to the tungsten electrode, so we only hear its voice. We are sort of confident that we only hear from one neuron. And the animal is staring at the screen. So you will be staring at the same screen. And in this case the recording has been done in the retina, in the outer layer of the retina, which is called the ganglion cell layer. I'm here and I'll ask you to pay attention, to try to do, although you can't because you don't have the Rosetta Stone, the dictionary, like I tried to do during the weekend, tried by ear to decode the message. So here the question for you is just be aware, be concentrated, just to try to understand when this neuron is responding. And the neuron is responding with a sound. You will hear—it's why they call it neuronal firing, *sparo*—you will hear it in a moment. Second is, not only when or what is the neuron responding to—maybe it responds when it's dark, maybe it responds when it's light, maybe it responds with a particular shape. Maybe some of you heard about the story of the "Jennifer Aniston cell." A few years ago, there was a paper showing that a patient, a human patient, awake, with an electrode, had one cell that was only showing, only firing, only responding, when the patient was shown pictures of Jennifer Aniston. It was not always the same picture. It could be Jennifer Aniston at the beach, Jennifer Aniston drinking coffee, Jennifer Aniston in the early morning. So it was not the same

picture. And that cell was not in the visual cortex; it was more in the associative areas, say, in the frontal areas. Listen. Here is different. But the question would remain: Jennifer Aniston would not be shown, but what features of the stimulus are exciting the neuron? And so, if you are very advanced, you could start thinking, assuming, and I tell you that these neurons are performing some sort of information processing, some computation, what kind of computation is it? So here it is. No. I want to use that loudspeaker. This is me, and it's not a mirror. *coughing* I'm going to go.

Do you want to see it again? Or do you have some ideas? Go ahead. "Naturalmente." (Naturally.) In fact, that's why they were trying maybe to have an elongated stimulus instead of a focused stimulus. Maybe they tried to change the size of the stimulus. They tried to make it dark in the center and light around. And if you were careful, you could hear that the neuron was firing sometimes differently, sometimes not differently. Go ahead. No, the retina, ganglion cells. And in a way, being in the retina means that it's already a major complexity in terms of information processing. It's not like a webcam. It's not a pixel of the webcam, for sure, because you could see that it was doing something strange. It was not responding to... So apparently there was one area that was indicated by, so it was written, highlighted on the paper, on the paper screen. I cannot write on this screen, otherwise they will kill me. So that one is called the receptive field. And people, so they actually tried to search for it, tried to see what is the area of the world, in the sensory part of the world, where if you have a stimulus there, the cell is responding. Because if the cell is around here or here, it's not responding selectively to that stimulus.

Let me show you it again with some commentary. It seems that it needs to be there, in the circle. But it seems that it's also responding when the light is much larger than the small circle. At least now, with this, it seems to be the case. I'll throw some random ideas because it's very, very interesting. And they could do, of course they did some quantitative analysis, but it was just because they could hear and they could see these correlations that they understood what these neurons were doing. And then of course it's about almost 70 years of research trying to understand how this is done.

One thing that you notice is that the neurons are also responding spontaneously when there is no light. They are not completely silent. Normally, so they have a spontaneous activity. Let me very briefly... Sorry... Ah... Spoiler... So even when the stimulus is not around, the cell is still having some spontaneous activity. Maybe it could surprise you, maybe not. After all, we are 37 degrees Celsius temperature animals. So there is some noise, and even the systems that we are building in electronics, they are noisy. So it's not a surprise that if you don't do anything, still the system is responding. But it's not responding strongly. Something that maybe those of you who are maybe musicians will hear is that when the light is on, you may hear some sort of "zzzzz" and then the sound frequency is decreasing. It's as if you hear this. So there is some sort of what is called adaptation, some sort of slowing down. And this is interesting because it's in all evolutionary sensory systems. You also have it in your skin. You have sensory receptors in your skin. And if somebody would grab you from the back right now, you would startle. You would be scared. You would have a reaction. There would be a reflex arc, *un arco riflesso*. It would be perfectly normal.

But of course, now you are probably wearing your shirt or whatever, t-shirt or whatever, on your shoulders for many hours. And you're not completely aware of it, but you still have it on your skin. It's because your sensory cells, in that case they are mechanoreceptors, here they are not light receptors because these guys are not really, they're not light-sensitive per se. It's the last layer of a chain of processing, but these guys are also losing interest. If the light is there for too long, at the beginning they respond, but then it relaxes. Because maybe evolutionary what matters is if a tiger enters the room. So it's the change. When the world changes, then I have to take notice. If the world is stationary, it's boring. But that's another story. And there are things that you might hear. So when the light is off, still you hear spontaneous activity. But look what happens now. So it seems that if you have light all around, but in the middle, in the same receptive field, you have darkness, then things are a little bit different. Could you understand? Could you not? Could you hear it? What was the difference? No, the retard that you feel is because when they are on the stimulus there is a rebound and the cell starts to fire. I will show you why it is crucial. You have to feel what you do immediately before the stimulus is given. No way. Could you hear it? It might have shut off. So if you have dark in the center and light around, it stops. And if you have one particular orientation or another one, it's the same. So any more ideas? Any other things that you noticed? You heard it on this slide, you have all the comments that we could make.

So, one is that there exists a space in the sensory world, in the world, that is called a receptive field. It's a field that, if the stimulus is there, the cell is responding to. So, you could probably imagine that other cells, so other neurons sitting nearby, would respond to a different receptive field. There is no orientation selectivity, suggesting that there might be other cells, maybe not in the retina, maybe there are other cells that would have some preference, some preference for a particular orientation. Here it's bright and here it's dark. So maybe it matters if you have these contrast differences. And the cell is firing nerve impulses, even spontaneously, but at a low rate. And another thing that was interesting is it's not doing it as a pacemaker, but it's doing it like a sort of Geiger counter, like in radioactive Geiger counters. It seems to be random. It's a random process. And just opening and closing a parenthesis about this randomness: Even Mandelbrot, the mathematician who studied these Mandelbrot sets, these beautiful things, fractals that you might have heard of, he was also studying neurons because of their stochastic properties, the fact that they are irregular and they are kind of unpredictable. And technically, the best model is a Poisson point process, for those of you who have vague reminiscences of stochastic processes in probability theory.

When the light is in the center, it fires, but when the light is around and in the center at the same time, there is a little bit of suppression. Sorry, no, no, sorry, sorry. This means that if you have the black spot in the center, so if the light is in the surround... So, we have a distinction between surround and center. It's a sort of ring, and then the center can be... so there can be light in the surround and darkness in the center, or vice versa. And if it's vice versa, it responds. If it's instead darkness in the center and light around, then you have suppression. So, yeah, the cell is firing normally spontaneously, but when darkness is in the center, it actually is also even suppressed, even below the spontaneous rate. And the cell fires if the light is everywhere. And something that I told you, it's

not... if I should depict it graphically, you will see that there is some sort of fatigue. So the rate, number of pulses per second, number of sounds per second, is decreasing in time. Please. Of course, of course, absolutely. The image that you see of me and of your colleagues is the result of a population code. Each cell is like this. It seems that cells are highly specialized, but cells are connected in a network. And the connectivity gives rise to these emerging properties. This one, it's only isolated, and we could understand that this one was specifically caring about that receptive field, and it was what is called a center-surround cell. And in this particular case, this one is center-on, surround-off. There are other cells in the retina, and the ganglion cells that are the opposite. They will be center-off, surround-on. So they would fire with a different logic.

And in the story of on and off or this center-surround, the fact that you have contrast, darkness around, darkness in the center, or if you have darkness in the center this one was suppressing, instead the other type with darkness in the center would be instead more excited, is the basis of one typical operation of image processing that maybe none of you today with this generative AI models, with Sora, with Gemini, whatever model for generating images, you probably never played with Paint software or Photoshop. But maybe you did, I don't know. Okay, something that is also important is that switching off the light causes a rebound. So when the darkness was in the center, the cell was silent, all was silent. But then when the light was removed, when everything was removed, there was some sort of rebound. So before there was some spontaneous activity, and also later there was spontaneous activity, but during the presentation of the darkness, there was silence. And then here there was a little bit more, like a rebound, like when a drug addict is not consuming his or her drug, then, when you remove this inhibition, when you disinhibit, it has a rebound. It has some sort of abstinence crisis. Here, in engineering terms, you can see that this is a sort of high-pass frequency filter. So, it actually doesn't want to respond to some steady input. It wants to take the derivative, and you probably know that the derivative of a step... Maybe you don't like the step. Assume that the light is switched on with some ramp. You know that the derivative here is zero because here it's constant in time. Here it's also zero because it's constant in time. The only time when the derivative is non-zero is here, when there is a peak. So these cells are doing derivatives. And of course, when you are switching off, so here you also have some sort of derivative. So these cells are still a high-pass filter and they respond to the change, to the transitions. And other cells are showing the opposite.

About computation, did anybody play with Photoshop? Or with any image processing things? Did you ever apply filters? There are filters to extract things. So there is one thing, if you can, if you have any software that could do some elementary image processing, try to play with it. If you apply a spatial derivative filter, which is enhancing whenever there is a contrast difference, whenever there is a light and dark, you extract the edges. So if you have a picture of my face, you will actually process it with this. Maybe I can try to do it, but I don't have Photoshop on my computer, but I will try. You end up with a picture, with a new picture, in which whenever there are areas that are not having contrast changes, they are dark, because in space the derivative is a derivative of something that is uniform, like here the derivative of a constant in time is zero. The derivative of an area that is roughly uniform is zero. But what matters are the edges. And

indeed, you would extract the edges. So the retina, it's an oversimplification, is an edge detector. Here you don't actually see it because with the edges, you would actually say, "No, look, I would like to have an understanding if the edges are vertical, are horizontal," because if they are vertical, I could probably say, "Oh, this guy has a big nose and it's vertical. It's in the middle of the face, so that must be a face." And by the way, this seems to be the way we recognize faces, but not in the retina. So for me to enter the room, for me it's very important to see vertical transitions, bright and dark. And something that is interesting is that retinal prosthetics, this artificial device that was implanted in the eye, since it was stimulating ganglion cells electrically, probably was getting for free some spatial processing, so these edge detectors. And so it's a contrast detector. It detects edges. Because in the end, you could probably... it's boring to see, with the exception of when I write, it's boring to see or to devote energy or information, even metabolic energy, to the world, to represent the world in your brain when everything is uniform, when it's not interesting. You have the impression that the brain is filling in, so you actually see that there is a wall that is white, but no cell is responding to the white. The cells, you have cells that are responding to the transitions, which makes sense because you have very limited resources. If you have to build a system with a few hundreds of thousands of detectors, maybe you want to optimize and not have something that is pixel-by-pixel related to the intensity; you want a way to extract some information that is relevant for behavior. I'll stop here by asking, and we'll start later, how if you could, even if you know nothing about how the retina is wired, but imagine that you have at least one layer that is photoreceptors, like a camera, like a CCD camera, pixel and pixel and pixel, how would you build the circuit for a ganglion cell to receive this information and to relay it downstream, to extract edges? How would you do that? Knowing that in the center there is a positive response, it's a sort of excitatory response, and in the surround you have some other field, and if you have light in the surround but not in the center, you are inhibiting the cell. We'll stop here for 10 minutes. Thank you. Thank you.

Section 2: The Neural Circuitry of Center-Surround Fields Okay, let me restart. Let me again ask you the same question about how we build it. How we build a system that is center-on, surround-off or vice versa. So, let me say that I have this... This would be the photoreceptors. Receptors of the retina. So here, maybe you can imagine that there are pixels. And here you have this neuron that is the one that you were recording its electrical activity from. And there is an area of the world on the screen that was projected through the lens inside the retina. So you could say the receptive field on the screen was actually mapped onto an area that was probably circular, because the lens is a linear system, and so unless there is aberration... Okay, it's not an ideal lens, so there will be some non-ideality, but on a first approximation, a circle in the world would be a circle projected in my retina. So you will have different pixels, different sensory photoreceptors. By the way, they are called cones and rods. *Coni e bastoncelli*. I believe that in elementary school, in primary school, you heard abundantly about that. I don't care about the... of the eye. I don't care. What is cool is that the cones, if I remember correctly, those are for the colors, are specialized in red, green, and blue, which is the typical... from the medical

bonus that you regulate. Again, if you're playing with Photoshop, this is what you play with. But that's another story.

So how would you make it in a way that... so this would be the surround, and again here you have a lot of other cells, and these cells are, they have axons, they have output wires, okay, and they are like all the neurons, they are very eager to connect, because being in isolation is a crack for people, cells, societies, countries, etc. And so, how would you wire, what would be the wiring diagram of this system, which I anticipate is not correct, but it doesn't matter. Just for you to do the exercise. So what you have is the possibility to distinguish between synapses that are excitatory and synapses that are inhibitory. An excitatory synapse would be a synapse that, if it's activated, will excite the target. For the moment, I will not tell you about... Maybe Zoli might have started telling you about biochemical signals and might have already told you about neurotransmitters, excitatory and inhibitory. Did he do so? Yes. So you know already about the story. So why? No. So glutamate and GABA, gamma-aminobutyric acid, are two of the main central nervous system neurotransmitters. One is excitatory and one is inhibitory. So you have that some synapse could, you could choose it. So you could have excitatory or inhibitory at your will. This may not be entirely correct, but that's what we'll talk about later. And this is your target. So this is your post-synaptic cell, post-synaptic neuron. And this is the ganglion cell that we recorded from. Hubel and Wiesel recorded from it. So this is... It's in the ganglion layer. It's a ganglion cell. And this is, for instance, surround-on, center-off. No. Surround-on, surround-off, center-on. That doesn't matter. So just if you tell me that here you want to have light, when you have light here, and these guys are activated, I want this guy to be excited. How do I do it? How do I connect? Can maybe some of you come to do that or you tell me how should I wire? So here I have axons. Give me some ideas. What's the difference? What's the difference in terms of cables at this level of understanding that I'm trying to pass to you? You have processors and you have connections. Connections are, I'm inclined to think they are feed-forward, so they are not recurrent. You don't have bidirectional connectivity, and they are feed-forward. So it's like the perceptron, although maybe you know or you don't what the perceptron is. You have some sort of algebra, that you have excitatory, which is making the post-synaptic cell go up, and inhibitory to go down. Down in a supposedly excitatory, excitation state. You want to favor or you want to depress. If I have an inhibitory synapse and I'm projecting to one of you, if I'm excited because you shine light on me, but the synapse is inhibitory, when I'm excited, I will secrete GABA and my post-synaptic target will be depressed, will be silent.

So what I'm trying maybe to inspire you to do is to see whether maybe you would connect the center with excitatory synapses. And the surround, if the surround is off, I made a mess here, okay, where the surround is off, so if I have light only in the surround, like the one that we have seen, if the light is here, these cells of the retina are excited, but this guy is silent. So I was hoping that maybe you could have said, "Okay, so this cell is going to be excited." It's a photoreceptor when light is invading it, but the axon is projecting with an inhibitory synapse. So all here are inhibitory synapses from the surrounding, and from the center you have the plus. You can try to think of this conceptual model, and it works. At least it works explaining some of the observations, not

all. And in fact, we know now that this is not how things work in the retina. But it's interesting because just by a simple algebra, you could have that some projections are like on a car, are accelerating, others are like brakes, and they are stopping the same neuron. The post-synaptic neuron, you can think of something that is making the summation. You could think of a capacitor, and it would not be a wrong assumption, that is summing inputs. The capacitor, as you know, it's an integrator in time, it's integrating the signals, and it's keeping memory, right? In the charge, in the plates.

And so, in order to get this, this is the same thing, but not with sound, but with traces. If the light is in the center, you see, before there was spontaneous activity, then here, this is when the light was switched on, the frequency increases, and here, if you squint your eyes a little bit, you see that here, the number of small pulses is with higher density. So there, I don't bump on the table, but I bump here. So it's... So here it's higher spikes or pulses per second, and then it's relaxing. Here it's... okay, here when you switch off, it goes back to spontaneous activity, which has even lower activity. Here, when the activity, when the light is in the surround, you see here it's truly silent. Well, not entirely, there was one random pulse emitted, but it's really suppressed. So it means that when the light is in the surrounding, you probably have to invoke some inhibition, some inhibitory mechanism to brake the same post-synaptic cell. So the connections, the wiring, might determine the function. And here is if you have light on the entire thing, what happens is that you have both at the same time, you have activation of both the excitatory and the inhibitory synapses. And the fact that here you have more spikes means that, okay, these synapses from the center are either more numerous or they are more effective, they are with a stronger coefficient. So yes, true, you are doing simultaneously the averaging, the arithmetic combination of both the excitatory and inhibitory inputs. Excitatory, I imagine, like positive numbers. Inhibitory, there will be negative numbers. Okay, here, the excitatory numbers are winning. Fine. Not particularly shocking. What was important for me is to push you at least once to try to think about these circuits.

Section 3: Higher-Order Processing in the Visual Cortex Now, I'll show you what happens if you record in the visual cortex. So, a couple of stations, of relay stations... I'm skipping the thalamus. In the thalamus there is a region that is called the LGN, doesn't matter if you know it or not. In the Hubel book, *Eye, Brain, and Vision*, *Occhio, Cervello, Visione*, it's indicated. So you have all these things explained in a very nice way. Here we are skipping the thalamus. We are directly recording in the primary visual cortex. Because as you can imagine, there is a hierarchy of areas in the cortex for vision. Like in deep networks. By the way, they were directly inspired by the visual system. So here is a cortical cell. And again, the question is the same. What is the feature the neuron is responding to? Where and what is it? And again, what are the specific features that are making the neuron fire or maybe be inhibited? And what computation? Is it the same computation? No? No? No. No. Okay. It will get a little bit better in a moment in the video. It's from the 80s or earlier. So it's actually putting some plus or some... So even here, you have a receptive field, but it's not circular. You have the same thing that when the light is on, you have a lot of spikes and then there is adaptation. And it seems

that if you excite a sound in the periphery, it's sort of silenced. Okay, it's not writing minus, but this is like the surround-off of a moment ago. There it was a ring, here there is a direction preference, also for the off-response. It's a little bit more difficult to hear because you have less spontaneous activity here. It doesn't work. You need to have the exact orientation, otherwise you excite both, you illuminate both the on and off centers. So it needs to be 45 degrees. If it's like this, the response is much less. So there is a tuning preference. The quality of the stimulus has to be tuned to the correct angle. If it's everywhere, it means the "off" part. And the fact that here you hear the rebound is because you are in the off part. Now you are both in the on and off part. So the on wins.

So this is called simple cells. There is one orientation. This cell was specifically responding to that, and this is another sort of silly cartoon for a wiring diagram having different ganglion cells, so these are different ganglion cells, each with its own receptive fields, they are particularly aligned on the same line. So, because these four cells have receptive fields that are aligned, if they all project with an excitatory or inhibitory synaptic connection to this cortical cell, then you will get this preferential direction-selective cell.

This is another example, which is more interesting. It's still in the visual cortex. Let me know if you understand what this is doing. What is this doing before the guy writes something that will spoil it? Could you see it? Only seems to be direction-selective... Ok, I spoiled it. Not only is it orientation-selective, but it's also direction-selective. It's only when the stimulus goes from right to left that you have the response. In the other direction, it doesn't work. It only works if you have something moving in one direction. You can try to think whether you can do a sort of circuit, a functional circuit like this. You will see that it's not trivial because what is happening here is that you have time. You have movement. So it's not that straightforward. You could try. It could be an interesting mental experiment. So in this case it's both orientation and direction-selective. Which is very cool.

Something that I mentioned last time, I wanted to clarify, I don't know whether... So I mentioned retinotopy as well as tonotopy. Tonotopy was in the auditory processing areas of the brain as well as in the cochlea. That's why cochlear implants are doable, are not easy, but they are doable. Retinotopy is the fact that points nearby in the world are projecting to points nearby in the retina, and they are, I tell you now, projecting to points nearby in the visual cortex. So in principle, if you want to restore vision in a blind patient, you could think of having a camera, and if there are two pixels of the world nearby, you could stimulate two points in the cortex that are nearby in the cortex. There is a small caveat which is interesting enough. We are over-representing what is in the exact center. If you keep your eyes straight, it's called the fovea. So it's not like a CCD camera. This one is 4K. It means that it has 4K, 4000 pixels, or 4 million pixels, it should be 4 million pixels, and they are uniformly distributed in the plane of the sensor. There is no area in which there are more. If you had it, you would have a hard time displaying the images because you don't have more pixels and your screen would need to accordingly have more pixels in the central part. We do that because when we read or when we have to do something very carefully, we need maximal spatial resolution. And so the only way is to have the largest number of photoreceptors. But in the periphery, you

can try, I cannot read. I cannot read these letters if it's, not only because I wear glasses, but I don't. I see that there is a bottle, and that's maybe okay for if a tiger enters the room while I'm looking at you. But if I want to read, I have to bring it into the fovea where I have the maximum resolution. In the cortex you have this sort of deformation which I'm not telling you about here. Many, many years ago they did an experiment with a macaque monkey staring at a screen while being anesthetized. So the gaze was fixed, there were no saccades, there were no movements, it was fixed. And immediately after they could process the cortex, they sacrificed the animal, and immediately after they processed the tissue and they could see where the areas of the visual cortex were most metabolically active. So they could basically have some sort of imprinting of the image, at least radioactively, to tell what's in the cortex, where the neurons were that were most active. And this, I admit that it's not a technique, or it would deserve more explanation, but it's not worth it, it's not crucial. There is some sort of deformation.

Section 4: The Brain's GPS: Place Cells and Grid Cells I'll show you another example of electrophysiological signals. These are more higher-order, they are not related to sensory systems, and they resulted also in a Nobel Prize a few years ago, it's about 10 years ago. John O'Keefe is a UK researcher who first studied the hippocampus and found something very cool that I'll show you in a moment. And then two Norwegian researchers that were, before they were a couple, Moser and Moser, who studied similar experiments in the entorhinal cortex. And they were, as you can see, this is not about vision, it's about behavior and cognition and navigation. And it was worth a Nobel Prize. But again, I ask you to pay attention. What you will see is not an animal. We will not be recording with electrodes attached to a loudspeaker. You will actually see the top view of a small arena in which a rat is moving. And the animal has one electrode implanted in the hippocampus. So the animal is not anesthetized. He is awake and behaving. And whenever there is, in this recording, a nerve impulse, just because I'm recording the video, I actually put where the head of the animal is in that moment, I put a small red dot. So if the cell, if I'm here and the cell is firing, then I put a red dot so that it will stay in the plane of the image, it will stay that when the animal was here, the cell was active. It will make sense in a moment. So pay attention. I'm asking you whether you can understand when or what this neuron is paying attention to, and what computation it might be useful for. Computation meaning maybe what kind of behavior, what kind of something that maybe you do, maybe not every time, every day, that you probably are doing.

So this is the top view. This is a big rat. And you see that the red dots are at that moment in time when there was a pulse recorded by the electrodes implanted in the hippocampus. And the experimenter is giving some treats, some food, so that the animal is exploring an otherwise boring arena. Typically after a while, animals are not exploring; they are getting bored. And there is one specific receptive field, if you want, that this hippocampal neuron is responding to. What is it? It's relatively easy. Any idea? No. I'd say I have no time, maybe I can replay the video, but it's not so complicated. Say now even when the hand is not there, ok, it's difficult because it's accelerated, but even if there is no one in the room the cell would perform the same way. It's only that the

rat may not be willing to move around. So it's only when the animal moves and explores the arena that something in the hippocampus happens. You know that you can even answer, even propose, I don't care, even if it's a crazy idea, I'm not saying, I'm not judging and remembering, "Ah, this guy was at the exam..." I don't care. I would love to invite you to think, to be critical, to formulate hypotheses, to try to be curious, to feed your curiosity. "Potrebbe avere ragione, ma non è." (You could be right, but you're not.) "E qui, purtroppo, la mano è disgraziata perché arriva sempre dalla stessa parte." (And here, unfortunately, the hand is a nuisance because it always comes from the same side.) Because you are thinking about the visual system, but it is not.

So these cells are called place cells. And the Nobel Prize was given and in the news—you were probably not even born, or you were born ten years ago, you were younger—and they said, "Found the Nobel Prize because..." because people explained the GPS that is inside the brain. GPS is the global positioning system that you use with your mobile phones maybe to find whatever pizza or ice cream place, *gelateria*, *antica gelateria*, whatever, where you navigate. So your hippocampus is specifically helping you to navigate because it allows me to orient myself, and there is one hippocampal brain cell in my brain now that is firing and it was not firing when I was there. When I'm here another cell is firing. So at every moment I know where I am. It doesn't come for free. I need a few minutes to explore the surrounding because I need to create, to integrate information about visual, maybe other sensory modalities saying over there there is a lot of noise and maybe there is a very nice aroma of chocolate or perfume, here there is instead a bad smell. All the information integrated gives rise to these place cells and it's surprising, it's fantastic that you have neurons encoding space. The... okay I'm not saying the Euclidean space but it's... it's amazing. And to make some sort of circuits like this for place cells is a much more, it's a harder endeavor. If you have 20 minutes, there is a nice TED talk from a few years ago by Matt Wilson, who is a researcher at MIT, that is also telling you that when you sleep, you are replaying the sequence of activation of place cells. While the animal, or even myself, is creating, is moving, is navigating in the environment, different place cells are activated in sequence, and when I'm asleep, I'm replaying the sequence. I'm replaying the sequence of activation, because this is, maybe it's something that I have to consolidate. I have to sleep so that memories are consolidated. Spatial memories. I need to go there, because there might be some chocolate, or there was a nice smell, or a perfume or whatever, and I might need to concatenate, correlate all the place cells that finally led me to find here the chocolates, and I was really rewarded. I have to remember the street. If you use a mobile phone, you are probably not having this. It's very cool because when you are still, when the rat is still, or when it's in non-REM sleep, you have this replay of memories. It was particularly interesting, I don't remember whether it is in this talk, is a collaborator of Matt Wilson that I worked with, I collaborated with when I was in Belgium. The animal, still awake, not sleeping, was replaying the sequence and people could see the sequence of cells replaying, possibly because the animal had to plan ahead where it wanted to go. Extremely surprising because it deepens the understanding of the mechanistic functioning of the brain.

I'll show you another one that is in the entorhinal cortex. Same exercise. It's a little bit more complicated, but it's still related to space. And I wonder whether

you see it. And this is particularly interesting. It is still for navigation, but you will see that it's interesting. Here it's a mouse. It's not a rat. And it's a smaller arena. And it's the same drill. I don't remember whether now there is food. There is no food. The wire that you see is because the electrodes are connected. And here you see again one small dot that is added to the image when and if the animal was there, there's a spot, and the recording electrode was detecting a nerve impulse. So clearly it's not one preferential spot, like a corner or like the front of the board here, of the desk. And after a few... this was... it's truly remarkable. It's a Nobel Prize and they got the Nobel Prize. It's amazing. For those of you who have some interest in science, or mathematics, or geometry, here it's surprising. I'm not, of course, it's not my field of research, but it's surprising that in the brain of an animal, you have some element of Euclidean geometry. Do you see what kind of, sort of, graphical, geometrical shape is resulting? So what I'm trying to delineate here is that it seems that these blocks of activity are not random, it seems to be at regular spots, and I could maybe build either hexagons or triangles. And maybe some of you, particularly if you had to renovate your kitchen or maybe your house, you know that in mathematics there is this idea that in order to cover a surface with a given geometry, I might have, depending on the geometry, if it's a triangle, if it's a hexagon, if it's a pentagon, I might have an easier or more difficult life to tessellate, *tassellazione* of a surface. And the triangle or the hexagons are the primitives that are able to tessellate, so to subdivide in domains, in regular domains, any surface, any flat surface, of course. That's why I kept saying a couple of times Euclidean space.

So these cells are called grid cells, for obvious reasons. And the grid, this is one cell. One cell has this tessellation, and another cell will have a tessellation that is might be rotated or scaled or translated, offset. It's what is sort of giving the underlying substrate for place cells. So it's only because you have these that you can get place cells. And again, you could, if you have grid cells, of course it will not be the retina, it will be some sort of space-effective domain, you could try to see how grid cells project to place cells in this sort of diagram, this sort of wiring diagram.

Section 5: Network Activity *in vitro* Something that we will also see is that electrophysiological signals can also be recorded from isolated portions of the brain. In this case, these are recordings done a few years ago in our lab, in which you don't have a rat, you don't have a mouse, you don't have a monkey. You have a bunch of cells that have been removed and digested enzymatically. They've been cultured. You probably know about cell culture. You've heard about cell culture. And these cells are plated on a chip, basically, like the one that I showed you last week. And these small things that you see here, small dots here, are the cell bodies. You don't see the dendrites and the axons because they are very, very highly packed. They are very tightly... the concentration of cells is very high. And because this is a microchip, these are metal electrodes. It's as if the chair where you are sitting is made of metal, like the example of an otherwise isolated antenna, an isolated conductor, and only here you have a metallization exposed, exposed to the electrolyte, or exposed to the bottom of some cells, like your bottoms. It's all very elegant, and when the cell is firing an action potential, it's not me with an electrode trying to pinch or to get closer to

the cell; here the cell is sitting on my electrode. And for instance, in this case, the cell sitting on top of this electrode, or maybe nearby, was, again, producing over a time scale of maybe a fraction of a second, producing a series of nerve impulses. Something that might be capturing your eye is that this impulse, it seems to be a negative deflection. Negative deflection makes me interested because it's a... Let's say some of them seem to be smaller in amplitude. So here, maybe, it's like having a microphone in the room. Let me actually see if this guy is still recording. Yeah. So it's like having a microphone and having two people talking simultaneously, but one guy is a little bit further apart. So there is attenuation; there might be some attenuation like sounds, or like charge, or like electrical potential. You know, there is some sort of attenuation with distance. One over the distance, one over the square of the distance. We are going to see it and discuss it or refresh it later today. But it's interesting that if I have one neuron here, and I have one electrode, so let me connect this electrode to an amplifier. Just because I want to impress you that I'm an electronic engineer, so I remember how to make amplifiers. That's all. We don't need electronics for the moment. It's interesting to see that this electrode is recording a signal that is like a negative deflection. So this is zero. It's probably zero microvolts. And this is probably minus 100 microvolts. So it's very, very tiny. You need a big amplifier to analyze it.

In solution, although we are going to discuss it, in solution you have, as you probably know, you have ions. And these ions can be positively and negatively charged. In the electrode, if this is made, say, this electrode is made of platinum and this cable here is made of copper, Cu is copper, right? Okay, so here you probably know that the charge carriers are electrons. Fine, okay, but it's interesting that here ions, say for instance you might have sodium ions and chloride ions, or you might have calcium. Okay, calcium will have double valency, but you might have positive and negative ions. Here the antenna is recording a signal that is negative. Why would it be negative? Well, why should this part of space be negative? Think of it. We are going to slowly approach this apparent mystery. It must be something about the distribution of charge inside and outside in general, and during when the neuron is excited and it emits a pulse. It's very interesting because it's the same language that you might have been seeing while studying semiconductors. In semiconductors, you have two charge carriers. One is the electron, and the other one, you know what it is? Have you ever studied silicon? *Lacune*. Holes. Yeah. So, it's not so different. You have positively and negatively charged carriers, and the analogies are many, so many, that even the pH, the acidity of a solution, that means if you have some proton, some H^+ , also because water is dissociated, so if you have H^+ , if you measure this, it's a measure of pH. There is some sort of equivalent in the semiconductor world. So the analogies... so at the beginning of last hour, because of the suggestion by your colleague, I mentioned that in terms of spatial scale, nanomaterials, nanotechnologies are even smaller, if not comparable, to biological processes. Well, it turns out we have even the electronics that is maybe speaking some language that we are used to.

I'm showing you this because even in this very simplified circuit, you have some sort of emerging behavior. Different spots here, different dots are from different electrodes. Here, here, and here we have 60 of these electrodes indicating when in time there is one of these peaks at that electrode. So, electrode number 1,

number 2, number 3, number 60. And time is in this direction, and what you actually see here that seems to look like fireworks, is the top view of an 8x8 array of microelectrodes, similar to the one that you held in your hands last week. And when there is a small explosion, it's because there is a small signal, like this. And you see that just by eye, looking here, there are situations like now where the activity is irregular, asynchronous, and epochs in which the activity is almost synchronous everywhere. Oh, and there it seems as if it's not tired. There is not a lot of spontaneous activity now, then it started again. And here in this other representation, this synchronized activity is represented by stripes. What I found interesting is at this point, you probably noticed that immediately after, there is fatigue. It's as if things get tired, which is what I mentioned before, knocking and saying, if I ask this population to fire a lot of action potentials, a lot of nerve impulses, after a while they will get exhausted. So they might need a few milliseconds to recover, which is... this is one stupid example, but I hope it will stick. It's disgusting. If you have these animals, the llama, you know that llamas spit. If you ask the llama to spit repeatedly, say 20 spits per second, after a while the llama will not have any more saliva in its mouth, so it will not be able to spit. But if you give it time, it will replenish its reserves of saliva. Maybe here is the same thing, and citing Professor Zoli's classes, maybe in the synapse that maybe he has shown or maybe not, the vesicles containing neurotransmitters, maybe they got depleted. So all the neurotransmitter was released and they got empty. So even if you ask, "Okay, release, release,"... All the other comparisons with urinary functions and other things will not be very elegant, so I'm sticking with a llama spitting, although it's a stupid comparison.

So, the fact that you have a network in a dish is hinting at the fact that you could study, in a reduced preparation, signals and how the signals are organized when you have a circuit, which is very interesting, very convenient, besides what I mentioned last week, that you could maybe build some sort of biological computer by having neurons in a dish, not anymore in the brain of a living animal.

Section 6: Macroscopic Signals: Electroencephalography (EEG) Instead of this microscopic recording with this microelectrode array, probably you're familiar with a more mesoscopic, macroscopic recording of the electrical activity, which I wanted to do, but in class I wanted to demonstrate but it's not really possible because of the noise. Later, I'll tell you why last time I had a lot of noise, but that's for another time. And this is called the electroencephalogram, and it's due to the observation from Hans Berger, that was from the last century, or the 19th century... well, the 20th century, in which by having an electrode, first he did it in a dog, in dogs, he had an electrode on the scalp, so very far from the actual brain. So not only you have hair, skin, bone, and then below you have membranes like the dura mater, the pia mater, so you have a lot of stuff before you start having neurons. But what he could observe is, this is one of the original traces, that you have electrical signals that are changing over time. So you probably are familiar with the EEG as a way to reveal rhythms. And what does it mean? Why? Okay, yeah, I get it that compared to what I did before or what Hubel and Wiesel did, they had one microphone and the microphone was in the mouth of one neuron, it was so close. And this is similar, more similar to somebody sitting outside the room. Okay, now you're very quiet

and I'm grateful for this. But if we were all talking and chatting, some people, somebody from the outside of the room, will simply hear some rumble. They would not be able to distinguish individual voices, they will actually hear the summated effect. Maybe even attenuated because of the distance. Like neurons are attenuated because the electrode is a surface skin electrode. And because of a lot of noise. So, yeah, it's a very sloppy, very poorly characterized signal. But it might be worth understanding or trying to understand a little bit because this is what in diagnostics people use, for instance, to predict whether you have some disorder of excitability like epilepsy or whether you have some sleep disorder or whether you have some sort of connectivity disorder. Schizophrenia, autism, would maybe reveal their signature on EEG. So for understanding first principles, forget it, it's too broad. It's actually, I want to speak with each of you to understand what you're saying, but if you want to simply classify as healthy or diseased, go for it, because people accumulated more than 100 years of experience for understanding whether this is normal or this is pathological.

So this is electroencephalography and we will sort of slightly go around, I'll tell you what it is, and it's for what I consider to be more like a classification. So you put the electrodes, hopefully you put the electrodes always in the same position, because hopefully you want maybe to try to compare different patients, different experiments, different measurements from different doctors, different people, different hospitals, different countries. So you may want to have a convention, and it's purely a convention, there is nothing to understand. In fact, I'm not going to tell you about this convention. And it's what you end up with, what people did, was simply observing. Okay, so the guy is sleeping. Oh, the guy is keeping his or her eyes open. Or no, the person is with eyes closed. Or the person or the animal, the rat, or whatever, is running or is staying still. And they could see that in different brain states, which I don't know if they are really brain states, they are conditions that are easy to classify, to recognize behaviorally, because if I think about my childhood now, how can you really be sure that I'm thinking of my child? If I'm snoring and sleeping, maybe you can say, "Okay, the guy is sleeping." So you characterize, you classify, it's purely a categorization. There is no understanding, but you can annotate rhythms based on their frequency. So if it's slow, like... particularly today I was watching a YouTube video where beta and alpha apparently are enhanced by practitioners of mindfulness. If you sit and you focus on your breath, your frequency content or your waves in the cortex of the beta band or alpha band, that means in the frequency component of part of your spectrum of your EEG, beta and alpha are higher than when you are instead doing nothing, you are scrolling Instagram or TikTok. Instead, if you are engaged in sleep, then your activity slows down. It's sort of getting so-called theta rhythm, or even deep sleep with delta and even slower. And people now start a little bit to understand, okay, but at the level of individual nodes. So, one node, what does it do when it sleeps? Does it also oscillate four times per second? Does it fire one pulse once a second? And the answer is yes. But it's very peculiar because all the nodes in the cortex are roughly doing the same stuff. So somebody sitting outside, if we were all clapping our hands with a rhythm, they would probably be able to get at least the rhythm, if we are all synchronized. If we are... probably you have experience, when you go to a theater and you clap, you're not synchronized with your peers, unless the singer or whoever is asking you to do so, is imposing some pacemaking.

And if there is randomness, from the outside, you will actually hear no rhythm, noise. If instead everybody is synchronized, then outside, so the EEG amplitude will record some sort of oscillation. So, yes, but they also need to be synchronous, like in vitro those stripes that I showed you in a dish, in a culture dish.

Part 5: Pathological Brain Activity: Epilepsy

Section 1: The Penfield Homunculus and Seizures Have you ever heard of the Penfield homunculus? Before the break, I would like to know whether you know what the sensory or motor homunculus is. Some of you are nodding. Just because in a moment I will discuss with you what happens when an EEG will actually see this, when the rhythms of the brain, so the signals that you can detect by EEG, they go completely crazy. They get synchronized, and when they get synchronized... Ah, I spoiled it. Okay. When they get synchronized, they get synchronized across in space. So they're actually invading the entire cortex. And the question is, this cortical homunculus, okay, I spoiled it, is where in the sensory area of the cortex—I think here is sensory and here is motor. Yeah. So, in different areas of the cortex, you have different spots, different surfaces of the cortex, devoted to different body parts. Both in terms of sensation, so tickling, or in terms of movement. And one question that I have for you before the break is: Do you know why hands are deformed? Or even the lips, both for the sensory and the motor, and the motor homunculus, which is a sort of graphical representation of what this mapping is. And Penfield is a neurosurgeon that was the first to, during surgery, neurosurgery, start stimulating the sensory cortex of an awake patient, and the patient was saying, "Yeah, you're touching me on my hand." "I know, I'm just electrically stimulating one part of your somatosensory cortex." Or, probably in an anesthetized patient, saying to the patient, "Why are you twitching your finger?" "I don't know, it's not me, it's not my voluntary control." "Yeah, don't worry, it's the neurosurgeon that is stimulating electrically with a small electrical pulse in the exact same area where your finger is mapped." So we have this map, and like for retinotopy, it's some sort of deformation. I would love if you could think of why hands are over-represented and also lips and tongue. 30 seconds, you have any idea? It's about evolution. Why? Why? Why? Sensory feedback, and we also have to have a very... not only piano players, but also us. We need to, in order to be dexterous, to be skilled with hands, with movements, we need to have big hardware. And the lips, I think, not for language, but because of food. So you want to know if it's very hot or if it's a scorpion. It's an interesting thing. I have to read if it's about... I don't think it's about... because in primates, non-speaking primates, you have the same. You have the same deformation. But it's definitely related to survival. So we'll stop for 10 minutes. And I'll change the microphone battery. Thank you. Which is what? But thank you. "computer vision e in generale in image processing esistono dei filtri, se avete fatto un corso di soluzione di reti neurali la parola 'convoluzione' vuol dire applicare un filtro lineare all'immagine. Quello che vi ho detto è per fare il detector di edge è applicare un filtro che sia una derivata spaziale in una certa direzione e nella direzione opposta e questo è un kernel. Questo kernel non lo so perché sono ignorante se se lo fanno lo fanno questo kernel, questo kernel è un filtro spaziale che è esattamente il circuito che avete implementato e molto probabilmente è

il finale della...” (In computer vision and in general in image processing there are filters. If you have done a course on neural networks, the word ‘convolution’ means applying a linear filter to the image. What I told you to do to make an edge detector is to apply a filter that is a spatial derivative in a certain direction and in the opposite direction, and this is a kernel. I don’t know, because I’m ignorant, if they do it, they do this kernel. This kernel is a spatial filter that is exactly the circuit that you have implemented and very probably it’s the final part of the...) Thank you. I think this. And you can finish every 45 or... Okay, so other two blends of topics or contexts that I think might be relevant when you study electrophysiological signals, particularly pathological signals, particularly something that, as I said, electroencephalography would reveal as a pathological signal: ultra-synchronized transients known as epilepsy. And I will show you a couple of videos without omitting the so-called graphic part, the part that will be maybe disturbing to some of you. But I wanted to just evoke the story of the homunculus because maybe you already know that different spots of your sensory cortex or motor cortex are encoding for different areas in the world. Well, the world would be the skin or the motor action. So also in this case, by the way, you can talk about receptive fields. The receptive field would be an area on my skin that would be, if stimulated in some way, mechanically, thermally, with pain, then I would have neurons in the corresponding cortex activated by it. But what I wanted only to refresh is that you know that you have some parts that would be, if you have electrical activity here, maybe stimulated by an electrode or maybe by some crazy wave of synchronous activity that gets generated and it spreads pathologically out over the whole cortex, maybe invading here would give the impression that something is touching your leg, even if you don’t have anything. And similarly, if you have activation, again, by an electrode, by somebody like Penfield stimulating like a neurosurgeon, or by a wave of synchronous pathological activity in your face, in the motor part of your face, maybe you will contract both, you will extend both muscles, and you will start having some motor actions that are clearly highly unphysiological. And from the behavioral point of view, would not be normal, would not be conventional, would not be something that you’re used to. Because normally, say for some motor actions, you’re contracting only one muscle and not both. You would contract the extensor or the contractor, but not both at the same time. Okay, you answered: “And if a wave of abnormal synchronous electrical activity...” further you understand that we could experience sensory sensations and even motor actions. And okay, the story about how it could propagate from one spot to the next... I kept drawing some axons and synapses and another neuron and a neuron with another axon, so it may not be completely impossible to understand that if the connection is for doing some computation, it is so intricate, and maybe just by chance as a side effect, it’s a system that can be very easily recruited for propagating pathological electrical activity. This is a nice video that you probably have been, I hope you have been seeing some variations on, in which if you have a set of metronomes and you are having some way to couple them, not by, in this case, by electrical synapses, by connections, but some sort of reading that is propagating vibrations and effectively coupling them, after a while, the metronomes get synchronized. So if you have a system that is highly densely connected and something goes wrong, it could explode, because all the elements could get synchronized, unless you remove some sort of medium for connectivity, for the spread of activity, for connectivity. Anti-

epileptic drugs either slow down the pacemaker, they make all the neurons fire a little bit less, or they try to interrupt connections. And clearly, I hope your objection will be: “Hey, wait a minute, the connections are there for me to talk, to understand, to reason, to love, to dream, so if you interfere chemically, maybe I will have side effects.” And this is indeed the case. So maybe in a near future, there are already many clinical trials, you will not have anymore a pill that is indiscriminately shutting down all the neurons. You will have a small brain pacemaker that when a sudden abrupt rise of synchrony is occurring, will try to desynchronize, like in this case it would be... could be somebody, at some point, shaking this, so that the metronomes that got synchronized would not be anymore synchronous.

Section 2: Epilepsy as a Disorder of Hypersynchrony So I’m talking about these abnormal rhythms and synchronization. They are relevant and typically very commonly described and measured by EEG, by electroencephalography. And it’s interesting for me to just to mention, if you’re not already familiar, epilepsy is a collection of many disorders that result in this sudden synchronized activity. So the seizure, *convulsione epilettica*, is just a symptom and not always can be treated by drugs. So one out of three people are drug-resistant, unfortunately. And this involves seizures, and I will show you a couple of types of seizures, which are sudden and excessive electrical discharges of the central nervous system neurons. And obviously because of the homunculus, of the Penfield homunculus, and not only that, because where is my sense of religion? Where is my sense? Where is my awareness? Where are my breath centers? It’s not only in the cortex, but for the cortex and the homunculus it’s easier to find. You have unexpected changes in behavior, in motor functions, in sensation and in consciousness. Whatever it is to be aware, to be conscious, to be able to receive information and react appropriately must be related to electrical activity. Unless you believe in the soul, but that’s a different story. I don’t. So if you have electrical activity that goes crazy, you might affect, not necessarily, but you could also affect consciousness. And it’s quite frequent, 1% of the population. There is also a set of epilepsies that appear in the pediatric age, and they tend to disappear. So I’m not asking if, but it could be that some of you, as a kid, could have had one seizure. And because of traumatic injury, you could even experience, I hope not, but in the future, all of us could experience a seizure. Even in Alzheimer’s, in dementia, there are seizures. There is some sort of excitability disorder. So a disorder of the electrical state of neurons.

So these seizures are typical events that last a few minutes, and if they don’t persist too long, they do not cause persistent damage. For the moment, we would not understand why there should be persistent damage. You could maybe, by some analogy with electronics, you would say, if my computer would be electrocuted, so there would be some sudden electrical activity in all the parts of my laptop, probably it will be fried. Some component will be broken, mechanically or electrically. It will be burned. You don’t have heat in the brain. You have glutamate, which is the excitatory neurotransmitter, which nobody really knows why this is the case, it’s also cytotoxic. So it’s toxic to the cell. Cytology is the study of the cell. So cytotoxic is something that would kill the cell. So if you have a lot of glutamate release, cells start to undergo cell death, apoptosis. And despite in the past, epilepsy was associated with stupidity, to witchcraft.

People were burning, so people were burned alive because they were thought to be witches or wizards, just because of epilepsy, and there is no relationship to intelligence or to violence. There is still a societal stigma that if you, I hope that maybe you know somebody suffering from epilepsy, yeah, they're fine. And there are two kinds. I will show you an example of petit mal and grand mal. The petit mal, they are also called absence seizures. Well, this one I will not show you the video. And you will see in a moment why they are called absence, depending if it's French or not. Instead, the grand mal are more graphic to see and in both cases consciousness is compromised. There are other seizures that instead are not involving... consciousness is not compromised. This is a typical EEG plot, different electrodes placed as I told you conventionally in different places of the skull, they record very large, so large amplitude and also fast oscillations, which is interesting that they get large, while before they were not large. And the comparison, it was a stupid comparison of us clapping our hands, synchronously or not synchronously, and somebody from outside the door, doing some sort of average of the sounds, would actually hear very prominently the bang of us clapping if we are synchronous, and not really large, in that case it would be auditory sound pressure, very strong when we are not synchronous. It's the same phenomenon, and I have another cartoon to show to you, where here we don't have... we have asynchronous activity. Millions are oscillating, they are firing, but they are firing in a scrambled way. So there is no summation, no big build-up. If instead they do, and they do everything... There is probably cell number two that started going crazy before, and the others are maybe following. How would you know that? Maybe some signal processing technique, like cross-correlation. If you ever played with signal processing, it would maybe give you, it's a linear technique of course, it would give you some hints about how delayed one signal is to the other one. Cross-correlation means that you quantify similarity, and it could be similarity but not at the exact same moment, so isochronous, but with some phase shift. And indeed, you could reveal that, say, electrode number two is earlier, the signal from electrode number two starts earlier. But okay, just to give you a glimpse that what you studied, or at least what some of you studied in your previous years, is very useful. By the way, even trigonometry, but we'll see that another time.

So I'll show you now a focal, which means it's not generalized, it's not invading the entire cortex, it's only focal. And this young kid, you probably can guess where he has the focus of the epilepsy. The guy is without... he's contracting, moving the mouth, so you probably can tell me which part of the cortex in the Penfield homunculus this focus is located. At least you can tell me whether it's the motor or sensory cortex. This should be easy. Motor. So it's a motor symptom. And obviously it's likely to be related. It's around here. Not that necessarily it's always easy to say, "Ah, yeah, I see." And therefore you do it with EEG, showing where it is located. And in this case it doesn't spread everywhere. It's... you know, it's very easy to understand something, something that went wrong with the population of neurons that started to oscillate at the same frequency as the motor symptoms. And something interesting is that it's not in this case, it's not spreading, although there are connections. For instance, there are connections between the motor and sensory areas. It's not spreading, it's not invading, luckily for this guy, it's not invading the entire cortex. So in this case consciousness is not affected, it's unilateral, it's localized. Of course,

it's unilateral, it's only in the left part of the face, in the motor areas, so in the cortex you have a representation of all motor and sensory areas of the body. And it's intermittent, and the fact that it's intermittent has something to do with neurons, and we will see later on when we discuss excitability. Why would a nerve cell be inherently starting to oscillate? Why is it an oscillator? And so this is clearly here, I'm not talking about one neuron, it's probably going to be millions of neurons nearby sitting here and being faulty for some reason. Maybe they got too hyper-connected. Maybe there is some fault in the genetics and when the neurons are firing, maybe some positive ions are accumulating too much and they are not able to diffuse away, like ink in a glass of water that would diffuse away. Maybe there is something wrong with, technically it's called ionic buffering, that means removing ions that are in excess, and this movement in the population starts to go crazy.

I'll show you now, it's quite... it's a little bit dramatic, but not as dramatic as a tonic-clonic seizure that I'm not showing to you, but if you're curious, have a look on YouTube. It's not... the person is not in pain during the seizure. Of course it looks to you as very unnatural. So it's not a surprise that people thought, "Oh, it's the devil that is possessing this person." But the consciousness of the person is gone. So clearly, if it's your brother, your boyfriend, it has an emotional impact, but the person is not suffering. So you could look at those videos on YouTube where people are showing them to say, "I'm not possessed by the devil, I'm not more violent, I'm suffering from a disorder of excitability." Here, it's typically the absence seizure. They are generalized, so consciousness is gone. It's happening several times a day, so they can be very disruptive for kids that are learning at school. They typically go away with puberty, so some sort of reorganization of the cortex and the thalamus is happening with age. This is known, so we know that the development of the nervous system in humans is continuing during adolescence, and I think up to 18, 20 years of age. And if you record the EEG, it's not this very strong, high-amplitude, ultra-synchronized, crazy EEG; it has a very peculiar peak that is called a spike, although it's not a spike like in an action potential in a nerve impulse, it's visually a peak and a wave. So it's a small needle and then a wave. Needle-wave, spike-wave, spike-wave at a very specific frequency, 3 hertz. When a neurologist, an expert in reading EEG, looks at this, they immediately say, "The thalamus is involved and this is an absence seizure." The thalamus, as I said, is the station that is in between, that is connecting sensory information and relaying it to the cortex. So you could probably understand that maybe the connections are not only in one direction; there is feedback, like everywhere in the brain, there is almost always feedback. So you have basically a station that is, just by some pathological state... If some focal epilepsy starts here, it can be recruited and it can spread the activity everywhere. Okay, the point is not relevant. It's only that the father is calling him again and again. In a moment it starts and he's blanking. He's not there anymore. Here it starts. And he does not have any memory, any recollection of what's happening. For him, time was moved forward by a few seconds. Now it's back. Imagine if you're at school, and now it starts again. Even with your accent... "did she send me the whole thing when I was absent?" The twitching of the eyes is also another interesting thing. It's gone. So this is quite dramatic and some of you told me about your interest in consciousness. Well, it seems that the thalamus and the fact that the cortex is

not completely synchronized and the thalamus is remaining as a relay station for sensory information and it's not going crazy like in this case, seems to be relevant. So here consciousness is gone and it's like a switch: on-off, on-off. So I don't know what consciousness is, nobody knows it. Only a little bit we start understanding it, and the route of looking at pathologies like coma, locked-in syndrome or anesthesia or some forms of epilepsy are relevant for objective information, also with the idea of treating, for therapy, of course, patients.

So this is an example of a generalized seizure. Again, it starts in one specific area. I really don't care about the positioning of the electrodes. As I said, this is a convention. You can learn it, and maybe after a couple of weeks you will forget it. Knowing that it's a convention might give you some hints that we don't really know. We know that if we do this always in the same way, we can compare it to the literature and to books, which is precious. So an experienced neurologist would say that this was a sort of event that looked funny, and this is the start of the seizure. What happens normally, and you will probably understand why, after having been confronted with the fact that you have the Penfield homunculus somewhere, and also that the brain is responsible for cognition, thoughts, emotions, memory, dreams, hopes, etc., smell, etc., it's all in the electrical activity of the cells. You can probably understand that at this stage, a few tenths of seconds, a few seconds before the loss of consciousness, patients are reporting the so-called aura. And typically they start responding, saying, "Okay, something is wrong. I start smelling something that is funny, that it's not real, it's not authentic, it's not real." It's clearly not real. Let's say there is nothing in the world that smells. And there are signals that are normally not compatible with actual sensory things because the world smells differently. If my olfactory cortex is activating synchronously, it starts to get activated in a synchronous way, maybe this does not correlate to any chocolate, any Belgian chocolate, but not even any food. Or I will start to feel, to have visual hallucinations. Again, we know that in the visual cortex you have cells that start to be activated if you have, in the world, light stimuli with orientation. So there is no surprise that maybe sometimes you can see a geometrical pattern. There is a nice book by... Ah, damn. He's a very famous neurologist. He died a few years ago. He was the author of *Awakenings*. It was a famous movie with Robin Williams. And he was reporting about hallucinations. In his case, because he was blind, but in general about geometrical shapes. Can you help me? Do you know the guy? No, you should read him. He's a very famous... I think he won the Pulitzer Prize for the book. So he was a scientist, a medical doctor, but he was also a very talented writer. Oliver Sacks. Oliver Sacks. Thank you. Thanks. Please believe me, he's a fantastic guy. Very humble, and he died recently. So, no surprise that you could see during the aura this, and report geometrical patterns. Now we know that you have cells that are encoding for orientations, etc.

At some point you have the tonic stage in which the motor cortex is invaded by... so consciousness is gone because you are, anyway, all the cortex is doing the same thing. And it's not a big surprise that people are reported, if you look at the movies, at the videos on YouTube, people obviously fall on the ground, this is the risk of injury, particularly if they are driving a car or flying a plane, these are the risks. Not necessarily the seizure per se, unless it happens very frequently. So there is a co-contraction of all the muscles and it starts

progressively and clearly it doesn't look real, it doesn't look normal, and of course it's not normal. And something that was always capturing my attention is the so-called epileptic cry. If all muscles are contracted, it's also the muscles of the chest for respiration. So if I have air in my lungs, it gets extruded and if my epiglottis is closed, I will have some sort of sound. And of course, people around will get impressed, but technically it's just the muscles that are all contracting, because the entire motor cortex is invaded by this synchronized activity. And then after this tonic phase, it starts the clonic phase, so some sort of rhythm that is activating muscles, all the actuators, so extensors and contractors, all the pairs of muscles that are allowing movements, start to oscillate. And so the patient is typically at the beginning after a tonic phase, has a clonic phase. Many videos of dogs, epileptic dogs, are on the internet, unfortunately. And you would be surprised that epilepsy or neurological disorders in animals are in general advancing, even psychiatric disorders, depression, schizophrenia, are advancing our knowledge on the same diseases in humans. And as a side effect, treatments for the animals are getting better and better. This was sort of inspiring. And here we have, again, that maybe it starts with a focus, maybe it involves the thalamus as a way to relay pathological activity everywhere. And so this is sort of... so it can start, okay, I should have said, it could start in the thalamus and spread, or it can start somewhere and involve the thalamus and spread everywhere. This is probably the future in which either a subdural, sub, below the dura, the dura mater, or intracortically... so, ah, sorry, we're done. Or DBS, this is a DBS array of microelectrodes, this is a surface subdural, they could be maybe wireless, but wireless is not, okay, it's striking, it's cool, but it's not particularly mind-blowing. The mind-blowing thing would be that if you have a brain pacemaker that is able to interfere, maybe you can disrupt synchronization. With a big electrical pulse, you would scramble things. It would be as if you start making a mess, you start talking. You're too polite, too gentle and too silent, so it doesn't happen. If I start shouting, maybe you will get, for a moment, you will get shocked by my reaction. So if there are neurons, maybe I can shock them and they respond and later on they will be tired. For a few milliseconds, I showed you, real neurons are getting tired, they are adapting, so maybe I can desynchronize a population of neurons going crazy by giving them a sort of reset signal. And there are some of these devices in clinical trials, they are not yet on the market.

Part 6: The Biophysical Origins of Neural Signals

Section 1: The Origin of the EEG Signal Now, what is the origin of EEG? We are getting a little bit closer during the course, particularly during the second half of the course, but roughly I can tell you that the EEG, already now at the level of this cartoon, is related to the activity of one kind of cell, those that are my favorites, the pyramidal cells. Rita Levi-Montalcini, in her memories, was saying that on the microscope, looking at different brain sections, so, resected brain slices of maybe humans or chickens or rats, whatever, she was impressed by looking at all of them within the cortex. And this is actually quite impressive. No matter how many times you do the experiments, you do the preparation, the cortex looks always the same with all the pyramidal cells aligned like this. So, this is where the hairs are. And this is where the white matter is in the ventral

part. Here is the dorsal part: the hair, the bone, the dura mater, and the pia mater. So they are all aligned in this way. She actually said that they resembled pilgrims walking along lines during a pilgrimage. Okay, it stuck in my brain and I wanted to tell you. And it's because these guys are aligned, they are aligned as electrical dipoles. Maybe you're familiar with magnetic dipoles, north and south. Sort of the same thing, although it's not magnetic forces or magnetic phenomena here. Maybe under some circumstances that we will see, the soma will get charged, say, positively. I'm talking about outside. And the dendrites will be charged negatively. And so this separation of charge will act as a dipole, and because they are all aligned in the same way, all the electric fields, vector fields, will summate. And if you have an electrode here, you will sense it.

If you are like me, you probably got extremely disappointed, saying, "Okay, yes, these cells represent the majority of the cells in the cortex. But the brain is not only the cortex. What about the thalamus? What about the basal ganglia? What about the base of the encephalon? The cerebellum. Who cares about the cortex?" Yes, it's probably evolutionarily the most interesting part. It's probably why we are human, because of our cortex... But come on, the EEG is only about one spot of the brain? Not only the surface, only 80% of cells, all the cells that have this geometry. What about all the other cells? There are many other cells that are also excitatory, and there are many inhibitory cells, which are here, and they are all making a very dense network. They don't count, they don't play any role for the EEG, because their geometry is not aligned, and their electric fields cancel out. Which to me is depressing, because it says, "Okay, so EEG may give you some information, but it's not the golden standard." On the other hand, this is the only thing that we have. Unless you go invasive, but ethically, unless you need to have some sort of implant, you cannot look at the brain invasively. Functional magnetic resonance has a very sloppy temporal resolution, and spatially, you don't really see the electrical activity; you see the blood oxygenation level, which is indirect. It's metabolic, it's delayed, and it's averaged, and it may have nothing to do with the neurons. So we will try to understand not the entire EEG, but at least how the so-called extracellular fields can be studied, given the morphology of a cell, and what happens for the cell to have here positively charged ions outside and far apart from the apical dendrite, negatively charged ions. This is where we can start understanding, and we will call this local electrical phenomenon, we will call it local electric field, or local field electrical potential, local field potential, LFP, instead of EEG which clearly involves a mess of the entire block of cortex that is below it. You probably know that the cortex, particularly the human cortex, is not flat. It's constantly a sequence of gyri and sulci. It's not flat. The cortex of a rabbit is flat. The cortex of a human, probably because we had such a large growing surface extended, has to be packed and folded. Like a piece of paper, I do it for the sake of science, like a piece of paper in order to have the same surface but occupying a smaller volume. Whoever will forgive me.

So this is a cartoon that I promised for only this cell. Okay, I'm basically neglecting all the other interesting interneurons, inhibitory neurons and other excitatory neurons that are not shaped like this for dipoles. And here you probably understand why roughly the same activity... So this is very stylized. You don't see any pulse, like I told you the neurons are emitting those pulses. But if you allow this poetic license, then here you have that this activity is very differ-

ent from neuron number one to neuron number two to neuron number three. So if you do the arithmetic average, the sum, you have the EEG on a first approximation, and you see that maybe you have, as a result, a small amplitude, high frequency signal. Small amplitude because it's never one transient... okay, here this is one big transient, but the other big transient for the other cell starts not in the same spot, it starts here, and this one has it here, and this one has it here. So they're not synchronous, so they don't sum up. So, amplitudes are small and they are at high frequency just purely as a result of this arithmetic summation. Not because the individual cells were firing or were oscillating at high frequency. Simply because of phase differences. And when they are synchronized, you actually see it and you have large amplitude, slow frequencies. These words of "large amplitude, slow EEG" or "desynchronized EEG, small amplitudes, fast frequencies" are what neurologists talk about all the time, because this is sort of their stereotypical language that they use qualitatively to refer to maybe some state, or learning state, that we don't understand. We understand partly why this happens and how it can be treated, if they're really synchronous or not synchronous.

Section 2: The Need for a Deeper Understanding I'm done with this long introduction, calling for bioengineering and neuroengineering to actually develop an understanding. So it's not that we want to, for the sake of science, understand the origin of the EEG and understand what happens or why, in this case it was a microscopic EEG, why you get a negative signal and then you get maybe a small positive bump. Why? I want to do that because if I understand slightly what happens, maybe I can design that brain pacemaker to interfere with epilepsy better, or I can have some brain-machine interface based on EEG, like most of the brain-computer interfaces nowadays, for people that do not have any invasive implant, work better. Today they are not suboptimal. However, it's a mess to understand, and it's not just the algebraic sum. So it's more than this, and it's very complicated because these cells are electrical devices. So the local field potential, that is what we are going to investigate a little bit. EEG and even the magnetic counterpart, MEG, are involved, and they are still not completely understood. This is a computer simulation of one guy and we are going to use... So this is from one of the authors of the book that I recommended for this course. And right now in the simulation he is activating only the soma. And the neuron here becomes red and the EEG, the simulated EEG or local field potential, shows a positive deflection. Let me see again. So, when you only have inputs arriving in the basal dendrites, then the local field potential starts to be positive, depending on which depth your electrode is at. If the inputs are arriving in the periphery, in the apical dendrites, you actually see it's the exact opposite. And if the input arrives everywhere, in a moment, for the simulation, the cells will start firing and communicating and getting bright, whatever. You almost record nothing. So, the naive expectation that on the surface, with this simulated output, whenever you see a positive bump, it means that you have one or the other activation, is wrong. It depends on the activation, what caused the activation, and where the synaptic inputs impinged and activated the compartments. Now it doesn't make sense, I only want to show it so that we can understand a little bit better. And the way to understand it involves understanding, first of all, that neurons are not points;

they are not systems that are concentrated in one point, although the point-neuron approximation is useful and we will use it. So neurons are distributed in space, like maybe a small cable and a ball, which is the soma. I'm particularly using the word "cable" because I'm a geek and I told you about my interest for Morse code. In the late 19th century, Lord Kelvin, the same guy famous for thermodynamics, wrote a mathematical equation for submarine electrical cables, bringing telegraphic signals, Morse code signals, under the ocean, because they were difficult to design or difficult to understand the variations of signals that are propagating through such long cables. Believe it or not, the exact same equation, the cable equation, will be used in this course to try to make sense of this local field potential. And it's surprising that it's the same equation as for an electrical cable. In this case, it's a biological cable. So the key point is, it's not a point, it's distributed in space, and it matters where and how the electrical activity of these cells is behaving. Right now it doesn't make sense.

Section 3: Biophysical and Mathematical Preliminaries I'm going now to start with light preliminaries. So we'll finish in five minutes and then we have the last hour. It's going to be light. I'm going to refresh some concepts from electrostatics and biophysics. Do you have questions so far? I invite you once more, if you have any questions, to come to me, to contact me. I don't care about repeating things over and over for you or giving you additional explanations of material. If you don't speak, I cannot deal with it. So my suggestion would be to start studying about these topics throughout the course. You don't necessarily need to do the exam in the first session in January, but do it. Because you have me engaged and active. Not that I go away in the second semester, I'm still here in Modena. But maybe we can refer and count on these, maybe it will work or will not, on the Teams chat that you could use as a forum to ask questions. And maybe some of your community will say, "I found this analogy useful." The one of the llama spitting was disgusting and was not very useful. But these other analogies helped me understand it. So please, count on me.

So let me switch to preliminaries and then we'll break. And for this part the slides are already in the repository; I posted them this morning. You could refer if you want to these two chapters in this book, particularly *Cellular Biophysics* and *Foundations of Cellular Neurophysiology*. I don't know whether all these books are... at least I know that this should be in the library, this one should also be in the library. If not, let me know and I'll ask them to buy it. And for no reason, look at... well, you could even consider buying some of these books. The idea is that they are supporting your studying and understanding. It's not necessarily that you will see here verbatim, word by word, what I'm saying. I try to make your life even simpler, even taking it and refreshing something that you probably already studied extensively in high school or during the first couple of years of your bachelor, at least the first year of bachelor in physics. And there are these four concepts. The first one is purely a convention, and I would like to... it's a nomenclature thing, and I would like to make, because, sorry, explaining it will give me the possibility to clarify some concepts. So, physicists normally always talk about the density of particles in space. Chemists talk about concentrations of a solute in a solvent. It's the same thing, it's a matter of jargon, and I will demonstrate it to you. Second, I would like to, since we have to talk about electrical potential and charges, I have maybe to

refresh basic electrostatics. So it's not Maxwell's equations, eh? Don't worry. It's maybe Coulomb's force and what is the potential of a force? What is the electrostatic potential? Third is something that you may or may not have heard of. It's mobility. I need to describe the ions that we will start looking at. I need to understand and to give a number to possibly measure if a fat ion swimming in a solution in the aqueous medium will encounter more resistance than a slim ion. I would like to give a number. This number I call it mobility, which is not particularly original. So the mobility of a particle in a fluid, in an aqueous solution. And fourth, again, this is another definition in the sense that it's me defining what I would love to describe. It's a flux or flow of particles in a fluid. Particularly because I want to understand whether maybe ions are going inside or outside or they go away. How do they work? How does it work? Because so far, particularly for electromagnetism, I know about forces. Okay, you have a particle, and maybe you are in an electric field, I know what force it is. But I want to understand how these things move. And to do that, it's very convenient to talk about flux. Flux is the biochemist's word for current. Those are going to be electrical currents. Well, strictly speaking, it's a current density, because it's per unit of area, per unit of cross-section. I imagine a river where you have water flowing, but this is nothing else than current. So electrical current, ionic current, this is resistance, electrical resistance, but I call it mobility, and all the rest are definitions or fundamental laws of nature.

And I'm going to use mathematics, like it or not. Okay, Feynman was even saying that it allows us to reason. So it's not only a language that is very precise, but per se allows us to make inferences, allows us to make discoveries. And it's true, if I can write something in mathematical terms, maybe I can then shut down my brain, shut down my understanding, and simply crunch equations, and I will derive consequences. And of course, then I go back to the experiment to see whether it works. Of course, I'm not claiming that you will have to remove your intuition. All my efforts, today and in the coming weeks, is to try to tickle both your mathematical preferences as well as your physical intuition. I hope that you will roughly feel that you understand in your stomach, and you can replicate it with a pen and paper on the blackboard with chalk. And okay, so this is a sentence that I already told you. Nature speaks the language of math, and it's beautiful. It's a beautiful language, so maybe we can try to use the same language. This guy was a Nobel Prize winner for quantum mechanics, was a very prolific author of books, of science dissemination books. Maybe you know this guy; he was playing bongos and was also very fond of opening locks or *casseforti e lucchetti*. I mean, these people are a bit original. But he was really a genius. I think he was the guy who is considered to have invented nanotechnologies, because in the 80s he gave some remarks in one famous seminar talk that he gave at Caltech where he was working, talking about the opportunities of nanotechnologies, when technology starts to build devices that are small, nanoscale small. So I will stop now for 10 minutes and in a few slides I'll use the symbol "remember" to tell you "this you have to remember." And I'll just only give you this so that you are scared. So I will ask you informally to remember or to learn for the first time the plot, the graph of three functions, because, say four functions. One over r , which is what people call a hyperbolic function. Okay, it's one over r . This one is the famous exponential transient. Okay, so there is one minus... Okay. And this is

the natural logarithm. And this is a linear term, it's a straight line. So you should be able, roughly, it's not that I'll ask you, "Here's millimeter paper," no, but roughly you should be able to plot these functions. Now that you're scared, we'll take a break for 10 minutes. I hope that you're not scared, but if you're scared, please come to me for mathematics. Thanks. Thank you. "ho caricato il giorno stesso però" (but I uploaded it the same day). I will be able to find the video that I have told you that I will find the description. What I've done is to make the description with Whisper and then put it into the... Thank you. Thank you. *pain* Thank you. Thank you. Thank you.

I'm sure that inadvertently, the other time I started at 14:00 and today it was the same. In theory, I would end at 18:45, so I have to put an eye on it for a little less than 50 minutes. If not, it doesn't make sense. If not, I'll start first and finish at 18:00. But it won't happen. Ok, so I understand that you are tired and I hope that the... I hope to make it... I'm interrupting often, I'm just giving you videos and questions to make it a little bit more lively. Please speak if you are too bored or if you feel from now on that the style of the class is getting too hard. Not today, in general. So I know that you are tired, but these are very simple functions. And so I'm not asking you to do the so-called study of the function, say $1/r$. The limit as a function of r . And I'm not asking you to take the limit for r that goes to plus infinity, or r that goes to minus infinity, or to calculate the derivative or the second derivative. These are functions that just roughly by eye you should be able to do. So this is not a course in advanced calculus, it's not a course in mathematics. So it's a rough understanding of these functions. So any idea about who is somebody willing to help me plotting $f(r) = 1/r$? You will have it on the slides, but if you want to challenge yourself, let me know what should I sketch. Okay, okay. So your colleague was making a sort of gentle curve, and indeed this is what I have in my head. Okay, maybe for negative r , but okay, negative maybe we will not care, because we are thinking of r as maybe a distance and the distance is only positive, but it is indeed the case. And again, you see, r is in the denominator, so when r gets very large, $1/r$ is getting squashed, it goes to 0. Yeah, okay, a mathematician would say it goes to $0+$. Fine, okay, it will go to 0 from this part of the plane. And for r that goes to 0 from the right, it goes to plus infinity, because $1/r$ is something that grows over and over. So I'm not a mathematician myself, but roughly knowing that you have this profile is very convenient and useful.

The other one is only present for the charge or discharge of capacitors. So it's not because I'm in love with exponentials. They are nice, but I'm not... I'm in love with other things, not necessarily exponentials. So, and the way I would, it's $f(r)$, what is it? It's $f(r) = 1 - e^{-\alpha r}$. The way that I still teach it to myself is looking at the exponent, assuming that α is a number, it's given, it's a positive number. You know that if you want to make me happy, the overall exponent of the exponential needs to be negative. Because if it's positive, you probably know that the exponential is exploding. And in biology, biophysics, I hope that nothing is exploding, particularly because I'm invoking the fact that the property that all physical systems should be dissipative. They should basically dissipate energy, so it's unlikely that things will go to plus infinity. Okay? So, if that $f(r)$ is the value of the membrane potential across, so inside with respect to outside of a neuron, I don't expect it to explode, to go to plus

infinity. It's starting to go to the other extreme where the exponential is... So, for r that goes to plus infinity, e to the minus... it goes to e to the minus infinity, so it goes to zero. So, you want to make me happy, check the exponentials, and this is also going to be relevant for differential equations. So, in that case, I know that the exponential, for r going in this direction... at some point, I will not have the exponential anymore. And as engineers do, a friend of mine made it very clear, saying engineering is not math, it is the science of approximation. So I would like to approximate things, and here I can see that it's the sum of two things. So even the graph, the plot, will be the superposition of two things. One that is always there, and the other one that at some point is not there anymore. So if at some point, yeah, ideally it's going to be at plus infinity, but in reality it's going to be on the order of $1/\alpha$, that is setting the scale of this equation. So here I only remain with 1. Because if r is so large, this can be neglected. If you want, you can do things properly, but yeah, I can see two pieces. And other things that I normally do, I test what happens when I put the argument of the exponent to zero. I do it because it's something that I always remember, what is the exponential of zero, that you all know is one. So if it's one, one minus one is zero. So, yeah, I should look for the concavity, but it's an exponential. So I know that it doesn't change. So the only thing that changes with r is this term here. And I know that it's something, it's an arch, that is either exploding or attenuating, going to dissipating, going to zero. So it's likely only going like this.

The logarithm, I think you know it or you don't. Logarithm of r . I'm on purpose using r instead of x , instead of t . So it may be that it annoys you a little bit, but it's purely just a variable name. So, fine, call it the way you want. It's purely a label. What is important is that I understand what is the independent variable, that is r . And you probably know that the logarithm, at least for real values, is not defined when the argument is negative. So the logarithm is the value that you have to give to the base, so it's an exponent that you have to apply to the base, that is e , in order to get the argument. It's the inverse operation of an exponential, and for an argument that is negative, it's not defined. You know, it's only one thing that you have to remember. And the graph of the logarithm is crossing this axis in one specific point. That is easy to remember. Do you know when, in other words, I'm actually searching for the value that makes... So where the logarithm is zero. So what is... One of my questions. So its value is one, am I right? So why it does not work... so I wanted to say what is the exponent that I have to give to the base e in order to have 0? It doesn't work, e to the 1 is 2.7 blah blah. Where is the problem? I have to think about it. But the plot is correct. I have to think about it. Again, it's not a course in math, and I will try to solve my own puzzle another time. And here for the straight line, you have one thing that is very important, is the angular coefficient, m . It tells you about the slope of the line, and then you have another value, p , that tells you where it crosses the axis. I don't remember it by heart. I simply say, "Okay, what happens if r is 0?" So $r=0$ means this axis here. So when r is 0, this term disappears. f needs to be p . So this is the value where the straight line is crossing the vertical axis. So these are crucial that you understand, that you remember that you are able to handle and to master roughly for the plots, for the graphs of these functions.

And another thing is the derivatives. So we're not talking about, well, we are

also talking about integrals, but these are the derivatives that I would love you to refresh and remember. You know that the derivative of a constant, any constant, is zero, and $1/x$ is another one that, yeah, you could derive it from the incremental ratio, but do you remember what $1/x$ is? It's important because it comes in Coulomb's force, in the gravitational force you always have $1/r$ or $1/r^2$, so this is somehow a polynomial with a negative exponent that is very important. No, I'm not asking for the integral, I'm asking for the derivative. So, in principle, you should write it as x to the power of -1 and then apply the rule. But it's, or vice versa, it's the ratio, say numerator and denominator, and you say it's the derivative of the numerator, which is 0, times the denominator, minus the derivative of the denominator multiplied by the numerator. So, it's 1, and because of that minus, and then you have here that you get x squared. So it's $-1/x^2$. You have time to refresh it. The derivative of the log is indeed $1/x$, particularly if it's only if the log is a natural log. And then there is also this property that is very important, which is to say that the derivative is a linear operator. So if you have the derivative of a sum or of a subtraction, of a difference, what is the derivative? Yeah, and would it be the same? If here I would put some coefficients, 25 and -30, how would it change? Linear, ok, you know everything. So it's linear. And the other thing that we are going to use is the derivative of a composite function, for instance in this case the derivative of the log of $c(x)$. It's a chain rule. I don't remember how it is called in Italian. *La regola delle funzioni composte*, but I don't remember if it's called the chain rule, it seems not. *C'erano i carabinieri un tempo, c'era la regola dei carabinieri, ma era un'altra cosa.* (There were the carabinieri once, there was the carabinieri rule, but that was something else.) Do you remember how this is... what you have to do here when you have a composite function? You take the derivative of the external one, and then you multiply it times the derivative of the argument. So in this case, it will be 1 over $c(x)$ multiplied by the derivative of c . Let me know if it... Okay, I could have had them appearing slowly, slowly. Okay, and this is the only thing that we are going to use. Even written like this. The derivative of the log of C , that would be the concentration. And it's very important, because this also gives rise to some relationship with Einstein, which he is remembered for. It's about diffusion. It comes from that simple trick.

And I think the other thing is the concept of integrals. When you have the limits of integration, you invoke... So you know that integration is the inverse operation of the derivative, and the indefinite integral is basically... You could also call it an anti-derivative. And so, when you have the limits of integration, by the fundamental theorem of calculus, you actually have the primitive, and you calculate the primitive at one limit, minus the primitive calculated at the other limit. Does it ring any bell? And now, because this one is a log, and again, we are going to see exactly this integral later on, probably not today. Let me put it back, I'll keep speaking up until 7, and you may not like it. So here we are going to have exactly the log, and it's a difference of logs, and you know that because of the properties of logarithms, if you have a difference of logarithms with the same base, the result is the logarithm, yeah, yeah, it's the log of the ratio. So this is going to be omnipresent. So this you will get acquainted with. And another thing that we may... so this is not crucial because we are only using... I want to give you an intuition of the electric field in terms of the gravitational field and I want to use the Taylor expansion up to the first

order. So a polynomial expansion up to the first order where I know that any function, any continuous and differentiable function, I can write it as the value around one point, so this is a number, this is like 27. So around 27, if h is very small I can approximate the function as the value of the function at that point plus basically a straight line, and this is the angular coefficient which is given by the derivative calculated at that point. It's the slope of the tangent to the function at that point. But this is not really crucial. We're not going to be... There is another way, another point in the next, probably next week, where we are looking at, maybe two weeks where we are using Taylor expansions, but maybe I'm not doing it. I'm only telling you that if you want, you can try.

And first of all, the differential equation, I tried to introduce this sign already last week. This is the only differential equation that I would love you to remember or to learn to solve. And again, you have this online refreshing video that, although it's my voice, it's a little bit monotonic and it's a bit boring, but I refresh different techniques, particularly when the equation is non-homogeneous. So when you do add some term here, and this term, say, for instance, is a constant. So if I read it aloud, this is a differential equation, meaning that the solution is not a number, so it's not an algebraic equation. The solution is a function, and it's a function such that when I take its derivative, I get the function itself. Okay, multiplied by some term, which is a constant, which is a number, a parameter. Okay, plus b , that's a little bit more involved. You need to be able to calculate the so-called particular integral. Or you do some heuristics. And the heuristic is that clearly the solution of the homogeneous equation associated with this ordinary differential equation is an exponential. Actually, it's a family of solutions. It's an infinite family of solutions. So this k is the one that you will fix by the initial condition. And here you claim that because here the right side, so this forcing term, depending if you're an engineer, you see this immediately as a linear system. So if this is the input to this equation, if this has the plus of being constant, then the solution must be of the same type, must be some constant. Now here I gave already the solution, but I should have called it big K . Something to identify, particularly by replacing this big K here and saying, "Okay, the derivative of a constant is zero minus A times big K plus B equals to zero." I can determine what K , big K , is. And we will not do anything more than this. You know that if B is instead a trigonometric function, then the solution is also of the kind of trigonometric functions. Actually, I think this is more general, and people were calling them *cisoidi*, *le funzioni cisoidali*. It means that you have trigonometric functions also pre-multiplied by an exponential, but we will not see that. And I remind you that if this b should be an arbitrary function, then the only way out is the convolution integral, which is maybe something that I... No, I did not, and I will probably only mention it once in the forthcoming classes. It's a filtering operator in the end, so this thing, this particular thing, as written like this, it's a low-pass filter. And, yeah, you need to remember that these exponentials are going everywhere, and that's why $1 - e^{-(t-r)}$, or times x , or t ... And you see that you will always see me being very worried when writing a differential equation, that here, the same state variable, F , appears here with a minus sign. If it's not a minus sign, then I get stressed because it's not a dissipative system and it can... it's exploding, and yada, yada. So I hope that with these stupid things, something will stick or will be refreshed in your brain.

Another thing that I will use is the orders of magnitude, particularly this giga, mega, kilo, so it's 1 billion, so 10 to the plus 9, sorry, 10 to the 9, 10 to the 6, 10 to the 3, and again, I will basically use milli, micro, nano, pico, and I remember, because milli is 3, I always go like this, I don't remember, so if you tell me pico, okay, maybe now I know that it's minus 12, but I do, so milli is 3, micro is 6, nano is 9 and pico is what follows nano. I cannot remember things by heart. There are of course exceptions because they are not in the MKS system, like the decimeter or centimeter. Fine, I remember that it's 10^{-1} or 10^{-2} . This will become interesting because I will constantly push you to check your damn physical units. You have one way to check whether you are correct if you can check and test the measuring units. If you are summing at some point apples and pears, something is wrong. And if at some point in a differential equation like this, you have that B does not have the units of something, say that instead of being x it's time, it's a differential equation with time being the independent variable, B needs to be something per unit of time, because on the left-hand side you have something divided by time. And so the units here need to agree. So you will see me obsessing with these things, which is just an easy way to spot possible problems. Something that I remember that maybe is familiar for those of you who like beers and who've been to Germany, where you get in these beer gardens, where you have, particularly in summer, it's fantastic, they actually bring you a glass that is one liter of beer. And I cannot drink, although German beer is good, I was used to Belgian beers, and with Belgian beers you don't drink one liter. Only to say that you have something that you can keep in your hand that is one liter. Because this conversion... that is... if all... both liters and cubic decimeters are all volume indicators, they are all measuring units for volumes, it's only that liters are something that is more familiar to chemists, that basically had to deal with liquids, and they got used to this unit. Engineers and physicists, maybe they got used to something that was measured with a measuring tape, and they use meters and multiples and submultiples. But, yeah, they are the same. And I kept forgetting, but it's one cubic decimeter because it's something that you hold, 10 centimeters cubed, you can hold it in your hand, and it's beer in Germany. I don't know whether this will help or not.

Section 4: The Resting Membrane Potential So why are we bothering with this concentration and density, mobility, electrical potential, and what was the other one, the flow, the flux? Because we have some investigative task for the couple of weeks that await us, that are the next two weeks. And it's, why if I take any cell, let me draw a cell, a neuron that gives me comfort. So I have one cell, and it's in any cell of your body, unless you are dead, and I will tell you why you could be dead, you have that conventionally, I'm referring, I'm taking the convention that is referring the electrical potential inside with respect to the outside. So outside is what I call conventionally, because potentials are defined with respect to a constant, an arbitrary constant, and I will refresh why there is this constant, why it is arbitrary, that I call it zero. So here it's zero millivolts. Inside your cell, all the cells of your body, there is an electrical potential that is non-zero, and it's negative. And for neurons, it's around minus 70 millivolts. There are different cell types in which you have minus 80 millivolts, minus 20 millivolts, and minus 70 millivolts is quite a lot compared to 3.3 volts of electronics or even smaller values of electrical potentials

in microcircuits, microchips, is even a fraction. So it's a lot. Why is it minus 70 millivolts? I want to understand why it's negative and why it is minus 70. The reason why it's there is because you are not at thermodynamic equilibrium. Lucky for you and lucky for me, we are not yet dead. And being dead means that there is nothing, no more, at least maybe transiently there is, but when you are really dead, there is no difference between you and the environment. There is no energy spent to oppose entropy. You are as disordered as the environment. What there is in the environment is inside yourself. And if you are a cell, basically the membrane is rupturing, or at some point, things start to flow in and out, and you have identical things inside and outside. You are nature, you are completely embracing nature, you are dead. But if you are not dead, if you are eating bananas and chocolate, etc., you have disorder, sorry, you oppose disorder, you create order by spending energy, and you create some sort, apparently, of unequal ionic distribution inside and outside the cell. That's the whole story, but I would like to understand why. The reason is not that I'm obsessed, it is because if we understand why, we can make sense of why not, and why sometimes this electrical potential might change over time. If I know the mechanism, I can understand if things are changing over time, whether the mechanisms could change over time as well.

This is one example that I showed you. I don't know if I anticipated that I would have shown some neurons. So this is an experiment that we did many years ago. Just a cell from the cortex of a rat that we explanted the brain and we cut the brain in slices very quickly so that the tissue was not dying. It was actually still alive. And we put it under the stage of a microscope that we used. This is called a transmission microscope because light is going through, it's transmitted through the sample. And we are using infrared light because infrared light increases contrast. After all, cells, you know, are water, made of water, and they are surrounded by water, so there is no contrast. If you see them with a normal microscope, you see nothing because they are transparent, made of water, so there is no contrast. You can get contrast by some technique that is called differential interference contrast microscopy, which I'm not telling you about, that gives this beautiful picture like craters on the moon. But these are sort of three-dimensional renderings of the somas of cells. So you see that each cell has a body and each cell in this case has a pipette implanted into its stomach. So here, what we did was a little bit more ambitious than what was technically impossible to do in vivo. Instead of Hubel and Wiesel that had this tungsten electrode, very tiny, nearby an electrode, so like a microphone was here listening to the extracellular signal, here we did more. We got a pipette. This is the sort of top view of a conical glass pipette that has been sectioned by light, just because the microscope is creating some sort of light section. So that's why it looks like a triangle, and it's empty inside, and I will tell you why it's empty. And we push it almost inside the cell, because I wanted to see, to measure the electrical potential inside. I'm not happy with outside. Outside is boring. Okay, the only thing I get is a very tiny signal of a few, say, 100 microvolts, but this is just me speaking and somebody from outside of the class listening. I want to hear the whole story. I want to enter into the stomach of this cell. And if you do, you measure it on a voltmeter, you measure a negative minus 70 mV. And people call it with some strange nomenclature compared to engineers; they call this polarization. They say that the cells were polarized in the sense that they

were not zero, so there was a polarization.

And sometimes this polarization goes away because these cells, particularly these pyramidal cells, in a time that is so fantastically small, and I'm fascinated by that because in a matter of a millisecond, or hundreds of microseconds, you have that this electrical potential can change very rapidly, incredibly rapidly for being a biological system. The world is able to commute and to open and close or to switch like a transistor so fast, and it's made of proteins, blobs, gel, ions, and the ions are moving slowly. It's not like electrons that are moving... okay, they are not moving fast, it's the electric field that moves fast in a wire. Let's say you don't have transistors that are operating at the gigahertz range. Here you have proteins. You have fatty acid molecules. What is changing so fast? And fast is fascinating to me because this is the time scale of thought. I'm thinking right now with action potentials changing rapidly over the time scales of around one millisecond. So the time of an action potential, this is called an action potential, as opposed to a resting potential, for obvious reasons. One is at rest, one is doing something, we don't know what, but it's doing something, is a fraction of a millisecond. Let's say half a millisecond. And it goes up to +30 millivolts. So minus 70 to plus 30 is 100 millivolts, it's 0.1 volts, which is remarkable. One... okay, now I had one banana but I also had a dish of pasta today. But still, it's not chat GPT and it's not my computer that is powered by an 80-volt power supply. It's with a few watts I'm able to sustain myself. So understanding why the hell you have -70 mV... if I can understand as a next step why the membrane potential can be changing in time, and it changes over time in cells that are called excitable. Neurons, some pancreatic cells, they are secreting hormones such as insulin, so the pancreatic beta cells. Muscles, of course, myocytes and cardiomyocytes. These are all cells in which the electrical potential changes, and apparently it's a trick that nature evolved to convert electrical signals into either information in the world of the brain, or motor actions, or mechanical contractions, so changes in reality, changes in elasticity. And because electricity is so fast and so easy to transmit, that was the way you could command and release, say having chemical release, so having chemical messaging and electrical messaging and mechanical messaging. So that's why there's this investigative work that I have to involve you with.

So it's essential, and if you are dead, you don't have this. This could be a question. You could probably say, "Okay, I could understand why this is -70 millivolts." Maybe your first guess would be that inside there are many more negatively charged particles than outside. It's a legitimate hypothesis. If you think carefully, you could also reach the opposite conclusion that you have a lot of positively charged ions outside and very few positively charged ions inside. And I would say you're close with both but it's more complicated than that. And the fact that in half a millisecond the membrane potential can change so rapidly leaves you with a question: how could it be? I mean these ions are fat, they have a mobility and this mobility is not so... they're not supersonic. They still have to swim, and if you are a swimmer or if you like swimming, you know that in solution you have friction, and this friction is quite remarkable. It's increasing the faster you go. So if you double the speed, the friction doubles. So it's Stokes' law. We will see it probably next week. So it's not clear how you could get something that is reacting electrically so fast with ions that are so sloppy. You can think, if you want, maybe you already

know how this happens. But first I'll start with an omnipresent description that is unfortunately adding a little bit of a degree of complexity that I don't like. And this comes because you have physicists as well as chemists dealing with this electrolyte. An electrolyte is a solution in which you have charged particles. And, I mean, both were studying these systems. Chemists, they studied electrochemistry. And physicists studied electromagnetism. And they used, unfortunately, different conventions and different words. So, you have some solute, which is aqueous. Maybe it can be water, and we have a solvent, which is what is dissolved in this aqueous solution. And you can basically refer to the amount of this stuff, these balls, these particles, in two ways. They are equivalent. You could count per unit of volume. So you could literally take a small volume. Maybe you want to take it very small so that you can move this volume here and here and here. You count how many molecules are there. And you express this as a density, something that you know already. So the density is the number per unit of volume. So you take the number and you divide by the volume. And you divide by the volume because you don't want your choice to be affected by that specific volume that you chose. So you normalize by the volume. And chemists did the same, but they were actually not using counts, because they were already aware that in solution you don't have, like in the solar system that you have, how many planets are there? 10, 15, whatever. So a few numbers. In solution you have billions and billions of particles, so it's not practical to count them, and they are used to using a different measuring unit, which is very similar to when you say half a dozen, *mezza dozzina*, or three dozen. So, okay, what is special about the number 12? Okay, instead of saying 6 or 24 or 36, I just make it shorter and I say half a dozen or two dozens or three dozen. It's the same thing, or you could say centuries, four years. You could say one century instead of saying 100 years. It's purely a matter of laziness, maybe, or of convenience. So chemists were using moles. Have you ever heard about moles, molar concentration? And so these guys were counting in numbers, these guys were counting in dozens, and they were also using liters instead of volumes measured in, say, cubic centimeters or cubic decimeters. They were using liters because they were handling liquids. And moles per liter is called molarity. And it's indicated by a big M. Instead, the mole is sometimes indicated by "mol," written m-o-l. So it's not the animal. So this is a mole, but it's a different mole. And it's a purely conventional thing. It's the number of atoms in 12 grams of an isotope of carbon. So, okay, and how many were there? It's the Avogadro number. So it's 6.022 times 10 to the 23 molecules. This is a pure convention. So this could have been in another... no, another universe, in another timeline where it was not Avogadro or other chemists, whatever. So if it was the Middle East, like it was highly developed in terms of mathematics, and particularly mathematics, I'm thinking of Persian mathematicians, we could have ended up with something else. But, okay, conventionally we are stuck with this Avogadro number. This is the reference. So they are used to counting in 6 times 10 to the 23 multiples, because molecules are so many.

I'll conclude here and we'll close it. So if I want to go from one to the other, the only thing I have to be careful about is that I have to remember how a liter is converted into volume, and how one mole is converted into a number of molecules. So these two numbers. So if I have a solution that is concentrated one millimolar, it means that I have one millimole per liter. So 10 to the minus

3 moles divided by a liter. Literally I express it with, okay, 1 cubic decimeter that I can write it as 1,000 cubic centimeters. And then, okay, I'll divide this and I can express it as 6 times 10 to the 17 ions per cubic centimeter. So here, there is nothing to understand. The only thing is that going from one world to the other, you have a conversion factor. That's all. For next time, although you do have it on the slides, the solution, try to see whether it's a very trivial thing that I do as an exercise anyway. So, okay, this is, apart from the way you measure the volume, be careful, so it's the Avogadro number, but the volume has to be carefully converted. I'll ask you to tell me how many ions would be in a spherical cell filled with 150 millimolar of potassium. Just try. It's the only thing that you have to remember is maybe the volume of a sphere, which fine, you can look it up on Google, on a book, but it's not difficult per se. Maybe you don't remember it anymore because you didn't use it. And another thing that is interesting, you could, if you want, you can ask, what if all these ions were not uniformly distributed in the volume but they were instead distributed just around the membrane, which is actually the case, because the solution is a conductor. What would be the surface density? So can you go from a volumetric density to a surface density? And we can see, well we do have it on the slides, but otherwise we'll see it next week together. Thank you, and as usual, if you have questions, please come to me, otherwise I will not be able to help.

Okay. Okay.

This is the third test of audio because the other time, despite the ambient microphone, the audio was not a great deal. I hope it *did* help you, but in this way, you should feel better here and I'm for sure able to provide this signal to the registration. Let's see how it is.

Announcements Three announcements. The first one is my personal curiosity. Has anyone read the material given during the first lesson on GitHub? The readings? The *Bignami* of Neurobiology, 2-3 pages. The book of Hubel, "Occhio, Cervello, Visione". Why do you think? Ok, ok.

Potete iniziare a guardare quel materiale. Non è, diciamo, deletario, è fatto per potervi dare degli elementi utili. Se invece sapete già tutto di neurobiologia e di elettrofisiologia cellulare a un livello divulgativo, eccetera, ignorate il mio commento.

The second comment, the second comment, the second comment is *legato* to my deficiencies. The other time I was *impantanato* to remember the definition of logarithm. The problem is that I don't remember the things I have to remember. The only thing I remember is that the logarithm is the inverse. *Se vi ricordate il mio*, I crashed because the mnemonic phrase didn't come to me: the logarithm is the quantity that I must put as the exponent of a certain base to get the argument of the logarithm. And here I am going to be because the logarithm of 1 is 0, and it is the only point in which this $\log(y)$ is remembered because it is the only point in which it is traversing the *asse*, intersecting the axes. And the other thing I have remembered is that for the argument that tends to 0 from the left, the logarithm becomes negative, becomes negative, becomes negative.

So the only thing I should remember is that the inverse is the inverse of the exponential. So if I apply it to the natural logarithm, which means logarithm

in base e , this means that here remains x . You can also think that this is a rule that makes it a logarithm and becomes a logarithm in base e , e^1 , or, or, is the inverse. *E quindi qui c'è scritto che questa roba qua è l'esponente da dare alla base per avere l'argomento.* If the argument is 0, what is the exponent that I have to give to e in order to have 0? I am going to write it again. It is the contrary. What is the exponent that I have to give to e in order to have 1? $y = 1$, e^0 , $e^0 = 1$.

Anyway, third *annuncio*, interesting or less. During the first lesson, I told you that with that small amplification of electronics, I was able to measure an electromagnetic signal in a very banal, very *rosso* way, and I was not sure... I have a card of aluminum for food and I have all the circuit, of which I had no time to create something like that. So my operational amplifier with its various things, and its various electrical, was a different one. Two electrical and ground I applied to my body, and here there was the exit from the reference. I made a kind of *carte* and I've covered this circuit in the card. Do you know why I had this idea of getting into the card? If you've ever heard of it, I would like to make two words.

Ok, *e vi dice qualcosa se io dico "gabbia di Faraday"?*

The Faraday Cage It can be demonstrated, but we will not do it, maybe you have seen it in some course of electromagnetism, that in reality, dependent on the frequency of the electromagnetic radiation of an arbitrary electromagnetic field, at a certain frequency, it is possible to shield what is inside. And in some way, it has to do with Gauss's theorem; in some way, it has to do with the fact that in a conductor, the charges are arranged, at least in a static, quasi-static way, in a static, quasi-static regime, they are distributed on the surface, not inside. And therefore, it is used to shield electrophysiological recordings.

And if you come to the laboratory, I'll show you that we have, apart from anti-vibration tables that are optical tables—they are tables to avoid vibrations, but that is not a big problem—but above the table, we have mounted a Faraday cage above each table, which costs a *botto*. I am from Genoa and I am sensitive to these aspects because aluminum costs *l'ira di Dio*. In effect, in some cases, instead of an aluminum plate whose thickness is not the *stagnola*, which is even thinner, I believe the paper is about 0.2 mm of *spessore*, in the case of aluminum, more than 1 mm or 2 mm of *spessore*, it is very *pesante*, it is extremely tight and therefore it is not particularly practical. So people use literally some of the *reti da pollaio*, that will be smaller than the wavelength of the electromagnetic field that you would want to cut off.

I will show you that the interference based on the cell phone is of the order of the cm, is of the order of the centimeter, so I have a fraction of a centimeter if the frequency is of hundreds of megahertz. For this to do it, I don't know, I remember the speed of light and I can, given the frequency, find the *lunghezza d'onda*. This is the same goal.

However, the key that I have not done at home is that this *scatola*, this and this is a point of... On the other side, there is a cable and I can attach it to the oscilloscope or to the *aggeggio* that was a digital-analog converter, digitized, that I would attach via USB to my computer. What I've done is I've *pinzato*

this alligator, which is called alligator because it looks like a little alligator. I've *pinzato* the wire, because I wanted to contact the zero ground, but I've *pinzato* the *schermo*. I've *pinzato* a piece of paper. This has probably put all the same level of potential, the entire surface of the external surface was not *more*, in other words, "*appesa*", as it says in terms of technicality, "*appeso*", not "floating", and therefore I could have been able to be exactly the same potential as I made my measure.

It may be or may not be of interest.

If there are problems—now, none of you has contacted me, we haven't been doing anything particularly math, we're going to start a little more—I'm at your disposal. Don't expect necessarily the day before the exam, in which maybe I won't have much time to get into it. So if you can, if you want, if you need, you know where to find me.

Let me switch to English. And so, two questions for you.

Review: Membrane Potential and Avogadro's Number Do you maybe remember that last time—this is very key, it's a fundamental property—last time I said that all the cells, unless you're dead, unless you are at the thermodynamical equilibrium with your environment (so you're not any more distinct from it, you're completely whole with nature, and you're not Buddhist, so it's for really important things). Every cell has a difference of electrostatic potential inside with respect to the outside. Do you remember this?

And do you remember whether this difference of potential is negative or positive, assuming the convention that is inside with a reference that is outside the cell?

Okay, so you even remember the number. So I don't want... So this is really, really key. So it's negative. And for neurons, it's roughly around between -60 , -70 [mV]. Other cells might have different numbers, but it's still always negative. I'm not aware of any cell that has this difference of potential that is positive.

It's very important because it's a way employed by living matter, by biology. Evolution found a way to make, through possible pores... I'm indicating the door because I'm thinking that I'm making in my mind the stupid analogy that this is the inside of a cell, and if I want to traffic molecules or stuff or food or whatever, coffee, whatever you eat and drink, maybe it's good to have not only doors, but force fields that are maybe working to move stuff from inside, from outside to inside, or vice versa.

Of course, you might have other mechanisms, devices like ionic pumps, and we will see at least qualitatively (maybe Professor Zoli might tell you about them), that are spending energy. And it's... I'm imagining outside a club there is one big muscle guy that is against maybe the electrochemical gradient and is actually taking in or pushing out stuff from inside the room. But that is consuming energy. Instead, if already *per se* you have some sort of electric field, say you have wind because we keep the windows open and just for free you get food in, this is easy, easier, and it doesn't cost energy.

The second thing that I would like to ask you is whether you remember the Avogadro number that we briefly mentioned. It's purely conventional, so there

is nothing deep there. And I remind you this is the number of particles or molecules in one mole of matter. So this is in a way the convention. I call ‘mole’ a stuff that contains, say, an amount of sodium ions or about, say, whatever, water molecules, about chocolate beads, whatever, that have as many elements as the number of Avogadro. Do you at least remember the order of magnitude? 23, okay, 10^{23} . That’s it. It’s just this rough intuition that I would like to push you to develop. Not necessarily to remember things by heart; it will be gone. But at least a little bit, just a couple of things, it might be worth investigating.

Review: Concentration vs. Density Problem Did you have troubles attempting at this problem? I assume that the only thing that you had to do in order to answer the question, “if I give you the concentration, can you go back to the density or to the absolute number of ions?” is to remember the Avogadro number, to be careful, and to remember that chemists are friends. They simply had different units and they use litres instead of cubic centimetres, for instance, for defining their reference volumes. And so millimolar is referred to one litre.

And the other thing is maybe the volume of a sphere that you all remember being... Just to be always sure, if it’s a volume, it’s likely to be measured in cubic meters, cubic centimeters, whatever. Liters is also a measure of a volume. So there must be some r^3 or there must... in terms of units. So, okay, $4/3\pi r^3$, it’s been, for me, imprinted, I don’t know, in one, I think it was the elementary school, and it was such a very bad experience that I got it imprinted. But you can check that makes sense that this is a volume, and so indeed, the radius of this small cell, spherical cell, is micrometre, so it will be cubic micrometre. In this context, it’s stupid, because of course, this is the context so I can convert it to...

I did not convert. I simply made the multiplication $4/3 \times \pi$ (3.14 blah blah) and then the other thing is that I went to this answer remembering the conversion factor and this glass of beer that you get in Germany that is one liter and is one cubic decimeter, and you can convert it to cubic centimeters if you want.

So it’s a huge, huge number of ions. So it makes sense that maybe you want to call this concentration 150 instead of millimoles, so it seems to be relatively small. It’s OK. It’s actually quite large concentration for being inside the cell. Normally you don’t get such a high concentration. And instead of talking about 18, 19 orders of magnitude, numerous molecules or particles.

If you didn’t try, I mean you have all the steps. And even for the second question that is: assume that all these ions are distributed in the surface. So they don’t stay in the room, in the bulk, but they stay close to the interface with the outside, because maybe the inside is conductive and maybe it’s like when you go to the cinema and you don’t want to stay... Yeah, this is a stupid comparison. You go to a cinema, you don’t want to stay close to your friends because they are not friends, they are enemies, so you try to maximize the relative distance. So if you go to the cinema and you are an ion, a sodium ion, you are going to be repelled from all the others and you will repel the others. So they don’t want to stay together. They will be trying to maximize the distance, the relative distance. So they will be accumulating at the surface, at the inner side of the membrane.

And it might be worth just roughly understanding what is the order of magnitude of ions when they are concentrated there. Try. It's stupid. It's very silly. But it may reactivate, unless you have it already engaged, it's a mental mechanism of simply writing and doing algebra and being careful not to make mistakes.

So after this first concept of purely conventional equivalence between concentration and density, we are going to work, you will see today, with these two concepts interchangeably. Mostly we will be talking about concentrations because it's easy to refer to an actual experiment.

Electrostatic Forces: A Review I would like to talk about, to refresh, because you certainly are an expert, about the electrostatic forces, particularly the **force of Coulomb**, a French scientist who first described it, and the associated things. So you have a **force**, you have a **field**, and you have a **potential**. It's not that every time that you have a force, then you have a potential. You probably vaguely remember that's what I'm referring to. And I would like just to refresh this, telling you again about the gravitational force and the gravitational force field and the gravitational potential, because the gravitational potential is something that you have, particularly if you go with a bike, you are very comfortable with.

Analogy: Gravity So again, let me first talk about gravity. I don't know why I got this meme. It does random gravity checks. So this guy is Newton, and in terms of gravity compared to electrostatics, it's a little bit easy because you only have one type of mass. I'm not a physicist, so I'm ignoring antiprotons, antiparticles, so I have no idea whether the antiparticles are... they presumably are only antiparticles in terms of electric charge, not in terms of mass. I know about dark energy, but again, I'm ignorant in physics, so I'm only sticking to this classic description that Newton, one giant in the field, had to cope with and intuitively got it. That is, you have mass and the mass is attracting always.

How much? It depends on how the two masses in this case are far apart and how big they are, how concentrated, how dense they are. This is very silly, but I'm just using it just to remind you that forces require vectors. That means in one given point if you want to express quantitatively a force, you have to give me, say, in a Cartesian system, Cartesian axis system, you have to give me the three components. Because I have to identify an arrow. That means a direction and *verso e una direzione*. I don't know how *verso* is in English. So a direction and where the vector, the force, would be pointing to.

In this case, vectors are easy because the direction is the one that is going through both centers of each of those planets or those particles, those masses. And the *verso*, so the direction where these forces are pointing to, is also easy because it's only attractive. So this should be easy, and you probably know that this is a very famous expression for the force, which reconciled planetary motion and motions on Earth.

So, famous apples that are falling from the tree is governed by the same thing that makes planets going around the Sun or orbiting around each other, described by Kepler's laws, but it seems to be as a different thing. The Kepler's

laws were okay, they were phenomenological. Also, this is phenomenological because we don't understand gravity, at least I don't think that we understand gravity in a very fundamental way. So this is describing in a unified way. And you know that the force, you remember, is proportional to how big are the masses, according to the product, and inversely depending on the square of the distance. And there is the famous gravitational constant that I don't remember, I don't indicate it.

So I indicate like this the intensity, the norm, the modulus, the amplitude, the intensity of the force, because the direction and the *verso*, the direction and the way they are pointing to, are just mentioned verbally. No, the direction is the line that is connecting the two centers of masses.

And sometimes, like particularly say when you have really, really big masses in astrophysics, maybe you don't want to deal with a property that depends on both. If you have two masses, you want to say, I want to have something that is a property of space. This is a very deep concept in physics, and it's when you switch from force to **field**. So, yes, you put a mass in one spot, and then the space starts to have, depending on where... there is a symmetry, of course, like this shading that is a little bit grayer in the center and lighter in the extreme. It's a property of the space. How much? If I place a test particle, a test mass here, then I will experience a force directed in the direction to connect in the minimal direction, in the minimal distance direction, connecting my test mass to the center of the bigger masses, but it could be even a small mass, it doesn't matter, and the direction is attractive. So the sign is attractive.

When you do that, you want to basically, assuming that the mass here is the big M and say is the mass of our planet, you want to normalize, you want to have some description that is no longer measured in Newtons. This would be the measuring unit of this thing, which is going to be Newton. It's not going to be Newton anymore, it's going to be Newton per kilogram because I don't want to have something that depends on my test. I want to use any test, so I want to go to this description that I indicate with E . And you see there is no small m . But I can go if you give me the field, I can get the force and vice versa.

Does this sound completely unfamiliar to you? Probably not. Okay, so you're not too scared. Let me remind you. Okay, so Newton per kilogram.

So the other ingredient that I would like to mention, to refresh you, is that some force fields, they are **conservative**. That means that the work done to move one particle from one spot to another one depends only on the initial and the final position, not on the trajectory. You know it well if you are biking because you love to stay at some... Okay, I'm spoiling something that comes later. So those fields that are conserving mechanical energy are called conservative. And I'm just giving you as a fact. I'm not proving it. I don't even remember how to prove it, although I knew once many years ago.

You can go, you can get rid of the complexity of vector fields. The fact that in principle at every point in space you have three components. And so it might be a little bit complicated to handle and to manipulate and to make calculations on vector fields. So if there is one scalar field, one numerical quantity, that's fine. Okay, in every point might be different, but it gives me just one number,

not three numbers, one number that is called **potential**. Then I can maybe use it more conveniently.

The point is, okay, how do I have, is it possible? For this conservative force field it's possible. There is a function, it's a function of the point. Okay, it might change also in time, but it doesn't matter. That is such that if I take its derivative, or more correctly, the **gradient**, so the derivative with respect to space, and of course in 3D it depends, okay, so which of the three directions you want to take the derivative? You want to assess how these things are changing in space. So you have to tell me where. And you maybe remember that in vector analysis, you have the gradient. You don't have the ∇ operator. You have this thing here. And you don't have necessarily the derivative. Well, in a case of a spherical symmetry, yes, you have. And we will actually stick only to spherical symmetry.

And you also remember that this is basically, since some derivative differentiation operation is involved, I could define V , well, I cannot define, I can spot V , but also V plus any constant, 25 or -52 , would work equally well. Provided that this constant is constant in space, when I take the gradient, or the derivative with respect to r , it's the same. So that's why we say that this potential is defined apart from a constant. You should all be familiar with these things.

And particularly, I remind you that we conventionally, I stress it in a moment a little bit more, we call zero gravitational potential the level of the sea, purely by convention. We claim that at the level of the sea, the gravitational potential is zero. But yeah, okay, you could have made any other choices. So in other words, you add or subtract something so that the position r where that's potentially zero, sorry, where, no... So at that position, say at the level of the *sea*, these V and the constant are, say, cancelling and you get what you want, that is conventionally you call it zero. So through tweaking of that constant, you can say that at this point the potential is zero and it's an arbitrary choice, there is nothing magic. And mathematically is written there. You go from a scalar field to a vector field because basically you have a gradient.

The other catch is that for this definition we consider **minus**. So the potential is the function such that when you take **minus** the gradient you get the field, the gravitational field. And so for instance, without particularly being a genius, if you consider this mathematical expression and you remember one of the few derivatives that I asked you to remember, $1/x$, okay since here the independent variable is r , if you take the derivative of $1/r$, you probably know that is $-1/r^2$. Of course you can derive it properly that you have to take the numerator, you multiply by the derivative of the denominator, etc. But say it's one of the few derivatives that you could learn, you could remember by heart. And indeed if you define $-Gm/r$, when you take the gradient, you take the derivative with respect to r , and you change the sign, you go back to the expression of the field that is Gm/r^2 . So r^2 is always there in the field and in the force. In the potential it goes like $1/r$, which may or might not be deep as a concept but it's a consequence of this.

I don't know whether it's now or later I have a very silly meme where you will see that one person is maybe overwhelmed by working with vectors but with scalars it's a different story, it's easier. I have also a demo to show you. And

okay here you get back what I just said.

So something that we can do, we can just to motivate something that you might learn or remember mnemonically, that masses (like your bike) move in the gravitational field of the planet from points with **higher** gravitational potential to points with **lower** gravitational potential, from higher altitude to lower altitude. It's the same thing because the force field is attracting and is attracting everything to the center of the planet and that's why the potential is... as more when you... is negative and when you increase the distance the potential is getting smaller in absolute terms. And in fact, if you think, okay, so there is here the big mass, here is the distance. If I plot the function $V(r)$, it's minus. So the minus is making it flip that hyperbola from the first quadrant to the fourth quadrant. And so intuitively you would say if I have a test mass and I put it here, well it will be attracted. So technically it's moving along this potential profile, indeed going from points where in absolute terms you have higher potential to points that are lower potential.

I'm making this as a premise, although maybe it's irrelevant and trivial for you, because in the electrostatic case it gets a little bit trickier, and I wanted to refresh it. There it's trickier because you can have different kind of properties of the particles. They can be charged positively or negatively.

Something that I'm not telling you is that if you consider that expression and you take the Taylor first order... I don't know whether you have been taught like this ever, I was not, but if you take the Taylor expansion to the first order and you simply are considering that you move around some certain distance from the center of the mass, here I'm precisely thinking of our planet, and you are around this value, so you're approximating locally this function just with a straight line, around this R_0 , and you call h the quantity that you want to investigate. It's $R_0 + h$. h is your new variable. You basically recover, because of the sign, this is just a number, and it's where the story of the level of the sea... you recover the intuition that the more h , the more the height, the larger is the gravitational potential. Play. Just try to do it by yourself, and it may connect few synapses in your brain.

The Coulomb Electrostatic Force But I would like to talk about the **Coulomb electrostatic force** and I wonder whether, if you consider these two fundamental forces, you ever thought which is stronger? Well, you have it in the slides, but if you knew already which one is stronger. Is Coulomb better than Newton, stronger than Newton? Okay, so the counter-example would be that I have to find a mass so large but weakly... with very, very small charge. Okay, let me consider not an arbitrary case, but just the case of chemical or even biological molecules.

The fact that Coulomb is extraordinarily larger, I think it's 38, 40 orders of magnitude, I don't remember by heart, is the reason why life could develop. It's because chemical macromolecules or even chemical molecules could stay together. Because if it was only due to gravitation, it would be so weak that basically it's as if it's not there. And molecules or ions or macromolecules would simply fly away. A DNA molecule would never be able to exist in a universe where you don't have such a huge predominance of the Coulomb electrostatic

interactions.

And do you know why there is attenuation for both, for the gravitation as well as the electrostatic forces, 1 over the square *root*, sorry, the **square of the distance**? You could try to search on the internet for this explanation. It's something related to the geometry of space. I'm not daring saying space-time, it's space. And particularly it's clear when you think of electromagnetic radiation in the visible. So light is electromagnetism, and light, the attenuation goes like $1/r^2$. Because if you imagine that you have a star in the center and it's emitting some certain density of light, after a given distance, this sphere of light is becoming considerably larger and larger and larger. For some conservation of energy, you would expect that everything is conserved, it's not being removed or deleted. But your eye is very tiny, so it's not integrating the entire volumetric, actually it's called *angolo solido*, it's not integrating in 3D, it's just picking up a little bit, a fraction of this. And the further apart you are, the more what you capture is $1/r^2$. It's very interesting and there are many even light talks or light papers and things on this $1/r^2$.

So it's 39 **orders of magnitude stronger**. That's the French Coulomb, instead Newton was British. Near the St. Pancras Station in London, if you go there, there is a statue of Newton. And again, this is, if you consider elementary particles, they are charged. And addressing the correct criticism by your colleague, I could say that the mass is probably not as represented as charge. Charge is... so you could have a very tiny particle in terms of very light, but extremely charged in comparative terms. But it was a good objection.

So for electrostatic fields, you have two... so I'm considering the static or quasi-static case. So I'm considering a regime in which you don't have the generation of a magnetic field that is concatenated to the electric field because this is changing over time. If it changes over time, there will always be, but the intensity and the wavelength can be neglected. So I'm considering the case where things are not moving. And I remind you that you have two classes, two families. You have one property that the particles, if they are charged, they are say blue and they are red. So they can be of one class or they can be of the other class. Charged positively or charged negatively. It's purely conventional that we call something positive and something negative.

What is important to remember is that if you have the same quality, then the force is **repulsive**. See the sodium ions going to the cinema but not liking each other and so being repelled and causing repulsion from each other. If they are of different species... the opposites attract, even there was a song by Paula Abdul many years ago in the 80s. And so if they are of a different quality, they **attract**.

And it's the same thing. It goes depending on with some sort of constant, and here it has been unpacked because it's relevant in a moment to talk about it. But it depends on the product of these two qualities or quantities that are called the charge. So it's an elementary property. I'm not entering into the details what is the charge. And apologies here, I should have not called it r_0 . r_0 is the specific distance in these two examples over the independent variable or the name of this axis that is called generically r . So it goes like $1/r^2$ like for gravitation and it depends on the product. But here the product can be negative, so the sign

of the force can be indeed... can be repulsive, not only attractive.

And again, same story, if I have say a positively charged particle and I put it here, assuming that my test particle is always positive just purely by convention, I would like to have something to tell me that if I place something... to express that if I *press*... if I push or place the test particle in different... test charge in different spots around this, I am basically measuring a property of the space, not of the two specific charges. And again I go from the Coulomb force to the **force field**. And you see that there is only one Q , the Q the charge of this one, not the other one. And again it's not Newton, it's Newton per... before it was Newton per kilogram, here it's Newton per Coulomb. And by reworking the unit you can also express this as Volt per meter.

I have to think, I don't remember why... oh sorry... yeah sorry, I'm... yeah, my brain was interpreting V as voltage. I'm tired, I did not sleep, and this Q/t I thought it was dt and I thought, no why? Why should be dt ? The time should not be there. No, it's **Volt per meter**. I remember this because if you go on the news and you look for safety limits of electromagnetic or electrostatic force fields near the antennas of Radio Maria in Rome, you actually have a number that is expressed in Volt/meter. If it's too large, Volt/meter, then it's dangerous for cells. Obviously it's fascinating to understand, okay, but why it's dangerous? What exactly is the interaction with the biological hardware?

Permittivity What else? Something important that is different from the electrostatic case, sorry, from the gravitational case is that you have this quantity here apart from the 4π that again has geometrical reasons, but... and about spheres, but I'm not talking about that. You have one value of a constant that is called **permittivity of the vacuum** (ϵ_0) and another one that is adimensional and is called the **relative permittivity of the medium** (ϵ_r). And here there is another lesson. So this one ϵ_0 is the permittivity. Permittivity means that it gives permission. So the larger it is (because it's at the denominator) the smaller is the force.

And this is key for having chemical reactions and life being developed in **water**, in aqueous media, instead of in the vacuum. Because the other value, so this is ϵ_0 is expressed in Farad per meter, but the other relative permittivity is without dimension. One is the permittivity of the vacuum. If you look at what is the permittivity of water, it's almost two orders of magnitude larger. And being at a denominator it means that you have a sodium chloride molecule and you put it in water, then you... because the force that was much more intense in the vacuum, you put it in water, or even in dry air is not too far, okay it's around 1. But as soon as you put it in water, the two ions constituting the two molecules... constituting particles constituting the molecules, sodium and chloride, may fly apart, fly away, just because you have $1/100$. So it's 100 times less intense this electrostatic force.

And what it's interesting is that for phospholipids, now I'm throwing it like this without any justification, you have a value that is in between. Cells are made, particularly the cell membrane is made of lipids, and I'm particularly fascinated, we will briefly discuss it later, that the first time people started thinking of that cells, it was in the 19th century, that cells might have a membrane. And the

membrane is a crucial point because it makes inside different than the outside. It makes a distinction between the environment and what is not the environment, what is *me* and what is *not me*, is not necessarily so obvious concept. And people could not observe with microscopes, because it's so thin, so small, could not make inference or guess about the thickness. And they did it purely by... the first time they did it by electrical methods, precisely because it was possible to *know* the relative permittivity of individual components of the lipids.

And to me it's fascinating that you don't see something, compare it to a capacitor, and we will see later why the membrane is acting as a capacitor, you can guess the distance between the two plates of the capacitor, so the thickness of the membrane, by an electrical measure. It's not the first time. There is another... for understanding how these pores, these doors that make the inside of the cell connected to the outside of the cells... the first time people could not see them and they could only measure it electrically. So it's a primate of electricity and electrical methods compared to optical methods, to optics and microscopy.

Quantization of Charge The other things that I would like to remind you, because we will use it often, is that the electron, so the charge in general is **quantized**. You cannot have an arbitrary value of charge, it comes in multiples of an elementary value that is 1.6×10^{-19} Coulomb. And for instance in the case of this sodium chloride that is dissociating in water, you probably know better than I do this is reversible. And indeed when I write Na^+ and Cl^- , what I mean is that this guy has a positive charge and because there is only one plus and I'm thinking of the valency etc., I'm specifically referring to this value. And when there is a minus, so this one is negatively charged with the opposite sign so that both are somehow canceling so that the molecule is electroneutral. This you should be roughly familiar with all these things.

So this is the story of vector fields. In every point even in 2D it might be quite daunting. So this guy is depressed. Maybe you don't know who this guy is but is famous in my generation, well even in the previous generation. If you have scalar quantities it is much better.

Electrostatic Potential and Superposition So even in this case, the electrostatic force fields are conserving mechanical energy and therefore you have one function of the point such that if I take minus and I take the gradient, I can describe the electrostatic field. So in other words, given the electrostatic field, it always exists a potential function. And this potential function is again, is defined apart from a constant. Instead, if here it was, instead of V it was $V + 25$ millivolt, okay, when you take the gradients the constant will go away because the derivative of a constant is zero. So you get the same electric field regardless of these reference. And the reference of these aluminum foil that I wrapped my circuit around... so it's not anymore the level of the sea where I say, so the height is zero and so the potential I call it zero. Here is just an arbitrary point where I call the potential zero. And normally is, it is considered in what is called the electrophysiological convention, not a very original name, zero for me is outside the cell where I have some sort of reference electrode. But we will be more on this.

So the space or the expression of this potential... before for the gravitational

was easier because it was G and here it's just a number, there is nothing to understand. This is one number that it's known... goes like the charge divided by the distance. So it's $1/r$ for the exact same reason.

Let me probably stop... let me see what is next. Yeah, okay, this is... this is important. One minute and I'm done.

So something that is very cool, but I'm not... I have no time to really to go more in details, is that Maxwell equations are linear in the sense that the **superposition of the effects** holds. If you want to understand what is the electrostatic potential, so it's a property of the space, in this point, P , I choose that point... When you have this collection of small, large, positive, negative charges, it's enough that you consider the superposition of the situation that you would have if you had only one charge at a time.

If you had only this big one that is red, you would have... you have to calculate the distance, and you will have, okay, this pre-multiplication factor is just a number of stone, you will have only Q_1 divided by the distance between this Q_1 charge to the point P . Now you make disappearing the red large charge, you make the appearing only the blue small that is considerably further apart and you would have in that case, you would have Q_2 divided by the distance.

So if you want to understand or express what happens if you have in one point, say inside the cell, you have -70 millivolt with respect to the outside where it's zero... you may say, okay, well if you... if I know where the charges are located, I can basically consider a sort of superposition of the effects, which is some sort of weighted sum of the charges. Clearly, okay, one big charge, if it's a big positive charge, is going to contribute positively to the potential over there. But if it's very far apart, $1/r$ will attenuate that contribution.

So with this you could maybe start thinking, okay, maybe if I see -70 millivolt, if this holds true, maybe it means that I have many negatively charged particles inside the cell. And that would be perfectly legitimate, but it's not entirely correct.

If you have questions now in the break... let's stop and wait for 10 minutes.

Let me restart. You... I will point you to it in a moment, where with a so-called web app, that means it's an application that is only requiring a web browser, you can go and say, let me not take it, say, I can take a lot of negative charge, in this case it's 1 minus... -1 nanocoulomb, -1 nanocoulomb, it's a very small charge. And I can also have a sensor, so this is the test particle, and you see that these are the lines of the force field and it's relatively complicated. I'm having fun, you see? Saturday night, what do you do? I'm having fun playing with charges. And yeah, you can play with it, but see what happens if you are only looking at a scalar quantity. So there is no more arrows. And what remains is some sort of shading that reminds maybe the concentration of, say, smoke. If I should smoke here, there will be a very high density of smoke, of particle here. There will be maybe diffusing, there will be less intense concentration of smoke, less intense value of the electrostatic potential in one spot far that it goes like $1/r$ and it goes far.

And if I have different distribution of charges... so it's not... This sensor is a voltmeter. So in this... so you see at some distance from this distribution of

charge, the electrostatic potential that I... that I'm detecting here in the points identified by the cross, I see minus four... so it seems to be negative. If I get maybe close to the... to the positive charge, they get positive, but otherwise is... is negative. So maybe doesn't get... doesn't get -70 , but this might say... You could play. After a few minutes you... you will be fed up. This could give you some sort of intuitive understanding of why, first of all, is easier to work with potentials and what does it mean this superposition of the effect, when I remind you the task is to understand why there is this damn -70 millivolt.

Potential, Charge Movement, and Current Something else that I wanted to... in addition that I wanted to talk about is the exact same story saying that if you have positive charge, so you have one big charge that is positive, a **positive charge** would move from point with **higher potential** to point with **lower potential**. I think I have here... if I have a battery... I hope that you, maybe I said it, I didn't, well it's difficult but I hope that you, well don't do it because it's dangerous, but I hope that maybe in your childhood you had... you licked batteries, particularly the 9 Volt batteries. But anyway, so one pole of this battery is 1.5 Volts with respect to the other, it's the negative, but you could... you could say that the difference of potential from here to here is 1.5. So it means that in this point you have 1.5 Volts. And so if you have a positive charge, because of the potential generated by this big blue charge, it would move along... will be repelled and it will be move along these potential profile, indeed moving from points of high voltage to points of low voltage.

I tell you this because for many years there was the misunderstanding of... centuries? No, years... there was the understanding and still it's the same convention, that electrical currents are... in conductors, in metallic conductors are... is carried by positive charge. And indeed you know that if you have here... you have a circuit, the current goes from the plus to the minus. Well, electrons are negatively charged. And so actually it's the **negative charges** are moving from points with **lower** electrostatic potential to points with **higher** electrostatic potential.

I wanted once in your life to revisit this important concept, to know that it's wrong, it's a different convention, but it kind of fits whatever you do with the story of repulsion or attraction. So if you are in the world of Coulomb, of force field, you only have to remember the sign of the two particles, but if you're in the world of potentials, it's easier. And you only have to remember, like in the gravitational field, you are by bike and the bike naturally goes from points of high potential to points of low potential. And for electrostatic is the same, unless you are a negative charge, which is the exact opposite. And this is indeed what the real electrical currents are carried along.

So here I'm just, it's already since last week that I'm stimulating and saying, okay, -70 millivolt, what do you think? I told you that now we know or we know again the superposition of the effects and so if you have -70 , well, it could be that you have a lot of negative charge. Would not be shameful to reason like this, but it can also mean the exact opposite, as we will see in a moment. And again, I hope that you started thinking. I would love if you could keep these *critics* in your brain alive.

Biophysical Primitives: Mobility and Friction But first I need other elements, other primitives in biophysics, and one is called **mobility**. It's purely a description, is a conventional description as you will see, of how tough is for one particle to swim in solution, to move in in an aqueous medium, if it is a sodium or *chlorine* ion and if maybe one ion molecularly is fat and another ion is thin, slim.

And I start with the... with the parachute. Do you know why these guys are not dying? Probably you would say, well, it's because of the parachute. Do you know what the parachute is doing? So you probably know that in proximity to the... of the... of the surface of our planet you have an acceleration of 9.8 square meters per second or meters per second square. So every second you accelerate, you change your velocity by roughly 10 meters per second. So why is not dying *to see*, crushing himself or herself in the ground?

Which is by the way, is the same reason why when it rains, the drops of rain are not damaging your scalp, killing you on an instant. They should. The reason why they don't is because they have, well there is not really the parachute, but because they are... the drops of water, of rain and the parachuters are moving in a dense medium that is air. And air is causing **friction**, viscous friction.

So you have in the general case... you don't have raindrops and you don't have parachuters... but you have a particle that is moving in an *aqua* solution under some external force. I don't care whether it's gravity, whether it's electrostatic potential, sorry, electrostatic forces, I don't care. And I only have to invoke or remember one guy, **Stokes**, who studied friction. And actually it is very interesting because he studied how the geometry of a particle in a solution is affecting this friction. But for the sake of simplicity here we don't care, we just basically say that the friction that is familiar to those of you who are maybe swimming in the sea is increasing, is proportional to the velocity, is not constant. The faster you go the more the deceleration you experience. And it goes in the opposite direction of course from your motion because it is again, it's a friction, it *tries* to oppose.

So let me invoke Newton's second law of the dynamics, $F = m \times a$. Force equals mass times acceleration. Of course acceleration I express this as a first time derivative of the velocity. And... And again you will see why I'm obsessed by that always boring usual differential equation because it's always the same linear first order constant coefficient equation that comes over and over, at least in this course, not in nature but at least in this course.

So here I can write the overall sum of all forces. I'm thinking of a monodimensional case otherwise I will be making a necessary complexity. So I'm considering that there is some sort of direction of motion that I call x . x is a coordinate, so I can have some velocity. I can even define an acceleration if you want. And I can define a position. And I can go from one to the other by differentiating, by derivatives. And along this monodimensional coordinate, which is describing the system in all its complexity, I have two forces that are the sum, so F equals mass times acceleration, $M...$ is the total force, and the friction is opposing. So if I take this axis along the direction of the motion, say along the direction where I call positive the force that is positive in this direction, then the friction force needs to have a minus. And this λ is a constant, is a positive constant

and is the... basically is the... is a factor that is describing how big is the viscous friction. And you see here this is given, it's proportional to the velocity. The faster you go... the slower you are... so... so the slower is the... the faster you go the stronger is *these* friction force.

I remind you that these are forces and *these* are the world of velocities, positions, and acceleration. So they are slightly different beasts and the difference is because here you have a derivative. Again, it's the always usual boring differential equation and if I write it down, so you actually see here, friction I replace $-\lambda v$.

I told you the other time that if you want to make me happy you have to ensure that if you present me with a differential equation that the state variable in the left hand side, in this case, has a minus sign. Because in my brain I have always the automatic reaction saying, okay, yeah, the solution, at least the solution of the homogeneous equation associated, is an exponential. I have to put the exponential to something and if this something has a negative sign, I'm happy because the system is dissipative and this friction is dissipating energy. It's actually dissipating energy in an irreversible way as heat. So things should not explode. I should not expect the velocity to exponentially increase, *vice versa*. They should be exponentially *decay*. So make me happy and always keep an eye on what you have from the other hand side of this equation because this is what you're going to put in the exponent. True, there is this constant here m , but m is positive so okay, I could divide both sides of this equation by m and here will be $-\lambda/m$. Okay, still it will remain positive. So the minus, I'm grateful for this minus which is the Stokes law.

And of course this is not an homogeneous equation, so in principle I'm hand-waving, but you allow me to assume that this non-homogeneous term is constant in time. It's given and it's a constant. It's not an arbitrary function of time. And it could be as constant as gravitation or as constant as the Coulomb force that a big charge is exerting on one charged particle that is entering in solution and moving along this direction. It doesn't change in time. I don't care whether it changes in space. Here it's a differential equation with time. If that's the case, I can apply those heuristics. And so if the force in terms is constant, then likely the input term is also constant. And I can identify which constant it is by direct substitution.

Anyway, to make a long story short, I don't even care about the initial condition that would allow me to select one among the infinite solutions of this differential equation. Because you see here, it's when I'm very happy. So this term is going to vanish. And the reason why this is vanishing is because friction has the property of making particles approaching the so-called **limit velocity**. So, parachuters, because of friction of the air and the same for water raindrops, are not constantly accelerating over... At some point they stabilize. I spoke to people throwing themselves from an airplane, just skydiving, I think it's called, even without, before opening the parachute. The first few seconds are ugly, because you feel it in your stomach, the acceleration when you're falling, but at some point, then you don't accelerate anymore. And in principle, it's indistinguishable from a reference frame that is not moving.

And this second is given by this constant, which is the inverse of the time constant of this equation. It tells when the transient is gone, is over. So this

friend of mine doing skydiving, after a while, his velocity became constant. Okay, it might be unpleasant, because particularly your visual scene, the visual field is expanding, so you're clearly, if you don't open the parachute, you're dying. You're not constantly accelerating and your stomach is not telling you that. And... and the reason why this can be done, we can neglect it, is because the mass and the... so this ratio between λ and m is very, very, very large because the mass is very, very small. And if I have this that is very, very large it means that one divided by this quantity, that is the time constant, is very small. So in a matter of picoseconds or faster, an ion in solution will reach this limit velocity.

And therefore I can write this relationship which is the limit velocity, so the **velocity is basically proportional to the force field**. Newton would be upset and would say, "beware, I think this is... it goes to the time before Newton." People... forces were directly translating into movement, and Newton said, "No, force is equivalent to an acceleration, not to a velocity." Unless you're in a viscous medium. If you are in a viscous medium, then if you double the force instantaneously, well, it's not really instantaneously because you have still some latency, but say, very rapidly, you're changing the velocity. This is crucial because we are swimmers. We stay in solution.

And people, instead of calling λ the Stokes coefficient, Stokes parameter, Stokes coefficient, they call u **mobility**, $1/\lambda$. So this is my definition of mobility and it tells that the velocity is proportional to the force field. And you will see in a moment why this is relevant.

I warn you that in the literature, there is, in books, you have also the tables with the numbers, with numerical numbers of people that calculated the mobility, and how they could calculate it, well, they simply... they had to calculate the velocity. They knew the force, they calculated the velocity, and they basically had the mobility. But they had... they worked with the charged particles. And in our case, this is what is called **absolute mobility**. So it's a relationship between the force and the Stokes parameter. And it's measured in meters per second Newton.

If you have the charged particles, in the book you call it... and they are basically referred to not absolute, but **electrical mobility**. And instead of being a force, it's a force field. And so somewhere compared to the force you divide it by a charge. So here in between there is the charge, or if you want really to *spaccare il capello*, if you want to be very picky, you have to put the total charge, so that is the elementary charge multiplied by the valency of that particularly ionic species. And the valency is here in the absolute term is the... the modulus, because I don't care whether it's positive or negative in the settings that I'm used. It's enough that it's making the particle moving. Only just to tell you that if it's there it is measured as meters per Coulomb per second... meter per *cool* divided by seconds per Newton. So just be aware that in books you may find other numbers. It's the same thing apart from this conversion factor.

But anyway, we always stay here and anyway we don't look at numerical numbers. So you can go from one to the other apart from the elementary charge or, yeah, the total charge if you... if you're talking about say calcium ions that in solution they dissociate and they have $Z = 2$. So the valency of a calcium ions is 2, they have 2 positive charge, elementary charge.

These are some number and you see that the potassium and sodium and chlorine they are more or less of the same order of magnitude. Some ion has an easier time to swim than others. And you might see some other numbers but they are different units so that's why you don't see exactly the same. It's 10^{-8} and here it's 10^{11} so you would say it's crazy. No, it's because here somewhere you have 1.6×10^{-19} Coulomb at the denominator. But okay, that's it.

This is however wrong, but we don't care, we stick with this approximation because as you know ions in solutions are not swimming like this naked. They don't like to be naked. They are immediately neutralized by water dipoles that are constituting what is called the **hydration sheet**, hydration layer. So sometimes you might have ions that are very slim but they have a very big hydration sheet around them. And otherwise ions that are fat but they have maybe... they are not necessarily more fat than one slim ions with the hydration sheet.

Flux of Particles The last conventional things that I need for the following is the **flux of particles**. So I'm thinking of some sort of external fields or forces. I don't know what forces they might be. I anticipate it's not gravity because gravity is, with all due respect to Newton, is very weak and it's not really playing any role. I'm considering mobility, so I'm considering how friction basically, how good is one molecule, particle. Look, particles could even be not electrically charged, and we will see together. So it's not that if you're in solution you need to be electrically charged. There are other phenomena that happens if you're not electrically charged. And then the other thing is some sort of way to describe, to measure, to understand quantitatively how under a certain force, with a given mobility, I give rise to a flow, to a flux of matter.

But I need to be precise because there might be several ways to define flux of particles. How would you define it? What I'm thinking is, I'm thinking of a river. And the river is flowing, and it can be a small river or a large river, and the velocity of the particles can be really large, even if it's small or if it's big. So there are two kind of things in this view. I wonder whether you could suggest me what they are. One needs to be if they are small or large, so some sort of section or cross-section of these flux, so space, surface. And of course there is another quantity which tells me how fast things go. So time is also an important thing.

Any idea? What would you call it? Flux. You would say it's an amount of water... well maybe for electrical currents you know that currents are measured in Amperes. And Coulomb per second. So this, apart from the formal definition, is because people thought, well it's a flux but it's in a wire, maybe in a conductor... well I don't care. It's not a density, it's just an absolute flow and is basically in a given amount of time I move a certain amount of charge, one Coulomb. If I move one Coulomb at every second and I really imagine one big charge, blue charge, that is one Coulomb and is moving, moving to the left in one second, so it's not particularly fast, then I will have one Ampere, which is quite a big current.

Here, I told you I'm interested in if the section or the cross section is large or small. So I'm interested in **densities**. So again, let me see if my method would

match yours. So I call it J . J might resonate with a current density, but in this case, the particles may or may not be charged. So the units are not necessarily, we will see what the units are with this definition, are not Amperes, because there is no Coulomb, at least not necessarily.

And here is the first time that I can work with both, with either densities or concentrations. And I know how to go from one to the other, so they're not scaring me anymore. And this flux, just for simplicity, I'm considering one-dimensional movement. There is some velocity and there is some external force. But one way is this one. And here you see why physicists would be happy with densities and the chemist would say, "No, let's use mole."

So it's a **number of...** Pick your field, pick your part of the game field. So if you want to be a physicist, say number of particles moving through the surface, the cross-section of the surface. Maybe I would like to make that the surface of passage is not really having an impact. I would like to normalize. So if it's a big 10 square meters, or if it's a very small blood capillary, I don't care. I would like the flux to be a density measure, a specific measure, not an absolute measure. So it's a number of particles moving through a surface, a unitary surface, say one square meter or one square micrometer, in the unit's time interval, exactly like for the current.

And if you like more chemists and you like the moles, it's basically the number of moles moving again, the same thing through the unitary surface in a unitary time interval.

Let me try to graphically unwrap it and you tell me whether I'm... well, it's a crappy sketch. Here again my direction of movement, now I put it horizontally because it's... I don't know, I go in the lexicographic order from left to right. And although here I was thinking of something falling in a jar made of liquid... but... so with the jar with a bottle made of liquid is because maybe gravity would make this particle slowing down and reaching a limit velocity. Here I don't care. So I'm assuming that the force is along this direction and it's pushing the particles from left to right. And here I conventionally identify a reference surface that I call ΔS , delta because I'm perverse, at some point maybe it will go to zero or I will simply normalize it, I will divide by it. And I have a watch and I wait one Δt . Nothing is infinitesimal so far. They are not infinitesimal measures yet.

But I basically say if things are moving, it means that they do, in a unit of time, they move of some length, some meters per second. So in one second or in alpha second, things will be moved. If I take two pictures, one now and one after one Δt , I can probably identify a displacement of all these particles that were, at the time of the first picture, they were all stuck in this coordinate, at this x coordinate, that they were basically in this frame. I'm really imagining, I'm imagining it like many particles of really a fluid or smoke, so there are many. So if I slice it in that plane I will have many, not all of them because of course they are dispersed in a volume as concentrations or as density, but if I slice it, there will be few of these particles at that position.

So after Δx , basically those particles, I assume that they all move with the same speed and there is only one direction that they can move, so... well then I draw another rectangle, another area, that it tells me where they are now, those that

where Δt ago they were in the first... in the first surface. Maybe you see where I'm going because now that I have Δx and Δt I'm tempted to say, yeah, okay, but $\Delta x/\Delta t$ is a velocity. Well, it's a uniform velocity, otherwise I would need to take the limit. But even in that case I'm fine, I know... no... calculus, so in that case I could take the limit. So if the velocity is not, should velocity not be constant in time, I could still handle this situation.

But here I have that $\Delta x/\Delta t$ is basically the velocity. And another interesting thing is that basically here Δx and ΔS identify a **volume**. And this volume is the volume that these particles basically they identified, they, whatever, in the Δt . And I know how many particles are in a given volume. If you tell me the volume, since I know the concentration or the density, I can tell you what is the absolute number of particles in that volume. And this is what I'm going to do.

So the definition here is number of ions that cross the first surface, blah, blah, normalized by the, so per unit of area and per unit of time. So I have to divide by the area and divide by the time interval. But I know how many ions are here in this box. Because it's enough that I have the density and I multiply by the volume. If I like to work with densities... if I like to work with concentration, I do the same. But there will be an Avogadro number in between.

And you see that if I do this... I think I have it here for concentration for those who are like me, more fond of moles. So here you will ask, I want to work in moles because I know that sodium is 150 millimolar concentrated there. And what happens if I apply some electric field? And so they will move, and I want to use the fact that I have 150 millimoles per liter. So here you see that I can simplify ΔS , and I remain with C or ρ , whatever it is, the density or the concentration, times the velocity, which is simple, which is okay.

The Nernst-Planck Equation (Thorell Formula) Let me do another step invoking mobility, because with mobility, I can go from velocity to force. So here, with this definition, which is called the formula of Thorel, is a guy particularly, say, for the molar fluxes, not for the particle fluxes. Look, we have to commit, but we know how to go from one world to the other.

The flux is given by the **mobility** multiplied by the **concentration** multiplied by the **force**. $J = u \cdot C \cdot F$

And it's not so impossible, so strange, because if the mobility of this particle is very, very small because the particle is a very poor swimmer, it's very big, and Stokes is slowing him or her down a lot, then the flux will be small. If you don't have enough molecules, if the concentration is small, the flux will be small. It cannot be larger if you don't have stuff there. And finally, this is clearly, it makes more sense, the stronger the force, the stronger is the flux. This is also making sense. If I blow air, the stronger is the force that I put with my lungs, the stronger will be, the more intense will be the flux with this definition. So, and the fact that here is a linear, it's a proportional dependency, is something that I like. It's sufficiently simple.

So this is called the Thorel formula, and again, depending on your choice, if you're talking about moles or particles just be careful, connect your brain for a moment and then disconnect it and play or use units. So when you write

units like moles divided by square meters divided by second... will be the unit of this flux. And you see it's a density because in the denominator you have a square meters which is the cross section. Again I don't want to work yet with the current because I want to work at some point with densities. I don't know the sections like I don't know how many particles I have. I'm happier to talk about concentrations.

So here is if you want to go from the flux to the current density. So flux is agnostic in terms of electric... electric charge. But if you want to do that it's enough if you want to go for... this is **current density**. The current density means Coulomb per second, fine, but it's per unit of area, per unit of cross area. And so you see that is per square meters, Ampere per square meters. And if I want to do that, nothing is easier. You simply have to multiply by the charge.

Again with this stupid example that I'm imagining some molecules of smoke and this... and there is some wind that is pushing them in one direction. If they are all charged, I have to multiply... if I have the flux, in order to get the current density, I have to multiply by the total charge. And in this case, I have to multiply by the charge of an element. If the element is a particle, I have to multiply by the elementary charge. Maybe the valency here. Maybe here I should write also z . But if I have moles, then I have to multiply by the charge of a mole. And if a mole is made of 6 point something, 10^{23} particles, then okay, each particle will be charged Q , and I do the Avogadro number times Q , which is incidentally called **Faraday's constant** (F), which is the amount of Coulomb per mole.

Nothing to understand here. It's simply that if you want to go to the world of electrical phenomena, electrical currents, you need to give this label to the particles. And depending on your choice, if you are in the... if you're in the... in the physicist quarter and you like densities, multiply by the elementary charge. But if you are in the moles, you have to multiply by the Faraday constant. And we will love to stay with concentration simply because it's so easy to prepare solutions and work with concentration.

So remember it will be at some point, although for a very brief moment of time, but at least now you know that the world of electronics is... could be reconciled with the world of particles swimming in a solution... ions. Because after all, ions are charge carriers. So maybe they can bring currents if they move in solutions. And that's why my neurons are firing and they generate electrical phenomena, because it's the same thing. But they're not electrons.

And actually it's even more interesting because in the... you know that electrons and even holes are in semiconductors or only metals are the only charge carriers. In electrolytes, in biological solutions, you have a multitude of charge carriers. You have magnesium, you have chloride, you have sodium, you have potassium, you have *chlorine*, you have many other ions that if they are in solution they might be positively or negatively charged just purely because of the dissociation due to water, to the properties of the permittivity of the water. So it's the same thing. And here basically we are reconsidering, we are approaching the elementary bit. We already kind of revisited the potential and now the current. So basically Kirchhoff is our friend now because we... we know that Kirchhoff laws of current and voltages... okay here are the same... currents... okay current

densities... and voltages.

Two Types of Fluxes: Drift and Diffusion And now the interesting bits. What kind of fluxes can occur in solution? Because after all, okay, fine, this can be an arbitrary function that is very elegant mathematically but... but okay, what could it be? There can be only two types that we are going to consider. One is if the particles are electrically charged and there are electric fields, electric force fields, they are basically Coulomb electrostatic interactions. And the other kind is **diffusion**.

So that's why here there is a waterfall, because the waterfall is a **drift flux**. There is gravitation that is pulling the particles. Okay, here the particles are not electrically charged but they have a mass so it's a similar thing and they are pushed in this direction. Here you have smoke and the smoke is diffusing. There is a lot of smoke here so immediately the concentration of smoke here will be high. But after a while, just purely by thermal agitation, and by bumping in air molecules or water molecules, the ink, I'm thinking of an ink in a glass of water, or the molecules of the smoke in air, will basically diffuse. And if you wait long enough, they will be everywhere equally diffused. Unless they might interact. But normally, smoke particles, they do not interact among themselves.

If they are ions and they are unequally distributed, maybe they do both. They could diffuse, but as they diffuse purely by, again, thermal agitation, they are too much concentrated here, so randomly they would go in all random directions, but the net flux would be that they would diffuse away from the point they were concentrated. But they are the ions that were going to the cinema, so they were, for instance, if they are all with the same charge, they will start to repel. So there will be some sort of combination between diffusion and drift. And if you have not just one, but you have maybe two or three or four or n types of charge carriers, things may start being interesting because they will be, each will diffuse, but they will interact with each other by electrostatic forces.

To make a long story short, we cannot easily understand how these two things combined would give rise to this -70 millivolt because over there there is the... the answer to our problem. And so we are now using this... this framework. We know how to define fluxes. This is... I told you already the diffusive and drift fluxes.

1. Drift Flux Let me consider the **drift flux**. Somehow it's easier mathematically. So I'm considering, of course, charged particles, otherwise there is no point. Coulomb will not give me any satisfaction. Coulomb only holds when the particles have this physical property that we call charge. But allow me to assume that they are uniformly distributed. So they are everywhere the same, so there is no diffusion. They might stay in solution at 37 degrees, but overall, statistically, they will not move. What they do, they will repel and attract each other.

But let me make it easier. I'm thinking that there is an external force, and this external force, I told you, that can be related to charges by the knowledge of the electric fields. And if... since I don't like working with vectors, instead of E I work with minus the gradient of the potential. So the external force acting

on a certain charge with a valency that can be 2 in case of calcium... so is the amount of charge times the electric field. Or the amount of charge with the minus... the gradient of the potential. This is the specific force field that I would like to obsess now.

So here if you like working in the... in the world of densities, and so here is Q is the elementary charge of a proton and z will be 2 say for calcium, will be 1 for sodium, will be 1 again for potassium because they dissociate and they have unitary valency. If you like, like I do, working in the domain of concentrations, nothing easier. So this is a force, still it's Newton, but what I have to address is that I have to refer the force field or minus the... and I wonder why there is no minus here... why there is no minus? Okay, later... Avogadro number times the charge of the individual particles. So this is z times the Faraday constant. And this is going to be multiplied by the gradient of the potential. Minus. Minus. And here there is the minus. So here is no minus. So I'm losing minuses, but then they reappear magically for some magical property. Apologies, I will amend the slide tonight. And I will re-upload it correctly.

So now that I have the force field, and okay, depending on which is your favorite team, I can deal with it. Let me plug it in this expression of the flux. Nothing easier. You have the mobility. You have the concentration (because I'm working in this framework). And here is the force. Of course, it's the force related to the concentration world. So it's the, let me see here. So it's $-z...$ minus, and then $N_A \times Q$ is the Faraday constant. So this is the total charge. So this is Coulomb. And this is because the Coulomb... the electrical force, is a conservative force.

So, okay, it's basically done. Don't worry about the story. I think that you will not be tempted to, you will not have the urge to consider Faraday constant as Coulomb per mole. If you do, we can talk about that, but I think that that will be okay.

So this has the same unit of a flux. That means moles per square meters per second. It's not a current density. It's just the flow of particles. If you want to make them into a current density, you have additionally to multiply by zF , but we don't do it for the moment.

Why am I doing this? Because this flux is the flux of matter. Fine, the matter is electrically charged, and these charged particles are moving because there is an electrostatic force. Fine, but this is measuring a flux of stuff. So it's like the flux of a river. So, so, passively and, sorry, positively and negatively charged, they experience a force, and this force here I basically put it in relationship in a monodimensional case with the electrostatic potential.

What I'm trying to go... so where I'm trying to go is the following. To give you a slight bit of intuition. I have a cell and I have this electrostatic potential V that I told you is negative with respect to the reference electrode. So I have somewhere a potential that I measured. It's not something that I imposed. I measure a potential. So I would love to translate, to relate electrical phenomena that are being characterized by potential to fluxes. Because intuitively I'm thinking that maybe there is something related to charges inside and outside and these charges, as opposed to what I did on the demo before, they are not glued in place. These are glued in place. See what happens if I put a positive charge, the negative is not... is... It should be kissing the negative. Instead, they are not

attractive. They are glued on the table. If instead I put these, it became now proverbial. So the sodium very close to another *peer* in the cinema, they're not repelling each other. These are, just for the sake of simplicity, these are *stick*, they're glued on a table.

But in solution, everything moves. So I hope that maybe if things are moving, I can describe fluxes. And if I can describe fluxes, I can maybe sort of understand if there is any relationship between fluxes and potential. Maybe, even ambitiously, some relationship which is self-consistent. There is no external force. It's just the thing that is reorganizing, redistributing, because things are... maybe initially they're not equal inside and outside, and if they're not equal they will start giving rise to fluxes, and the fluxes are going to create an equal distribution, there will be repulsion or attraction, and at some point, -70 millivolts will come up. This is my plan. It's not entirely correct, but it's almost what we are going to do. It's not exactly how things will work.

2. Diffusive Flux Let me show you this animation and then we break for 10 minutes.

If you don't have any electrostatic charge, any electrical charge, so they are not charged particles, they are in aqueous solutions and they are unequally distributed. Because otherwise if you kill me also for the distribution, so they are not interesting, they are not spicy. They are not charged. And everywhere is the same. Well, they don't do anything interesting.

Here you know that if they are in solution and they are not charged, they **diffuse**. Diffusion is omnipresent. So the ink in water, the smoke. And this happens because you know that there is thermal agitation, so non-zero kinetic energy of water dipoles. They are constantly agitated and they bump into each other. And they do this because they are not at 0 degree Kelvin and so there is thermal agitation. And by doing this they transfer kinetic energy to the... to the particles, to the calcium ions for instance. And they do this by random isotropic collisions. Isotropic means that there is no preferred direction. So it's the same. So a dipole would bump me from the bottom or from the top or from the left to the right, it's gonna be the same. I will randomly make a step.

Probably you heard in this context the analogy with a drunk sailor... *sailor man* that is drunk and it can be... just because it's drunk he can make a step on the right or a step on the left. If it is a mono-dimensional *sailor... sailor man*, it will go randomly from one direction or the other. Here I'm basically thinking of the underlining things and this very fantastic... I will at some point I will make it nicer. This is a stupid cartoon that I made, not really implementing the diffusion equation. The diffusion equation is something that I would like to derive. The only thing that I... so here it's what it's called the Monte Carlo simulation where I'm basically considering the microscopic scale and microscopic phenomena. And here the microscopic phenomena is that they are only bumping and making random movements. In other words, I don't know whether you have ever heard of this, this is the so-called **Langevin equation**. So the actual stochastic bumps are translated into a force field that is just a random number generator in a computer.

If they start all concentrated in one spot, purely by this random, and believe

me I did it, there is no direction that is preferred, you have that they were all in one spot at time zero and now they tend to be distributing everywhere in the *same* in space. This is a box so there are boundary conditions so you see that particles are not allowed to escape. And this red and blue lines are basically histograms of the horizontal and vertical coordinates. If at the time zero there were two Dirac deltas because they were all concentrated in one spot, at t that goes to infinity they should go flat. So this is the concentration somehow, and the concentration should be the same everywhere. You see they did not stop moving but statistically their overall population did not change. The only difference is that they are boundary conditions so you have these two spikes at the *other* boundaries because yeah, I cannot... I make a random... if I'm here I'm only... I can only make a random step on the left because if I make a random step on the right, I hit the wall. So there it's a restricted diffusion, so you have this anomalies compared to what the diffusion equation would predict. But here there is no diffusion equation.

But the question is, after the break, can I make the flux? Can I understand how do I have to write the flux? Because here it's a bit complicated, I leave you to think of it. What is the force field in a diffusive environment. There is no... well there is a force because things started *to* move around, but what is the force field? Is it conservative?

Let's stop for 10 minutes.

Okay. Okay, let me restart.

So this slide is a bit dense and there is one concept that I cannot make it... I cannot make it easier for you and so it's a bit disappointing for me because I wanted to show you the steps as I derived the drift flux. And in the case of the diffusion, as this is not a course in thermodynamics, I cannot come with a... because this involves statistical mechanics and thermodynamics, I cannot easily tell you what is the force field and what is the potential that is associated to the force field in the context of a diffusion.

So the elements that I clearly intuitively are there is that temperature has to play a role. So the warmer the bath, the faster is the... So the higher is the kinetic energy. So the story of the kinetic energy, which is clearly well represented in a statistical mechanical representation of thermal phenomena, is there. And the other concept that is there is the concentration. So this is something related to the concentration. If things are *unequally* distributed, then there is some sort of net force, even though the elementary forces are random and isotropic.

So this is sort of given. It follows from other principles that when you have temperature that is larger than zero, so you have non-zero kinetic energy of the water molecules, and kinetic energy is exchanged, it is as if you have an external force field which depends on the temperature. k is the Boltzmann constant. And then there is this funny gradient of the logarithm of the concentration. So the two elements are there. The temperature is there and the concentration is there. And okay, the temperature, I'm happy that is here, that is proportional, so I double the temperature this force seems to double so that, okay, it could be intuitive. What it's not intuitive at all is why this has to be this potential... so minus the gradient of this function, $\log(C)$, with respect to space. But this is the potential of the force field, how this is came to be. And of course it's also

more complicated to state, oh okay, so a potential exists, so the equivalent force field is conservative, but I don't venture in that concept.

So this is the exact same case for the world of densities. If you are in the world of concentrations, this is a force that has to be scaled to an Avogadro number of particles, so this Boltzmann constant has to be pre-multiplied by the Avogadro number. And you end up having this $N_A \times k$ which is called R which is also called **gas constant**... is given the final expression.

So the flux was: mobility \times concentration \times the external force. $J = u \cdot C \cdot F$ So the external force here is $-RT$, and then is the gradient of the logarithm of the concentration. With respect to r or x or whatever you want to call it. So just this... just this unidirectional, just monodimensional case. Let's call this coordinate x .

Something that you might be tempted to do is that here this seems to be a composite function and the derivative of the logarithm of a concentration. So this concentration we don't know what it is. It's a given or maybe becomes self-consistent but that will be later. So here you will be tempted to simplify this term. Would you tell me how? How can I rewrite this? *Analisi 1*.

Okay. $1/C, dC/dx$. Indeed. And you will see that C is simplifying, is canceling. And I hope that you have seen this expression because this is the law of diffusion. I think it's in the next slide, but I want to just, I cannot resist simplifying this. So you have that diffusion is proportional to the gradient, which is exactly what diffusion is. Okay, yeah, I'm spoiling even myself.

Fick's Law of Diffusion So if I do that, you see there is no longer concentration here multiplying because it has been simplified. And apart from these quantities that are constant, and maybe I call them big D , I call it just... it's a number. Then I have that: $J = -D \cdot (dC/dx)$ So the minus comes from the idea of the... of the potential. And you know this as the **Fick's law**. I think it's Fick's law of diffusion.

If you have a profile of concentration that is like this, so moving in this direction in this coordinate you have a lot of stuff, so it's a pile of sand. Okay, if you move from left to right you encounter the pile of sand, so the more you move to the... to the... to the right the more stuff you find, the more concentrated it is. Well, you know that the pile, if it should fall or if it's not a pile it's maybe smoke or ink or whatever, will tend to diffuse from points where they have higher concentration to points that have lower concentration. To me this is a pile of sand that when it relaxes it ejects sand in this direction. It doesn't eject because that would mean spending energy to become more concentrated. So if I have nothing and then at some point I have all the ink in a glass of water, the ink will diffuse in the opposite, so this minus direction of where the concentration is increasing. The derivative of the concentration with respect to space is where the concentration is increasing. Minus is where it's decreasing. This is the law of the diffusion that you probably have seen many times, I hope in the past. It's called the Fick's law of diffusion.

And the fact that people could link this microscopic thermodynamical constant, R , T , particularly T , the temperature, and the mobility to this **diffusion co-**

efficient D , which is exactly what people have been measuring for decades and centuries for quantifying diffusion of particles, the diffusion of that ionic species or that molecule or hemoglobin, so whatever... oxygen... D has been related, and this is due to **Einstein**. So Einstein worked out, as you probably know, the link between the microscopic mechanism, the microscopic view of Brownian motion, the thermal agitation, to its macroscopic description, which is here. Here you don't have anymore the single molecule. Here you have the single molecule, the particle... okay here you have a mole of particles. Here you don't, you don't have anymore the microscopic, you don't have the kinetic energy. So it's very powerful synthesis in a way and it's exactly what we want, what we need, because now we have diffusion and drift. Sometimes we are going to simplify that, some other times it's easier to work with the... with this full expression. It can be ugly but it's not particularly difficult now that I guide you and I gave you perhaps intuition to what this thing is. It was as expected, it had to depend on the concentration.

So you have drift and diffusion and the question now will be what do I do with this? What do I do with this knowledge?

I think we are... I don't remember this quiz or questions or whatever. Okay, so this is exactly the point. What happens if you have both? Particles that are charged and they are non-uniformly concentrated. They will both drift and diffuse. The point is that it's not trivial and it's very difficult unless maybe you could think of running a computer simulation to understand how... there will be a Monte Carlo simulation where you track individual things, how they would tend to diffuse because they are too packed, but if they are diffusing they are getting further away from their opposite charge friend and they will be kind of being attracted. But if they are attracted too much, then they will start igniting diffusion. So there will be this sort of ping-pong, maybe some sort of equilibrium, balance between these two things.

So balance would mean what? That this is exactly equals to that? Or maybe... maybe it's a thermodynamical equilibrium that means that everything is dead. So there is no flux. This is zero, this is zero. Maybe the sum is going to be zero. We're going to see that this is the way to understand why this is -70 millivolts. The whole story is if they are free to move, then it's not what your intuition might have guided you in at the beginning or... or last week to say, " -70 millivolt, well superposition of the effect, it's because I have a lot of negatively charged particles inside." Which incidentally is in part, it's true, it's not wrong, but it's not the reason why you have this electrostatic potential. And by the way, it's not... otherwise would not be explainable why this electrostatic potential can even change abruptly in excitable cells.

Something that, of course, has happened is that in the video, the last couple of hours there was no projection of the slides, but at least the slides you have them. Now I think I solved it. I have now understood where a bug is, but at least you have blackboard material and my voice.

Neuroelectronics: The Real Thing So let's continue with this chapter that is not any more preliminaries. Now it's the real thing, it's **neuroelectronics**. And I hope that now it makes sense why is electronics. It's about current,

current densities, fluxes, electrostatic potentials, distributions. Not too far from what maybe some of you might have studied in the case of semiconductors, diodes, transistors, is similar, it's not so different.

So, again, as a supporting means to your study and understanding, these are the references that might be relevant for this part. Particularly both in this book and in this book, it's just one or two chapters. It's not the entire book. Instead, here you have way more stuff, more chapters are related to diffusion, drift, to the emergence of electrostatic potential across a biological membrane and how this is affected by membrane properties. And this is also another relatively general introduction on the cellular biophysics, at least the first couple of chapters.

So this is a list. It's what we are going... I don't know whether we are finishing today, most likely we are continuing next week. Let me for a moment focus on the first three things. So I would like to make it even more explicit that we are focusing on wet systems, so aqueous solutions that have electrochemical properties. So they have electrolytes, so they have ions and cations, which is just another convention to say if these are positively charged *or* negatively charged, unless I'm swapping them. They are particles that are charged and they are ionic species and they are born, they come from the dissociation of molecules in water. And again I will tell you how we do measure the electrostatic potential by electrodes, particularly with one electrode interface which is silver chloride, silver chlorinated interface.

And again I will again emphasize that our task is this tackling this -70 mV under rest, resting. What is rest? It's rest but I'm still alive, so maybe it's not thermodynamical equilibrium. And at rest I do have -70 mV. For excitable cells, sometimes in a matter of less than a millisecond this electrostatic potential jumps 100 mV. So something here, or maybe not, or maybe something has to change rapidly over a time scale of a millisecond, or maybe not. And then I will go with other things. So I will refresh, I will tell again the superposition of the effects, I will tell that the anchor charges are fine for intuition but they are not what happens, and again drift and diffuse and I will tell you what, why, how do we use it.

Okay, first three parts.

So I'm thinking now of a world where you have aqueous solution, so you have a solvent and the solute is made of molecules that are charged. They might even be not charged. And they are, yeah, these are the ions that we are probably going to comment mostly. And they dissociate because salt, because of solvation, is this reversible reaction that happens because in water electrostatic forces are weaker. And obviously, this is an important thing. Remember that **electroneutrality** always holds, globally. Locally, it might be violated. But globally, if I put one gram of sodium chloride in one liter of water, it's going to be electrically neutral. But it will be dissociated, so in some spot I can observe electrostatic potentials that are non-zero.

This is for the tenth time. In metals you have some charge carriers, in solution you have a multiplicity of charge carriers. And there is no particular novelty to tell you that people started observing many, many years ago, 50 years ago or more, the comparison between transistors and electrolytes, even proteins and semiconductors. However we are going a little bit more in details, more in depth,

and we are going basically to study electrochemical system with electrodes. And just for... For the nomenclature, it depends on the book that you look. You have anodes and cathodes, particularly when you have, maybe not only you measure, this is supposed to be some sort of gauge, just to measure what is the difference of potential between these two points of the solution. Or maybe you want to apply an electrical potential with a battery, an electromotive force, and you make, let's say, the positive or negative electrodes are going to accumulate the opposite sign particles to that electrode. So this is the framework that we are considering.

Electrodes: The Silver/Silver-Chloride (Ag/AgCl) Interface And about electrodes, I have immediately to tell you that like what I *tried* to stick on my chest and on my arm during the first class, we cannot use metal, a piece of metal. Well, we could, but it's different. Because electrons are not going to jump into the solution and ions are not going to be entering in the crystalline *reticulum* of a metal and will be kind of fighting and kind of finding their way in the metal wire. This is not going to be happening.

What people did, and this is the most conventional and the easiest kind of electrode to be used and to be understood, although as you can see is the most fragile, and it's definitely not the one that Elon Musk is placing, it's not the way Elon Musk is placing electrodes permanently in the brain of patients, it's called **silver chloride junction**. And it's based on this dissociation reaction. If you take silver and you put it in a solution that is very rich of *chlorine* ions, *Chlorine* and silver can bond together, can bind together, and in the process they release an electron. Because charge has to be conserved, and this electron, if by chance you have an electric wire that is closing a circuit, maybe to another electrode, through a meter or through an amplifier, so you close the circuit, this electron could or can give rise to a measurable electrical current. So an ionic current, these *chlorine* ions getting closed and binding, give rise to an ion.

So this is the perfect interface to exchange. It's like when you go to a foreign country and you have different currency, you want to pay with Euros and they only accept Swedish Crowns. Well, okay, this is making the conversion and so it's transparent to you. It's so transparent that this is an **ohmic interface** in the sense that there is proportionality between the difference of potential and the current that flows in.

Also, the opposite takes place. So again, charge is conserved if you have a block of silver that is bound mechanically or because you kept it in solution for many hours, or because it's produced by an industrial process that is called *sinterization*, that is attaching *chlorine* to the porous structure of silver, you make it porous. If you pass a current, like the battery that I was attaching a moment before in the previous slide, if you pass a current, then you may create a dissociation of *chlorine* ions that were attached to the silver metal, and they are expelled, and they are now free to swim in solution.

So it works as an interface, as a bidirectional interface, and that's why placed on my skin you could get signals, and if you attach electrodes to my brain and you apply some sort of electric current, you can excite my cells because you can create some fluxes, some current densities in terms of fluxes of ions. Although

you start only with electrons. So you can measure and you can inject, read, write. And this read and write is linear in the sense that it is linear, it's an ohmic relationship. So if you apply with respect to the solution you apply a certain electric potential, electrostatic potential, the current will be proportional to how intense is the electrostatic potential.

Again please remember this the comparison with the gravitational potential. If I have two *reservoirs* of liquid, I don't know whether this helps or confuse you, if you have two *reservoirs* made full of liquid, full of whatever... wine or petrol or water whatever... and you are making their height, you create a difference of electrostatic potential. The electrostatic potential is basically referred to the height. So if they are not at the same height but one is higher than the other, then you will create the condition for a current, for a flux to flow from one container to the other. Here is the same concept and it's a ohmic relationship. Of course there is resistance because there is non-ideal, not perfect, it's not a superconductor, it's not a perfect match, one electron, well it is one electron, one *chlorine* but the... clearly resistance in the wire because it's not an ideal wire and there is a resistance... Stokes law... in the solution.

If you have sodium hypochlorite... so if you have *candeggina* at your place and you have a piece of metal wire... well don't do that because you will... well it's not ruined but it's a... if you have a silver chain or silver ring if you put it in *candeggina* it will be immediately covered by a silver chlorinated layer. And this is how we build our electrodes in the lab. There are other ways that is by electro-deposition. So we apply a specific current, so it's here, and we make the *chlorine* attached to the... to silver. So we subtract current and we get as a result silver chlorinated electrodes.

Pipettes and Patch-Clamp The other element I mentioned many times... the **pipettes**. This is a close view of one machine that we use in the lab to build these pipettes. So we start from borosilicate glass that we buy and they're very expensive and they are very tiny. It's a 1 millimeter or *half a* millimeter diameter made of glass, borosilicate glass particularly. And if you ever seen *of*... being to Venice and the islands around Venice, you know that you can do by heat, you can melt the glass. So if you have this tube of glass... they got a Nobel Prize for this idea... and you put it in one part where there is a filament, I don't think that you see here, but there should be here a sort of ring, and this ring is attached to a battery so when current is flowing in, because the ring has some resistance, is going to heat up a lot. If you go with this capillary inside this ring in the center it will melt.

And if you mount all of this in a system that cost about 12,000 Euros... it's not very cheap... in a system that has some wires, this is another sort of pulley that is pulling the two extremities of, in this case it's an horizontal puller, it's called pipette puller with a lot of originality. So if you *hit* in the center and you start to pull, the glass is melting and getting softer and getting thinner. At some point where you pull with more force and you end up having from each side this melted and very, very, very tiny capillary. The other one remained from the other side of the system. Initially it was just a cylinder inserted in the middle with this ring, it was heated, pulled, heated, pulled in a certain cycle and at the end you end up having with a tip that can be smaller than a micrometer or

even smaller.

And you're familiar with this because you see this in in-vitro fertilization of oocytes, of human oocytes, where people are injecting genetic material taken from men in the oocytes by some sort of pipette. This is obviously for different reasons. And what we use this, we put here inside a very, very tiny silver wire, silver chlorinated wire, silver that stayed in the *candeggina* for overnight and we fill the pipette with a solution that is very rich in *chlorine*. So at the tip of this pipette we have a perfect interface. So we have here... this is silver, this is silver chloride and so this is connected to an amplifier, to a system, to some sort of a battery or whatever, and at the very tip here we can basically count of *chlorine* ions to be our messengers. And if you have some sort of electrostatic phenomena in the bath, in the solution, in the stomach of a cell, I can really be bringing some sort of detector very, very close, and I will be guaranteed to be able to transduce this difference of potential, this current, into a world that I can manipulate with electrodes.

And again, when you do that, you put it under, okay, in this case you need a special contrast technique. I think I show you already this. What you do, you push it into the stomach of a cell, inside. Here there are many pipettes. There are six pipettes and six neurons. And what you see is the experimenter that is changing the focus. And when I say -70 millivolt I'm referring to what the tip of the pipette is detecting with respect to another electrode which is typically called pigtail because it's a... it's a piece of wire, it's... we don't need another pipette. And this piece of wire is just to expand its surface... keeping the surface... sorry, expand its exposed surface keeping the volume small... we wrap it around and it looks like the tail of a pig. Although pigs are... well I don't think they are so curly but still.

And so when I say -70 mV it means that the difference of potential inside minus outside is -70 , is negative, because outside by convention I say that this is 0 millivolt. I attach this to the ground of my amplifier so I say that is... that is zero. And so that's why I'm basically saying inside the electrostatic potential is -70 . Now in the... today and next week I will keep indicating *in* and *out*, but at some point I will maybe drop *out*, because for me *out* means out of the cell and means zero. So here it is *in* with respect to *out*. This is supposed to be the pigtail electrode. And this is the silver chlorinated with a very trivial, very crappy drawing, a very crappy scratch.

So I would like to understand from these first principles, from drift and diffusion, the existence of this difference of potential. And basically somehow I told you that this is not only theoretical, people are measuring it, we do it all the time, by this sort of electrodes and techniques.

The Cell Membrane as a Capacitor And the first things that we might have to encounter is a brief discussion of what the membrane is. Because I understand that I can pinch with a pipette because nowadays I have microscopy techniques that allows me to roughly see the boundaries of the cell. I will not be able to see how thick is the membrane, but I'm able to see whether I'm pinching or not, like for oocytes. And so it might be interesting to see whether this is ringing any bell. That is something that we already know.

And the interesting thing is that these endeavours towards this -70 mV will ultimately be resolved in terms of the permeability of fluxes and ionic permeabilities. Permeabilities are relatives of mobilities and they are related to the fact that the doors are small, they're large, they're closed, they're open. So basically it's only in terms of this selective ionic permeability and ionic flows that I can understand this neuroelectronic world.

In the process, we are going to end up having a fully **electrical equivalent model** of a membrane and of the cell and of the doors and etc. Which is very useful because not only we can say that we understand better a system, an electrical system that we are maybe familiar with. I mentioned in the past hours, Kirchhoff laws of current and voltages. So all this set of things of linear network theory, electrical network theory, that is very easy, very conventional. I might review it for some of you who might be completely empty. But say you have something that it's not obviously the physical system, it's a model. And having models is essential, like it is for a civil engineer, wants to build a bridge. You don't try to build a bridge and see what happens. You have a model, you have equations, you try to combine it, and then you make predictions and you build your system on the basis of these guidance. And you will see how naturally this electrical equivalent model will come.

And this is basically where we are going. So we are interested in excitability. What is, in all the things that I said before, what makes it possible for the membrane potential to change so rapidly, and apparently with some meaning. So not only the resting potential, again, the potential at rest, rest without any stimulus maybe, rest because you are resting, you are not consuming power maybe, but you're not dead, you're at rest. And here there are electrical potentials that are maybe conveying some action. And that's why they are called **action potentials**. They are also called **spikes** because they look like needles, like spikes, like spiky... *punte*, *spilli*. And they are faster. So this is— I show you already many times this particular recording. Let's go on.

We measure this -70 millivolts across the cell. So inside with respect to the outside. And I hope that you had a happy childhood and you played at least once in your life with oil in water. I don't know whether you had a dish or you had a glass. You probably know that oil in water does interesting thing. It basically creates some sort of spheres or circles and it's not mixing because the molecules of oil are **hydrophobic**. It always takes me a couple of milliseconds to remember what is hydrophobic and hydrophilic. Hydrophobic, I imagine, is particles of oil. They are phobic, they have a phobia for water, but it's because of this phobia that they are creating these phases. And that's why, thanks to this, that life evolved. Again, you needed to create some boundary from what is outside and what is inside. And this is the mechanism.

Of course, the membrane of a cell, of any cell, nerve cells or even pancreatic cells, muscle cells, skin cells, blood cells, white cells, is not only composed of lipids, of oily molecules. There are many, many other things interleaved into the membrane, but the properties that I'm referring to are basically mostly made of **phospholipids**. And these phospholipids, I'm just spending one word, you have only to vaguely remember that they have a **head** and they have **tails**, and the head is **hydrophilic**. Instead the tails are **hydrophobic**. And just purely by this electrostatic interaction with water dipoles, I don't have any more wa-

ter dipoles around, these things thrown into the water, they **self-assemble** in membranes, which is to me mind-blowing. So you engineer something according to the rules of the game, which is physics and electrostatics, you put the ingredients there and out of the blue the lowest energy configuration is the one that creates a compartment inside divided from the outside.

Those using hydrating creams probably know that there are two kinds of stable configuration that lipids could get in water. One is what they are called *micelle*, **micelles**, where all the tails are pointing in and all the heads, hydrophilic heads, are pointing out. So they are basically shielding what they, so the tails really don't like to be in contact with water, so they try to really to escape. And they are, sometimes they are used in cosmetic products, they are very common to see this. And another very common for hydration creams is **liposomes**, also for drug delivery. So I'm just making it trivial, assuming that you never heard of liposomes, in which you have that there is another configuration in which it forms, a **double layer** is formed. So the tails are facing each other and there is an internal compartment that is formed as well. And this is the most interesting part because this double layer, phospholipid double layer, is stable. And this is what generally, just on a first approximation, constitutes a plasmatic membrane.

And the story that I told you about this very tiny, so it's a nanometer thick layer of the membrane, of this double layer, has been measured electrically. Because people started thinking, okay, there must be something, there must be a membrane. Well, this was the membrane hypothesis. And outside, I have a lot of ions. Ions are charged carriers. And then inside, I have a lot of charged carriers. So I have two compartments that are basically **conductors**. Not ideal conductors, but conductors. And in between, I have maybe something that does not allow water or other things to flow in. You see, it's very packed. It's like an army, like all soldiers. Okay, the army is a bit unhappy, comparison analogies, like a crowd, and they do not allow anything. And water cannot enter because, energetically, you will need a lot of energy to push a water dipole in, which opens an interesting reflection. If it takes a lot of energy to move something from inside to the outside, maybe something went wrong. This is not an ideal thing because I'm a cell, I need to eat. You also need to take coffee or whatever you can find from the machines here or whatever. You have to go in and out. You have to exchange even information. And if it's so difficult to enter and exit, maybe you need to have some, you have to devote some specific structures, *ad hoc* structures like doors, because going through the walls might require a bit of energy. You could do that if they push you, but it's going to be really, really costing.

But let me go back to this story that there is some conductor here, there is another conductor here, and this seems to be an **insulator**. Does it ring any bell? You have two, yeah, **capacitors**. I know that you are all experts in biophysics, but I hope that those of you who may not would maybe get this analogy. Of course, it's not a capacitor. It's definitely not a parallel planar plate capacitor. It's a biological membrane, but it behaves like, at least geometrically and also functionally, behaves like a capacitor.

So if I have, again, if I know how the electrostatic potential, particularly here, across these two plates is related to the charge, and I know that this is the basic definition of capacitance, $C = Q/V$, I know that maybe I can do, I'm in

the game. So I know that for parallel plate capacitor that at some point... now this is a mathematical model. It's not the real thing, but it's useful and it's actually even beyond the good analogy. It works so nicely that if you take the formula that was derived in physics one whatever of the capacitance... like the ratio between the difference of charge or the change of charge maybe over time, let's say the difference of charge, the different distribution of charge and the difference of potential or the variation of the potential in time, then you can do this and you can understand maybe why you have -70 millivolts from inside with respect to the outside. Maybe you can guess what is the charge difference inside and outside if you know the value of the capacitance.

And the value of the capacitance is known from first principle to depend on the area (A). The larger the plates of this capacitor, the bigger is the capacitance, and the *closer* closely spaced are these plates (distance d), the higher is the capacitance. And you see here that there is the... is the permittivity. So it's the $\epsilon_0 \times \epsilon_r$. And I told you that for phospholipid *belayers* this is around seven.

So if you could, and this is how people did, if you could engineer just maybe not the real cell but if you could take this phospholipid and you can maybe put it say on water... you can assemble something that you know how large is the *surfaces* and you know the permittivity of the lipids. And you can measure electrically the capacitance. You can measure the capacitance injecting some current and seeing how the voltage is changing. So I'm thinking of the constitutive equation of a capacitor, which is $I = C \cdot (dV/dt)$. And I'm tempted to say that if I integrate both sides, I can get some sort of relationship between the voltage and the integral of the current. So if I can maybe inject some current, I can measure the voltage and I can infer the capacitance. This is one way. It's not for instance, it's not the way we do it today for measuring the capacitance of a real cell. We do it in a different way, but people did it and... and they got that it was around in the order of a few nanometers. And for me, this is brilliant.

So, one, you could calculate from first principle, okay, now you know the thickness and the permittivity, and so you can get the capacitance, or vice versa, like they did. You don't know the thickness, but you measure the capacitance. And so this is the formula that you would use. And if you are interested in the capacitance per area unit, so the so-called **specific capacitance**, I'm attached to this because I don't know how big a cell would be. It could be a small sphere or it could be a bigger sphere. I would love to have some value that is a specific physical quantity. So specific means per unit of area. And the number that you can burn into your brain, although in humans, in human cell, people found at least one paper found slightly different value that was half of this value... so it's $1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (one microFarad per square centimeter).

So you see it's per square centimeter. So the total capacitance is... will be known if you specify the area, otherwise it remains this specific quantity. And here you see I only use the nanometer... 6 nanometer... 10^{-9} because it's milli-micro-nano... so it's three... and 10^{-9} . And here I think it's 8.85×10^{-12} Farad per meter, this is ϵ_0 , and 7 is the relative permittivity. And you get roughly for free that you get 1 microfarad which is what you measured experimentally.

And something that you could do is you could get this 70 millivolt interpreting this ΔV and ΔQ as the delta... as a difference in space. So with the two... so

not necessarily in time but in... okay that's another story. And here you will see that if you plug the value of 1 microfarad per square centimeters you can see that a membrane that is 70 millivolts charged is actually storing this amount of current per unit of area. This is kind of interesting *per se*, it doesn't answer still my question saying, but why you have -70 millivolts. Because here you have, this is given. You could also reason the opposite way. You say if this is a difference in electrical charge around the membrane, then you will have -70 millivolt. Okay, but why? Why did you end up with this value of the charge? Nonetheless this knowledge that is basically taken from elementary physics or from electrical engineering allows you to make prediction, to make calculations, to make... to *deeper* your understanding of a biological system... of any cell by the way, not only *your*... of neurons. OK, in humans, people found a smaller value.

The Membrane as an RC Circuit And you might remember that people are fond of studying **RC circuits**, where you not only have a capacitor, but you have a capacitor in parallel with a resistor, which is, by the way— So this is an analogous to having your bathtub or your sink where you wash your face in the morning with a hole. So you have a certain height, and the height is equivalent to the potential that you have on the capacitor. And you have some dissipative system that here is represented by a leak that is contributing to removing the liquid. But anyway, to make a long story short, you probably know that this electrical circuit, for reasons that now I don't want to bother you with... in order to do that you have to derive the equation that describes V as a function of all the other quantities, and you will find the usual boring differential equation, but you will find that the exponent that makes me happy, there is $e^{-t/(R \times C)}$. So the RC of an RC circuit is the **time constant** (τ).

And so today we measure the capacitance by analyzing the time constant, the decay time constant of a real cell. Now it makes no sense because you would say, "Yeah, okay, but here there is a membrane. Where is the leak?" Okay, maybe you intuitively could say, okay so it's not only the membrane, there is... there are some resistors. And there are some resistors and so even if we don't know necessarily the value of the resistor, in one measurement we can see how fast or slow the system is relaxing and we get... we measure the capacitance. But in the old days they did it in a... in a different way because they did not have any... they did not play necessarily with intact cells or they did not play with cells like neurons. They do have resistors.

Let me skip this and let me, before breaking, let me just remember what I wanted to tell you. Okay, this I told you already. And so with this, I wanted to show you two graphs... This is the demo, I did it already, so you can go, you have the link if you want to play once. But I wanted to show you what I did having fixed, glue, anchored charges in free space, at least in a *B-dimensional* settings.

So, I tried to answer this question, and what I did is I myself randomly, so it's a *B-dimensional* system. I have one part of the plane that I call outside, I have one part that I call inside, and I dispersed here inside and outside positively or negatively charged ions. So it's me clicking and I did that, I did this. So negative, you see there are many negative inside and there are very fewer negative outside.

And I put a little bit of, I sprinkled a little bit of positively charged ions. I know I should do it. This sucks. Graphically is not very appealing but I didn't have time and today one could think of doing these things with a... with a Python library that is called Manim. If you are fond of YouTube channel 3Blue1Brown, whatever. So he's actually using this library for making beautiful animation.

Okay I'm not so skilled but I wanted to do the following: if I have a certain distribution of charge then for every point I could measure all the distances and I can calculate the potential in that point. And here is what I did. Clearly you have... you have a sort of thermal map. You have in every point you have a color with a gradient scale that tells if the potential is positive or negative. Now forget about the unit. I... I only care about the negative or positive. Here I actually put random number for distances. I put random numbers for the charge. I did not expect to actually get -80 or -70 . I just wanted to see if... now the question is, so you see the potential is negative inside and it's positive outside. But what I'm measuring with the pipette is a **difference**. So I put the pipette here and I put the other reference electrode here and I take the difference. Here you cannot see, so let me convert this into... Okay, here you are seeing it. So from this point to this point, the difference is -42 . Okay, so the point is it's not the absolute values, it's the difference that should go to -70 millivolts.

And if you do it in 3D, maybe it's easier. Inside you have this negative potential and outside they are positive. So this height should be -70 millivolts negative. So here should be lower than here. So when you take the difference you have something that is already minus, minus something that is positive so it remains minus. So here you would be... you would be tempted to conclude, okay, that's the explanation. That's why you have -70 millivolts. You have a lot of negative charges inside.

Let me show what happens and then we break. Sorry that I'm abusing a few more minutes and we stop early. I will not do another 50 minutes later.

If I put a lot of positively charged ions only outside, very little inside... so this is the dual case. Intuitively I like to think -70 it's negative. In reality is the difference between inside and outside. And this difference would still give rise to negative numbers if I have not only a lot of negative inside and a lot of positive outside, but also if I have a lot of positive outside and little positive inside. So the difference, the height, will still be negative. So you would have the same explanation for an unequal distribution of positive ions. So you will be at square one. Why the hell you have -70 millivolts?

The problem is **anchored charges** and I hope that I did not spoil but in the past two hours I gave you some elements where we are heading, otherwise it would be too boring even if with some culmination in a moment, well probably next week.

So we break for 10 minutes and we continue until 5:45.

Okay, so there are two key points. The first is that ions are not anchored, they are not stuck, they are free to swim, free to diffuse and to drift, to experience drift forces due to their own electric fields. And the other element is that there is a very thin insulating membrane across which we measure the electrostatic potential, the **transmembrane potential**. Transmembrane because it's across

the membrane, inside with respect to the outside.

And what I wrote here is again the concept of capacitors. Capacitors are, the formal definition I think is that you have a set of coupled conductors where the distribution of charge and the distribution of electrostatic potentials are linked, are linked by a property that is called capacitance. And if you can think of this relationship and you divide both terms by Δt , so you're thinking of this change as a change over time, maybe you will recognize that here $\Delta Q/\Delta t$ is a charge divided by time, is a **current**. So somehow the two elements, the two worlds, the two concepts, currents, current densities... Okay, fluxes, but say this is basically currents and capacitance, capacitors that are able to integrate currents in order to generate the potential are the ingredients that we are, as electronic engineers or whoever we are familiar with. If not, I tell you these are very powerful concepts. And it took centuries to get to this relatively simple and elementary picture. Of course it's not over because it's not so trivial now to combine everything and to say, "Okay, so tell me how V comes up." So maybe I tell you, apologies that this is capacitance, maybe I call it with this symbol, is that these ones are concentrations. These are concentrations.

So, summary of the facts. 1. Everything is isopotential, but locally you can lose the electroneutrality. 2. You have multiple ionic species. 3. These ionic species, although we don't really understand how, but they must be unequally distributed inside and outside, otherwise we would not have, we would have no electrostatic potential. 4. And the membrane *belayer* is impermeable to water and ions, so it is acting as a capacitor, as an integrator of current. 5. And okay, this membrane potential that we measure, again, remember it's a difference of potential inside with respect to the outside, and the outside we consider zero. 6. And again if the cell is not dead, and I'm repeating over and over again so there is no thermodynamical equilibrium... and you will hate me in a moment because in a moment I'm going to take this as an hypothesis at least temporarily... but say if I'm not dead it's -70 millivolts. 7. And in excitable cells things are even more interesting, more spicy. This changes, it goes -70 to $+30$ and back.

Ionic Concentrations So first I start with telling you what people did in terms of quantifying the ionic concentrations inside and outside cells, starting from the most famous experimental preparation that is the **giant axon of the squid**. So there is a squid which is this invertebrate that you may have eaten, maybe it's a small one. So it's a giant axon... this guy here, if you dissect it, has a very big thing that is a cell that you can possibly put an electrode inside and you can measure things inside and outside. It's not the axon of the *giant* squid. The giant squid is a marine monster, probably it exists, it's very rare, but this has not been done on marine monsters. It has been done on squid, normal, but they have a big axon.

And this is the situation expressed in millimolar: * **Potassium (K^+)** is concentrated a lot **inside** (400 mM), and not that much outside (20 mM). * **Sodium (Na^+)** is the **opposite**. Sodium, you have a lot of sodium **outside** (440 mM) and a little bit of sodium inside (50 mM). * **Chloride (Cl^-)** is like sodium, you have a lot of *chlorine* **outside** (560 mM) and a little bit inside (52 mM). * And basically **Calcium (Ca^{2+})** is very important because basically calcium is outside, there is a little bit (10 mM), but **inside** basically it's almost **empty**

(10^{-4} mM). You heard probably at Nauseam in other courses that calcium intracellularly is considered a second messenger, is one of the most important actors in biochemical cascades. Well, it is because inside it's basically empty, so as soon as you start having some free calcium ions inside, the cell knows that it means something and it has mechanism to detect that.

Now I tell you something that I hope you will remember for the rest of your days, how to mnemonically remember these, because this is extremely important. In Italy it works nicely. Abroad I had to mention that I was Italian, that for lunch I was preparing pasta, which is the only thing of just a few things that I can cook. And in the water of pasta after, so before, well that's another thing, before or after water boils, I was putting sodium chloride. So, *sale da cucina*. Of course, it's not the only salt, but this is what I have at home and I put it in my boiling pan when I prepare pasta. So, if I taste this, it's salty, okay? It's trivial.

Now the disgusting part starts. In order to remember that outside you have a lot of sodium, so you have a lot of sodium chloride, allow me this, also it *also* for chloride. Imagine that you go... this is disgusting, but I could not find a better alternative. You will maybe propose me. So you go do, you do sport, you sweat a lot, and you lick your own sweat. It's salty, right? So closed... so outside the cell, presumably in the intercellular space. So this is inside and this is outside. In my perverse mind, the sweat is what is outside. So I lick my sweat, I lick and I taste it salty. I'm licking my *exacellular* medium, which is not wrong, of course. What is wrong is that by no means the other salts will taste differently to my tongue. But I hope that you will remember. So if I think, okay, I taste my sweat, it's salty, so it means that **outside I have a lot of sodium**. I have a lot of sodium and inside I have a little bit.

Potassium is the opposite. And you will tell me, have you ever tasted potassium chloride? No. I think it's not even... I don't know whether it's *eatable* if I take potassium chloride. I don't know. So potassium chloride is the opposite. You have very little potassium outside and a lot of potassium inside. Chloride, just because of the same story, goes like the sodium. So you lick, it tastes salty and that tastes salty because it's outside in the extracellular space you have a lot of ions.

It's important and we will see and it's intriguing that you were thinking, wait, I thought that you had a lot of negatively charged ions inside, but no, it seems that you have mostly positively charged ions, but you cannot really conclude what is what, because this guy here is 400 millimolar, it's a lot, and it's inside, instead sodium is 440 millimolar outside. And we said that we should not take for granted the story of anchored, glued charges. So I don't think that we can conclude anything about this. But this is key for the next point.

The Role of Selective Permeability The next point, so the spoiler, at the end, we are going to understand the electrical potential across the cell membrane because, okay, there is an heterogeneous distribution of charges. This we have understood. I think I repeat it too many times. And this, however, it's not enough. What matters is the fact that the **membrane is not permeable to all ionic species in the same way**. It's as if some of you would not be able to come out from the door, and the door would be only making those that are

particularly slim or whatever... would be selective. So the permeability across the membrane is partial. And despite the fact that maybe you have, you see the most beautiful person from the other side, so you're attracted because you're blue or red. Okay, that's maybe not a good comparison. So you are attracted because of a drift or because of diffusion, yet you are not going to cross it because the membrane is not permeable.

And things are getting complicated because we are not talking about only one ionic species. There are multiple. The second point is that we are not talking about the thermodynamic equilibrium because you're not dead, but I will start with the dead cells. And because of these distinct concentrations. So the fact that you have a lot of sodium outside, it's a lot of sodium outside because if I lick my skin, it's salty. So it means outside the cells in the intercellular space, you have a lot of sodium and a lot of potassium inside instead is what makes these -70 millivolts. So it's a collective thing.

This has been, for me, very complicated to appreciate intuitively. I can see why maybe if the charges are not anchored, if they are all concentrated unequally, say, there will be some diffusion, but then after diffusion, diffusing I will get far from my partner and then I will be attracted or repelled. So this I can feel. So there can be drift, diffusion, ping-pong, this I get it. What I don't get is, okay, but what does it matter? What does it mean that if you have a membrane that is semipermeable, then across the membrane you will have a difference of potential. So an unequal distribution say of positive and negatively charged.

So here I did the same cartoon that helped me. Not this one but something similar helped me. So again this is... it's purely a Monte Carlo simulation in the sense that I fake and I put the equation of motions so it's like a Langevin dynamics. There is no gravity. What I did here I only... if I remember correctly I only put... so I put friction of course, I put the random collisions so that I could get diffusion, and if I'm not mistaken I'm only taking care of attraction and not of repulsion. But definitely this is not what a proper molecular dynamical simulation would take into account. So if two particles are getting very, very close $1/r^2$ will go to infinity. I don't have this and at some point I clip so that two particles can... can be one after the other. There are methods from physics where physicists already know how to do this system. But it was already computationally tough, although there are not many particles, to create a stupid movie like this.

So the difference is that we start with the same situation, that you have a lot of positively and negatively charged particles from one side of the membrane, and from the other side of the membrane you have almost nothing. In one case, which is this one, the membrane is as if it's not there. It's permeable. There is no selection. Here, black can cross, red will not. Red will stay on the left. And the numbers that you see below, if I'm not mistaken, are the number of black particles. We will see in a moment. So I launch the simulation and you will see what happens. And you can make a bet what happens after a sufficiently long amount of time what will be the distribution of the red or the black, whether they will be equally distributed or not.

You can see that here the red are crossing, here the red cannot cross. So it seems that because they stay here, they stay behind, the black will say, oh wait,

you didn't come with me, then I'm attracted. I cannot, you don't come, you don't move the cloud, oh, sorry. I don't move the entire cloud, I don't move the entire cloud of things at once. Here it's as if the center of mass of this smoke cloud, the black and the red are basically diffusing and they are bringing each other. Here this cannot happen because the membrane is semipermeable. And this is the entire story.

So in a couple of seconds, or maybe 10 seconds or 20 seconds... this number here is the number of frames, the number of step of the simulation. It's something for me to show me that things were moving. Here, you end up having, I think it's the red. No, sorry, it cannot be the red, because otherwise it would be zero. So the black here will be 50/50, because there is no selection. Here will not be 50/50. And you can already appreciate it. OK, it's fluctuating because it is a stochastic simulation. It's a numerical simulation of a system that is, say, it's at the equilibrium, but in a statistical sense. But here you actually see that there is a so-called breaking symmetry, instead on the left. So the fact that the membrane is opposing the passage from one ionic species is enough to create an unequal distribution, a dynamical unequal distribution. So something has to do with membranes and something has to do with permeability, but I have no idea what permeability is. There I'm talking about fluxes in the open space, so there is no permeability. Okay, maybe I could imagine that the mobility, I could make the mobility at some point in some, although it's a property of the molecule, but I could maybe say at some point the mobility goes to zero. But it's not very elegant because it seems that I have to tweak something. In other words, electrically, I'm talking about that here, there is no resistance. So the current can flow in both directions. Here there is only... some ionic species have a non-infinite resistance. So here the resistance is zero, here for some ionic species selectively is infinite. So there you cannot change. Of course if it's not infinite but it's very large, still you would have this breaking of the symmetry.

Ion Channels, Pumps, and the Electrical Model Okay. So the doors that I anticipated to you are physical doors, physical pores, and these pores are called **ionic channels**. I don't know whether in the module of Professor Zoli you have heard of something like this. Are proteins... they are called surface proteins just because they are expressed at the surface of the membrane. So you actually see here the double layer, the phospholipid double layer, *b-layer* whatever. And these proteins are not inside the cell, they're not outside, they stay in between. They stay in a part... in... in a domain that is called lipophilic, so it's philia for lipids. So... So they love being with lipids. And these proteins might have a different distribution of charge, of electrical charge, so that they are stable there. So you cannot pull them away unless using a big force. What they can do, they can slide horizontally on the surface of the membrane so much that this cartoon, this conceptual model, was called for many years, I think it's still called **fluid mosaic**. So the membrane is a collection of particles and structures, lipids, and it is as if they swim on the surface of the sea like kids when they have these inflatable things, *braccioli* or *salvagente*. Of course if you want to go down or up you have to spend a lot of energy and so naturally this does not happen.

But if these proteins are creating some sort of space in their inside due to their

three-dimensional conformation, and if you are an ion, you can move freely or not freely inside the pore, then this is like a passage of ions across the membrane with a bridge, with an easy path that does not require a huge amount of energy like the lipid *belayer* would require this strain. And in fact our colleagues went through a pore and not through the walls.

So these are pores and it turns out that you have specific pores only permeable to sodium ions, they are called **sodium channels**, and you have pores that are only selective to potassium *channels*, that are called potassium ions, they are called **potassium channels**. You have *chlorine* ion channels, you have some ion channels that are permeable to all ionic species, and you have some other mechanism of transport, which they are not passive transport like these two cases, where you basically, if you have the energy to do that, or simply by purely diffusion, by purely thermal agitation, can go in and out without problem.

Of course if you have a -70 millivolt difference of potential across the membrane it means that you have an electric field, then it might be easy or difficult depending if you are positively or negatively charged ion species. Say for sodium ions will be very easy because ion is concentrated a lot outside (because I lick and I feel tasty and my *swept* is salty) and so it's positive. Inside is more negative than the outside. So I can move along the electrochemical gradient, the electrical gradient. Well it's also electrochemical because I have a lot of sodium outside and a little bit inside. So by diffusion as well as by drift I will be able, if I'm a sodium ion, I will be able to enter. If I'm inside will be more difficult because I will move against both the diffusion and the drift.

But this is still passive. There are active mechanisms, like I cited a couple of hours ago, called **ionic pumps**. And these ionic pumps, I imagine them like some sort of mechanism. And they have been described mechanistically like some sort of rotating things or machinery, molecular machinery, that are able to exchange against the electrochemical gradient. So for instance, sodium I told you it's very easy to flow in, but very difficult to get out. But if you have ATP, so if you eat your bananas and chocolate and you have adenosine 3-phosphate molecules that can be used as a currency for converting, so they are used for storage of energy, and you can spend this energy, you can activate from one cycle this ionic pump, and you can extrude three sodium ions, and you pull in two potassium ions. Remember that you have a lot of sodium ions outside and a lot of potassium ions inside. So this truly requires a lot of energy. It's not passive.

So this is important because these ionic pores or ionic channels, the pumps we will not probably consider. We will not discuss it in details anymore. But the ionic pumps are to me resembling a metal wire or a **resistor**. If I'm an ion, I can go along. There is a capacitor here, but this capacitor must be some sort of parallel between the capacitor and there are these resistors. Because if I'm an ion, I can, yes, I can impinge in the membrane here and I will hit the insulator. Okay, if I'm approaching here and I'm a positive ion, just by electrostatic induction, I will attract my opposite from the other side. But this is going to be only a so-called displacement current. But if I just move a little bit on the right in parallel to this capacitance, I have a resistance because ions can flow and this will be a transport current where the current is physically,

explicitly moving. It's not just an indirect effect because I'm getting close to the membrane and because of my charisma, I'm attracting somebody from the other side. No.

Yes, there will be some movement but this is not a transport current. A transport current I need to have pores.

So this is another model, and it's some sort of physical wire. Of course, the channel is very tight. It maybe will make only one sodium, one potassium ions at a time, so it will be tough for the ions to pass. It's kind of tight, so friction will be large, or at some molecular scale will be not easy to have two or three sodium ions going simultaneously. But it still matches perfectly the definitions of the **Ohm's law** that says that you have some relationship between a difference of potential and the transport current that is proportional one to the other by a resistance.

So this is just to set ideas for what an equivalent mathematical model would be. So this is what is called an **electrical equivalent model**.

So if I'm a sodium or whatever, potassium, so here it's different, so this is a potassium ion. This is inside, this is the outside. Potassium is highly concentrated inside and very little concentrated outside. In fact, if I *lick*, I *lick* the sodium, not the potassium. I know, this is the fault of that comparison. And *cross* the membrane through this resistance. No, sorry, this is, sorry. Inside the cell and outside the cell, ions can move freely. Maybe they encounter some friction because they have a mobility and this mobility is not infinite. So they do encounter friction due to the viscous property of the medium. And if one ion wants to go from inside to the outside, if there are the conditions to do *so*, it can do it provided there is a bridge.

The conditions would be that you have an electrochemical gradient. You have a lot of potassium inside, so diffusive. In terms of diffusion, you will diffuse. This is the **Fick's law**. The movement, the diffusion will happen from points where there is high concentration to points where it's lower concentration, minus the derivative of the concentration with respect to space. But if you can do that, well, here I need the pore. Otherwise I will hit the insulator, this capacitor.

So the capacitor is there and it's a sort of property per unit of area. So this is clear, it's fine, but they are not only capacitors, they are resistors. Some of them are resistors. And if you allow me to make a first approximation of many, many approximations that I will do and that I did already so far, this resistance is much larger because here it's a very tiny space. So although we call the Stokes law... we only call it λ , we did not open and say, okay, what is in the geometry of the hole... the *map*... the particle moving... you can probably understand that here moving inside here it's different than moving freely inside and outside. So by comparing this resistance that is placed in parallel to this series of resistance that are... that are placed here inside in series and outside in series, maybe I can approximate that this is like a shortcut. So it's basically negligible. It means that if I have an electrolyte, in solution, the conductivity of the electrolyte is such that, OK, the conductivity is not infinite, but it's as if it's a piece of copper without resistance, with very low resistance, both inside and outside.

So by the way, now you get the **RC circuit**. So the suggestion that I told you that you could measure the properties of the membrane by looking at capacitive transients, now you get it for free. Because you do have resistance and capacitors as I *introduced* the pores.

Okay, there is the membrane potential and this seems to be it. And the question is now, are we done? So basically you have a series of parallel of capacitors and resistors. Maybe you have one resistor per ionic species, but I don't see how you get -70 millivolts. I can maybe say or see that if you put here charge and you have -70 millivolts, I know that after a while because of these resistors you will not have any more -70 mV. You will decay to zero. You will have leak. So this is not clearly enough.

And it's not enough because this is not the perfect model of the pore. It's not the perfect model because yes it's acting as a resistor, but inside here and outside you have two solutions made of different ionic species. It's like Alessandro Volta in his battery. He had two environments with different solutions. And they are joined together. So when they are joined together, there is a battery. There is an effect of an endogenous generation of electric potential.

But this is blah, blah. Let me, probably next week, but let me at least tell you what will be the plan to understand it.

The Path to the Nernst Potential So ions are flowing across the permeable membrane, and these two compartments are made of unequal distribution of concentrations. And we only, only, where is it? Yeah, I only simply tell you the strategy and we do it next time.

What we are going to derive is the **Nernst potential**, which is at the **equilibrium**. So now I am really assuming in the next three minutes that we are dead. And the rest we'll see.

So if you have diffusion and you have drift, one thing that you can try to do is you can say in general one molecule or one mole could experience simultaneously drift and diffusion. So what you might have to do is understanding what is the total flux. The total flux is $J_{diffusion} + J_{drift}$.

Let's think that we only have one ionic species. We only have one ionic species. We will not do it. I simply tell you what the plan is. One ionic species. The membrane is permeable to this ionic species. And what else do I need? I need that I consider that it's over. I'm dead. And basically we are at the **thermodynamical equilibrium**.

If we are at the thermodynamical equilibrium, it means that nothing is moving. Nothing is moving. So the **total flux is going to be zero**.

So next week, what I will try to do is to say that everywhere across the membrane, the membrane is... I want to keep the membrane because I want to have two points where I will try to attribute a membrane potential, and the potential is there, so it only awaits to be manipulated, *massaged* in some way. I anticipated we will have to integrate it.

And the assumption that is clearly wrong, although we will see later on that is useful, is follow what Nernst, one of the greatest biochemists and biophysicists

who existed, what he assumed. He said, okay, in general you have both terms, but it's zero. So zero means not that the drift is compensating for the diffusion, it's that one is the opposite of the other, because it's the *total* flux that is zero.

$$J_{total} = J_{drift} + J_{diffusion} = 0 \implies J_{drift} = -J_{diffusion}$$

This is maybe a little bit, it's not counterintuitive, because for me I see it, the total flux is the superposition of both. If you have an ionic species that is charged and *unequally* distributed, I both drift and diffuse. I cannot do only one. And if I say, look, it's dead, so there is no net flux, that means that this is zero. I cannot assume, it would be wrong to assume that I only do diffusion or I only do drift. No, it's their combination that is zero.

And you can, next week, we are going to, if you want, you may try to do it by yourself. If you assume that one is equal *to* the opposite of the other, you end up with two terms with an equation that is, it is a differential equation, but it's by no means boring and not trivial and not usual. You have this stuff, so this is cancelling out because it's there. So that's why I wanted to keep it like that. Okay, so mobility and concentration are done. Although concentration keeps existing here. But it's interesting that the mobility goes out of the way. So it doesn't matter if it's a big, fat ion or a small, slim ion. Apparently it doesn't for this picture. In the more realistic picture, it does.

And then you have... So this is a number, this is also a number. You have this term and *these* terms that are basically one minus the other. What do you do with this? We'll see you next time. The spoiler is we may try to cancel the derivative, integrating both sides. If you're brave, try, and I'm happy to answer questions.

Okay.

Introduzione e Annunci

Bene, un po' troppo... ora c'è il volume. Ora provo a parlare a più bassa voce, un po' mettendo il microfono più basso. Buongiorno. Una domanda di servizio: ma voi Teams lo usate o vi fa proprio schifo?

Perché ogni tanto, nei giorni della settimana scorsa, ho buttato lì qualche informazione, tipo quella che avete una finestra limitata durante il mese di dicembre per prenotare il vostro *spot... slot...* durante le sei sessioni d'esame tra gennaio e febbraio. Ma anche articoli, o notizie, o link che potrebbero essere di vostro interesse.

Credo due settimane fa di averlo fatto con un tema che un vostro collega mi aveva menzionato, quello della ricerca sulla coscienza, quindi il correlato elettrofisiologico della coscienza. E vi ho messo dei video, degli articoli e dei libri, dei link a libri. E così ho fatto un paio di giorni fa con questo articolo di ***Nature Communication*** che era stata ripresa la notizia da quest'altro sito, ***IEEE Spectrum***.

Buttateci un occhio, potrebbe essere interessante. Non me ne frega niente che facciate *like*, ma [è] per sapere se siete vivi e se siete potenzialmente *engaged*, potenzialmente interessati.

Quiz: Distribuzioni Ioniche In particolare, c'era uno stupido quiz che vi ripropongo, perché solo in due di voi mi hanno dato conto. Ed è questo qua.

Nel frattempo che vi registrate... *for the main time for the attendance tracking... this is the question. It is: what is the ionic distributions inside and outside? You remember the disgusting, but I hope, lifetime memory-effective hack that I suggested to you. So you have these four possibilities. You should tell me which one is the correct one. And of course I'm talking about a biological membrane, and so 'in' and 'out' is around the inside and outside the membrane, the plasmatic membrane of a living cell. Which do you think it is?*

So, how many of you think that is the first one? So, you have more sodium outside than inside and you have more potassium outside than inside. Who thinks the second is correct? The third one. Fourth one. There is maybe a fifth possibility. I think those of you who raise your hands at the second one, indeed, you're right. Il sodio e il potassio, la loro concentrazione è l'una l'opposto dell'altra.

And it will be very clear to you why the swap is relevant. You will remember without problems. The fact that you have a lot more sodium outside is sort of easy to remember with this disgusting thing that I suggested to you. Well, you could think... I think I spotted in my slides, I forgot, there is a gentle kitten, like a cat that is licking his paws instead of me licking the extracellular solution. But anyway, it's salty, you have a lot of sodium outside and a little bit inside.

Il Potenziale di Membrana a Riposo (Resting Membrane Potential)

So, *let's go back on what happens.* Il nostro compito è capire perché questo dannato **-70mV** è il cosiddetto *resting membrane potential* (potenziale di membrana a riposo). Chiamiamolo equilibrio, ma non sto parlando di equilibrio termodinamico, sto parlando di condizione di riposo (*resting condition*). E questa condizione di riposo ha significato quando si parla di cellule eccitabili, dove il potenziale di membrana può cambiare. Ma comunque, in tutte le cellule, anche quelle che non sono in grado di cambiare rapidamente il potenziale di membrana, si ha un potenziale elettrostatico negativo all'interno rispetto all'esterno.

Diffusione e Deriva (Drift) Per capirlo, dobbiamo partire da qui. E l'ho già, nelle ultime two classi, penso di aver provato a spingere, in particolare la settimana scorsa, ho provato a spingere questa idea: le cariche non sono fisse, sono libere di muoversi. E c'è deriva (*drift*) e diffusione (*diffusion*). E una volta che derivano (*drift*), in qualche modo innescano (*triggering*) la diffusione, e viceversa: man mano che la diffusione avviene, allora si iniziano ad avere campi elettrici.

Quindi, questa è la tendenza naturale di ogni cosa a diffondere e a concentrarsi equamente ovunque nello spazio. E questo è il fatto che le particelle sono elettricamente cariche. E quindi, se si muovono, potrebbero percepire le forze di Coulomb, e si stanno effettivamente muovendo in un campo elettrico.

Quindi, qui stiamo parlando della formazione di un potenziale elettrico nello spazio attraverso una membrana. La membrana è semipermeabile. E il punto di partenza... in realtà si può vedere in due modi... ma il punto di partenza è

che si ha una concentrazione diseguale di ioni, e quindi, un potenziale elettrico si genera “gratuitamente”. Questo è il principio delle batterie, delle batterie chimiche.

Quindi, si ha una distribuzione diseguale. Bisogna spendere energia per rendere le cose diverse all'interno e all'esterno. E gratuitamente, o non gratuitamente, ma in cambio di questa energia che hai fornito... (ecco perché mangiate banane, cioccolata, eccetera, solo per stabilire e mantenere nel tempo questo potenziale elettrostatico attraverso la concentrazione diseguale)... allora si hanno questi fenomeni elettrici.

Iniziamo prima con questo, che è sbagliato. Vedrete perché è sbagliato, l'ho già menzionato: è il fatto che stiamo invocando la condizione di equilibrio che, vi ho detto, [c'è] solo quando sei morto. Lasciatemela prendere comunque.

Preliminari Matematici: Integrali e Taylor E gli elementi che... i preliminari matematici che ho bisogno di rinfrescare o di ricordarvi è questo semplice integrale definito della funzione $1/x$, che è molto famosa. Ed è... l'integrale di $1/x$ è il logaritmo di x ($\ln(x)$), la cui derivata è l'integrando. E poiché è un integrale definito, ha gli estremi. E quindi, il teorema fondamentale del calcolo integrale dice che si prende la primitiva, la si calcola nell'estremo superiore meno la primitiva calcolata nell'estremo inferiore... *lower interval element*.

Quindi, nel caso del logaritmo, si finisce per avere la differenza di logaritmi, e il logaritmo è una bella funzione tale che la differenza di logaritmi è il logaritmo di un rapporto. La somma dei logaritmi è il logaritmo del prodotto. E questo è quello... solo per ricordare vagamente... vi ho già detto che questo è quello che... mi sono dimenticato di portarvi il righello, il regolo calcolatore. *In the old times*, gli ingegneri non avevano nemmeno calcolatori digitali, e facevano prodotti e divisioni semplicemente sommando cose, sommando misure. Quindi sommarono o sottraevano quantità, a condizione che i numeri, le lunghezze, non fossero codificati linearmente: erano codificati come logaritmi, e potevano fare gratuitamente rapporti e moltiplicazioni.

E le altre cose a cui accennerò e lascerò come esercizio a voi sono le espansioni di Taylor in serie di polinomi, che sono semplicemente arrestate al primo ordine. Quindi, tra poco, forse tra un paio d'ore, vi darò il compito, e dovrete farlo da soli senza problemi: come approssimare una funzione attorno a un valore in cui la funzione è calcolata, è nota. E sapete che è il valore di quella funzione più... è una linea retta, è la linea tangente... è la nuova variabile indipendente e la pendenza, quindi la derivata prima calcolata in quel punto.

L'Equazione di Nernst Quindi, questo è il signor Nernst, un altro gigante, che ha seguito questi semplici calcoli. L'ipotesi è che ci sia equilibrio, e per semplicità stiamo considerando solo una singola specie ionica. Non mi interessa se sia sodio, potassio, ma solo una: calcio, magnesio, solo una. Ed è all'equilibrio.

Equilibrio significa che il flusso totale (J) è uguale a zero. Vi darò più tardi un altro paio di elementi per capirlo intuitivamente, perché in effetti, potreste forse pensare che la cosa giusta da fare sia dire che la diffusione deve essere uguale alla deriva. Questo non catturerà l'equilibrio. Quella è un'altra condizione. È

qualcos'altro. Non è... questo sarebbe un bilancio. Invece, voglio investigare cosa segue dall'idea che "tutto è all'equilibrio".

Quindi, il flusso totale è zero. E se il flusso totale è zero, significa che uno è meno l'altro. Perché il flusso totale è la somma dei due flussi. Ed è la somma... vedrete tra un momento... a causa della conservazione della massa. Ecco perché avete questa somma. Ma dovrebbe essere semplice, anche intuitivamente, capire che i flussi sarebbero composti linearmente, additivamente, dai due termini.

Quindi, lasciatemi prendere questa ipotesi e lasciatemi considerare solo un caso unidimensionale, monodimensionale, in cui ho una membrana semipermeabile, ma la uso solo per suddividere lo spazio, fondamentalmente in tre domini, ma non vi annoierò con ciò che accade all'interno della membrana. Ha uno spessore che non è infinitesimale. È finito, anche se piccolo.

E quella somma è zero, il che significa che uno è meno l'altro. Ho l'espressione matematica di ciascuno di essi. Le abbiamo derivate, la maggior parte di esse... non per la diffusione. È solo parziale, perché vi ho detto che non posso spiegarvi facilmente la forma... la forma analitica del potenziale per quel campo di forza.

E ce l'ho qui. Questo è il flusso di diffusione... scusate, il flusso di deriva... no, diffusione (*diffusion flux*)... e questo è il flusso di deriva (*drift flux*). E vedete che siete tentati, e lo faremo, siete tentati di semplificare quegli elementi che sono comuni e sono, ovviamente, non-zero. Quindi la mobilità (u) e le concentrazioni (C) sono in generale non-zero. E accade già qualcosa di sorprendente: che nell'espressione che rimane... Quindi, questa è l'ipotesi, e questa è... deriviamo logicamente tutti i passaggi... è che la mobilità scompaia. Come se la mobilità non giocasse alcun ruolo, il che è un po' strano. Ma nel caso dell'equilibrio, sì, è così. Non importa se sei uno ione grasso o magro che si muove in una soluzione acquosa con tutti questi dipoli d'acqua, quindi il guscio di idratazione (*hydration sheet*). Non importa, solo le condizioni di equilibrio saranno le stesse.

E vedete qui, non conosco la concentrazione (C) e non conosco il potenziale (V). Quindi non è propriamente un'equazione differenziale che posso risolvere. Ma almeno, poiché vedrete che c'è una derivata qui (dC/dx) e una derivata qui (dV/dx), forse se quell'equazione è vera, sarà vera anche, per linearità, la stessa equazione dopo aver applicato il segno di integrale a entrambi i termini, a entrambi i lati dell'equazione.

E prendo questo integrale attraverso l'intervallo di integrazione, che si estende, descrivendo la membrana. Vedete x_{in} e x_{out} . Quindi ho rimosso $u \cdot C$, e non ho fatto nient'altro. Spero di non aver dimenticato il meno. Sì.

Quindi, è facile, perché qui questi sono... perfetti. Quindi l'argomento di questi integrali sono differenziali perfetti. Quindi è già la derivata, e l'integrale e la derivata si annullano... voi non sarete... ma non siete matematici, anche se siamo nell'edificio di matematica, quindi dobbiamo stare attenti. Non potete semplificare questo. Questo non è realmente un rapporto (dC/dx). È una notazione di Leibniz per le derivate, ma non vi è permesso farlo.

E di nuovo, per il teorema fondamentale del calcolo integrale, RT viene portato fuori. È solo una costante. Allo stesso modo Z e F , non cambiano all'interno della membrana. E ciò che rimane è l'integrale di una derivata, quindi la primi-

tiva è il $\ln(C)$, e qui la primitiva è V . Calcolo ciascuno di essi in ciascun estremo e sottraggo.

Quindi questo è $\ln(C_{out}) - \ln(C_{in})$, e finisco per avere questa espressione.

$$\Delta V = V_{in} - V_{out} = -\frac{RT}{ZF} \ln\left(\frac{C_{in}}{C_{out}}\right) = \frac{RT}{ZF} \ln\left(\frac{C_{out}}{C_{in}}\right)$$

Quindi mi chiedo, forse alcuni di voi hanno tentato durante la scorsa settimana questo calcolo. Non è complicato. Non c'è nient'altro da ipotizzare. Poiché è una differenza di logaritmi, si può calcolare... si può riscrivere come il rapporto delle concentrazioni.

Ed è per questo che è assolutamente fondamentale che l'unica cosa che dovrete ricordare del logaritmo... diciamo, della funzione logaritmo di x , è che attraversa l'asse, l'asse orizzontale, a 1. E per l'argomento che è maggiore di 1, è positivo. E per l'argomento che è inferiore a 1, è negativo.

Perfetto, proseguiamo.

Sto facendo del mio meglio, ma a volte è dura... e dovrete parlare nel caso siate spaventati.

Ora, questo è davvero importante, perché il rapporto C_{out}/C_{in} è questa cosa su cui sto iniziando a insistere. Non mi interessa se ricordate 400 millimolare fuori, 50 millimolare... Quello che conta è che ricordiate cosa è più grande, se *in* o *out*.

Applicazione dell'Equazione di Nernst agli Ioni Quindi, se stiamo istanzando questa equazione, assumendo che questo $[C_{out}/C_{in}]$ sia noto e questo $[\Delta V]$ non sia noto, per il **sodio (Na)**: il sodio all'esterno è più concentrato che all'interno, quindi questa quantità $[C_{out}/C_{in}]$ è positiva. Quindi siamo qui [argomento > 1], quindi il logaritmo è positivo.

RT , qualunque cosa... quindi T è in gradi Kelvin... *states at room temperature*... Z è 1. Quindi, posso dirvi che questa cosa qui, RT/ZF , che potreste anche scrivere in modo equivalente come kT/Zq se venite dalla famiglia dei fisici invece che dei chimici... è lo stesso. Potete vedere nella lezione passata elementi per andare da un lato all'altro. Fondamentalmente, R e F , la costante di Faraday e la costante dei gas... *Riemann*... costante dei gas, sono parenti stretti.

Quindi, questa quantità per $Z = 1$ (la valenza del sodio, che è solo 1, la valenza è 1, ha solo 1 carica elementare, positiva), questa quantità a temperatura ambiente è intorno a **26 millivolt (mV)**.

Quindi, prima di tutto, dovrete imprimerlo nel vostro cervello: questo è millivolt. Ovviamente, il logaritmo di qualcosa è adimensionale. E ha senso che sia il logaritmo di qualcosa che è adimensionale. Quindi questa quantità $[C_{out}/C_{in}]$ non ha dimensioni. È un rapporto tra due [concentrazioni] millimolari. E quindi le unità si annullano, non è più una quantità fisica con misure fisiche. Quindi va bene. È una garanzia che siamo sulla strada giusta.

E quindi, sì, questo è millivolt. In effetti, questa differenza di potenziale all'interno rispetto all'esterno è in millivolt.

Non so se qualcuno di voi ha una calcolatrice o anche sul vostro telefono cellulare. A volte avete, se lo inclinate nell'altra direzione, la calcolatrice scientifica dove potete calcolare i logaritmi. E se ricordo correttamente, 400 diviso 50... potremmo farlo semplificato... No, non posso farlo perché questo non è un logaritmo in base 10, quindi non posso fare logaritmi senza una calcolatrice.

Se qualcuno di voi ha un log... una calcolatrice e fa per me il logaritmo di 400/50, di sicuro dovreste ottenere un numero positivo, perché il numeratore è più grande del denominatore. E vedremo, moltiplicando questa quantità per 26 millivolt, vedremo qual è il potenziale elettrico che avrete attraverso la membrana se avete una concentrazione diseguale, come avete, di ioni sodio.

Posso dirvi che è intorno ai **50 millivolt**. Quindi penso che questa quantità $[\ln(400/50)]$ sia circa 2 punto qualcosa, o giù di lì. *What was that?* Okay.

Quindi... 26, 25... Okay, non è -70 millivolt. Quindi sono deluso. Ma è molto intrigante, perché in questo modo abbiamo una sorta di indizio, il primo passo per capire perché si hanno fenomeni elettrici, in particolare l'insorgenza di un potenziale elettrostatico per una distribuzione diseguale di cariche, il che non è banale.

Questa non è l'unica storia, perché prima di tutto, non si ha una singola specie ionica, e non si ha l'equilibrio. Ma l'equilibrio... lasciatemelo discutere tra un momento.

Il Potenziale di Nernst come Batteria Quindi, equipaggiati con questa conoscenza, quello che fondamentalmente avete di fronte è un modello matematico. Avete una membrana, avete una distribuzione di ioni, e fondamentalmente avete una **batteria**, come la pila di Daniell o la pila di Alessandro Volta. E questo è anche chiamato... quindi è l'equazione di Nernst, ed è chiamato potenziale di Nernst (o potenziale di equilibrio) per ovvie ragioni. Ed è specifico per quello ione.

E ora vi darò i numeri per il sodio, per il potassio, per il cloro, per il calcio. L'unica cosa che dovete sapere è l'ammontare della concentrazione all'interno e all'esterno della membrana. E, naturalmente, approssimativamente, e spero che ve lo ricorderete per il resto della vostra giornata... L'unica cosa che sarete in grado di dire, anche senza ricordare o senza conoscere i numeri, è se questo potenziale di equilibrio è positivo o negativo per diverse specie ioniche.

Proprio perché ho iniziato a stressarvi con questo: per gli **ioni potassio (K)**, che vi ho detto sono l'opposto... quindi, il sodio lo leccate e sentite salato all'esterno perché c'è molto sodio fuori e poco dentro. Per il potassio è l'opposto. Quindi avete molto potassio dentro e poco potassio fuori.

Quindi quel rapporto, C_{out}/C_{in} , invece di essere maggiore di 1, per il potassio è **inferiore a 1**. Inferiore a 1 significa [logaritmo] negativo. Non va... L'argomento è ancora positivo. È solo il rapporto che è inferiore a 1. È ancora una quantità positiva, quindi non stiamo violando alcuna... matematica, quindi non stiamo superando il dominio di questa funzione. E siamo in questa parte [argomento < 1] dove il logaritmo è negativo. Va molto rapidamente verso il negativo. Quindi probabilmente penserete che sono molto fiducioso che forse -70 millivolt provenga dal potassio. Ovviamente, non può venire dal sodio.

E okay, qui c'è quello che ho già detto. 300 gradi [Kelvin], che sono circa 20 gradi, 25 gradi [Celsius]. Quindi è... sapete che i gradi in Kelvin... beh, è tipo zero gradi [Celsius] quando siete a -273 Celsius. E quindi T è in Kelvin. Quindi questo è in gradi Kelvin. Ma comunque, 26, 25 millivolt è la cosa da ricordare quando il denominatore Z è 1. Per il **calcio (Ca^{2+})**, sarà più piccolo. Sarebbe 13 millivolt, perché avreste un numero due sotto. Il magnesio sarebbe lo stesso, ma non parleremo del magnesio.

Quindi alcuni di voi hanno la calcolatrice. Potreste provare, ma altrimenti vi darò... Ma l'unica cosa, vedete, il potassio è l'opposto del sodio. Quindi per il potassio, di sicuro, questo potenziale di equilibrio sarà **negativo**. Il sodio sarà **positivo**. Il **cloro (Cl^-)** è un po' strano perché Z è **-1**. Quindi avete un meno. Quindi dovrebbe essere, diciamo, 50 millivolt, o forse sarà 60 millivolt. Ma in realtà, poiché il C_{out}/C_{in} è maggiore di 1, ma c'è questo meno di Z , la valenza, perché è carico negativamente... Quindi questo $[\ln(C_{out}/C_{in})]$ sarà positivo, ma a causa di $Z = -1$ il potenziale sarà **negativo**. E questo [per il Calcio] sarà positivo perché vedete, fuori ne avete davvero molto. Quindi probabilmente sarà molto grande. Forse non così grande perché il logaritmo non sta crescendo... sì, sta crescendo e va all'infinito, ma non cresce così velocemente.

Valori dei Potenziali di Nernst Quindi ecco i numeri che potete ottenere, giusto una volta nella vostra vita per fare questo calcolo con un logaritmo, che, tuttavia, dovrebbe essere verificato incrociando [i dati] con la vostra intuizione, con questo grafico del logaritmo.

E quindi eccolo: * **Potassio (K^+)**: **-77 mV**. Dannazione, non è -70. * **Sodio (Na^+)**: **+56 mV**. * **Cloro (Cl^-)**: **-68 mV**. Vicino, ma non quello giusto. * **Calcio (Ca^{2+})**: **> +100 mV**. (più di 100 millivolt)

E tutte queste batterie, a seconda che il potenziale sia positivo o negativo... puramente per convenzione, ho scambiato il simbolo, il simbolo elettrico, solo per convincervi che uno è positivo all'interno rispetto all'esterno, e a volte è negativo. Ciò significa che sarebbe positivo nell'altra direzione. Ma non importa. È solo per quelli di voi non necessariamente familiari con questo simbolico puramente convenzionale... Quindi il simbolo del componente elettrico, solo per dirvi cos'è.

Un Potenziale, Molti Ioni Quindi sto solo... spero di non eccedere. Mi direte se sono troppo teatrale. Quello che volevo trasmettere è che non può essere -70 millivolt. Quindi il potenziale di membrana a riposo non può essere, o non dovrebbe essere, o in linea di principio non dovrebbe essere, il risultato di una sola specie ionica se all'interno e all'esterno si hanno molti ioni.

E quindi, qui, questo l'equazione di Nernst è molto potente, ma ci lascia con una domanda, che è: come li combino? Come... li medio? È la media aritmetica? È un qualche altro modo per combinarli? Perché non so come farlo, ma vorrei considerare una cellula in cui ho sodio, potassio, cloruro e calcio dentro e fuori. E vorrei sapere, okay, perché se prendo due elettrodi, uno dentro e uno [fuori], perché misuro -70 millivolt?

Quindi questa è una chiave. Ecco perché ve lo sto presentando, nonostante il fatto che le ipotesi siano, lo sottolineo, l'ipotesi principale è che tutto sia all'equilibrio.

Un momento fa ho fatto un errore. Invece di chiamarli potenziali di equilibrio, li ho chiamati **potenziali di inversione** (*reversal potentials*). Forse tra un'ora vedrete perché è un nome legittimo, perché questi sono anche chiamati potenziali di inversione per una singola specie ionica. Per il momento non è chiaro. Inversione di cosa? Inversione forse di qualche flusso, ma in quali condizioni, visto che stiamo pensando all'equilibrio o alle condizioni di riposo? Quindi non è chiaro, ma sarà chiaro.

Quindi, deve essere una combinazione. Ma come?

L'Equazione di Elettrodiffusione Prima vorrei dirvi molto brevemente perché la storia... perché alcuni di voi potrebbero essere infastiditi dal fatto che molto rapidamente ho finito per dire: “se è equilibrio, allora metto il flusso totale a zero e uno è meno l'altro”. Alcuni di voi lo accetteranno, ma forse sto parlando a quelli che... no, non ci credono, vogliono vedere.

Quindi farò un passo indietro e dirò: lasciate che vi parli dell'**equazione di elettrodiffusione**.

Quindi, in generale, non sto parlando di nessuno stato stazionario (*steady state*) o di alcun equilibrio. E l'unica cosa che sto invocando è la **conservazione della massa**. La massa non viene distrutta né creata. E se ho una soluzione... *accurate*... acquosa, posso fondamentalmente... permettetemi di considerare per semplicità solo un caso monodimensionale. E ho un punto. In un punto, potrei avere i flussi (J), potrei avere le concentrazioni (C), potrei avere i potenziali elettrostatici (V), se ce ne sono. Posso caratterizzare... Quindi tutte queste quantità che ho menzionato dipendono dallo spazio (x). Forse dipendono anche dal tempo (t). Ma dipenderanno sicuramente dallo spazio.

E come ho fatto per il flusso, lasciatemi prendere di nuovo una superficie che in questo momento non è infinitesimale. Forse è piccola. La chiamo ΔS , è la superficie. È una superficie di sezione trasversale. E prendo, nell'altro caso, stavo pensando alla definizione di flusso, e stavo misurando il tempo Δt , e poiché la velocità... questa formula... *neural*... che collega le velocità alle forze, e poi i flussi alle forze e alla velocità... qui sto solo pensando a Δx .

Quindi in questo Δx , copro un certo volume tra x e $x + \Delta x$, e lì sto affermando che in questa scatola, le cose non saranno distrutte o concentrate. E non c'è niente che sia come... diciamo, per cubi fatti di qualche materiale elastico, non c'è modo di gonfiare il volume o di... Quindi sto pensando a una sorta di elasticità per cui posso infilare più roba dentro, una sorta di induttore o condensatore equivalente, in questo mondo. No, è solo la porzione del volume. **Ciò che entra deve uscire.**

Questo è il motivo per cui sto, di nuovo, invocando Lavoisier con questa storia del “nulla si crea, nulla si distrugge”. In un Δt , di nuovo, Δx , e qui posso calcolare, esprimere quante particelle ci sono a un certo istante, $t + \Delta t$. È la concentrazione... lasciatemi fare per una specie ionica... la concentrazione (C) moltiplicata per il volume ($Vol = \Delta S \cdot \Delta x$). Se il volume è espresso in litri, quindi se la concentrazione è espressa in millimolare, devo stare attento che il volume che sto moltiplicando sia espresso in litri, ma niente di sbagliato in questo.

Quindi questa quantità di particelle al tempo $t + \Delta t$ deve essere uguale a quello che erano un momento prima, al tempo t , **più** quelle che sono entrate dalla porta **meno** le altre che sono uscite dalla porta.

$$C(t + \Delta t) \cdot \Delta S \cdot \Delta x = C(t) \cdot \Delta S \cdot \Delta x + J(x) \cdot \Delta S \cdot \Delta t - J(x + \Delta x) \cdot \Delta S \cdot \Delta t$$

Questo è semplice perché è unidimensionale, quindi per convenzione prendo come positivi i flussi, qui flussi generici, quando puntano nella stessa direzione di x . Ecco perché qui ho messo un più e qui ho messo un meno. Vedete, è a t , entrambi a t , che è il passo precedente, ma qui è a x , quindi all'ingresso, e qui è $x + \Delta x$, che è all'altra estremità.

Se fate la stessa cosa per un caso tridimensionale o anche bidimensionale, ovviamente dovete prendere in considerazione un piccolo cubo e sapete che potete avere afflusso (*influx*) e deflusso (*outflux*) da tutti i lati possibili. Qui è semplice, è monodimensionale. Entri ed esci.

Quindi, questo è tutto, fondamentalmente. Questo sta traducendo quella frase: “nulla si crea, nulla si distrugge”. Quindi significa che qualunque cosa misuro ora deve essere qualunque cosa fosse prima, più e meno le nuove particelle e le particelle che ho perso. E vi ricordo che qui moltiplico per Δt e ΔS perché il flusso stesso è per unità di tempo e per sezione trasversale di area.

Ho riscritto la stessa equazione lassù e vedete che ΔS può essere semplificato. Questo è indipendente dalla mia scelta della sezione trasversale. E ciò che rimane è il Δx sul lato sinistro e il Δt ... beh, Δx è... sì, il Δt sul lato destro.

Quindi posso dividere... posso moltiplicare e dividere entrambi i lati per Δx così come per Δt . O sposto Δx da sinistra al denominatore a destra, o Δt , lo sposto da destra al numeratore, lo metto nel denominatore sul lato sinistro.

$$\begin{aligned} \frac{C(t + \Delta t) - C(t)}{\Delta t} \cdot \Delta x &= -(J(x + \Delta x) - J(x)) \\ \frac{C(t + \Delta t) - C(t)}{\Delta t} &= -\frac{J(x + \Delta x) - J(x)}{\Delta x} \end{aligned}$$

E sapete, ora sono molto tentato di prendere il limite per Δt e Δx simultaneamente che vanno a zero, perché quelle quantità assomigliano esattamente a un rapporto differenziale. È la definizione di una derivata.

A sinistra, vedete che è sul tempo. È una funzione di x ... x va bene, qualunque cosa. Ma è una funzione di t , e t è calcolato in $t + \Delta t$ meno qualunque cosa fosse calcolato in t . E poi al denominatore, avete l'ammontare di questa variazione. A destra, avete la stessa cosa, a parte il meno. E la funzione è una funzione considerata dell'altra quantità. È il primo argomento, x , calcolato in $x + \Delta x$ meno la funzione calcolata in x . E nel denominatore, avete Δx .

Prendete il limite e ottenete la derivata parziale. Non potete usare il simbolo della derivata totale perché queste non sono derivate totali.

E ottenete quella che è chiamata **equazione di elettrodiffusione** che fondamentalmente collega i flussi e come cambiano nello spazio, a come la concentrazione sta cambiando nello spazio e nel tempo.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = - \frac{\partial J}{\partial x}$$

È un'equazione differenziale alle derivate parziali e in generale è molto difficile da risolvere. E potete inserire la deriva (*drift*) e la diffusione (*diffusion*) in quella parte [J], perché non avete altri flussi.

La storia di sommazione, o in altro possibile modo di combinarli, viene da questo, da quello che vi ho mostrato: il flusso di particelle che entrano ed escono. Okay, potrebbero entrare per diffusione e potrebbero uscire per diffusione, e potrebbero entrare per deriva (*drift*) e potrebbero uscire per deriva. Quindi è a questo livello che... se volete fare le cose... quindi qui è generico, ma dovrei continuare ad aggiungere e sottrarre tutti i modi possibili, i flussi possibili. In questo caso, è deriva e diffusione. Non c'è altro modo.

Quindi non c'è niente di più profondo in quella somma della conservazione della massa, che è descritta sul lato destro da questo bilancio di ciò che entra e ciò che esce.

Quindi potete, per esempio, riscoprire l'equazione di diffusione se prendete solo uno dei flussi. Quindi sto considerando che le particelle non siano cariche, quindi è solo un flusso. E forse l'avete vista. Quell'equazione è ciò che è chiamata l'equazione di diffusione. E quindi fondamentalmente questa equazione di elettrodiffusione è un caso più generale della, generalmente, equazione di diffusione. Può essere usata quando avete anche particelle cariche.

E sapete già che allo *steady state* avete una distribuzione costante. Quindi potete calcolare qui, potete dire: *steady state*, matematicamente, significa che le cose non stanno cambiando, non dipendono dal tempo perché sono costanti nel tempo. E quando fate la derivata rispetto al tempo, ottenete zero.

$$\frac{\partial C}{\partial t} = 0$$

Quindi finite per avere che la derivata seconda spaziale della concentrazione è zero ($\partial^2 C / \partial x^2 = 0$). Ciò significa che deve essere una funzione lineare. E poi avete le condizioni al contorno (*boundary condition*).

Solo per rendervi chiaro da dove vengono le cose e perché per il momento, e anche per il resto del corso, non mi sto avventurando nell'elettrodiffusione perché è difficile. Non so come risolverla. Potreste risolverla. Potete risolverla numericamente. E sospetto che in un corso che avrete nel secondo semestre quest'anno, dal professor Pierpaolo Palestri, potreste vedere questa equazione in termini di simulazioni numeriche di sistemi elettrochimici. E quelli di voi che hanno un background in semiconduttori, fisica dei semiconduttori in elettronica, fondamentalmente hanno visto qualcosa di molto simile per i portatori di carica in un semiconduttore. E le analogie con gli elettroliti e con le soluzioni acquose sono molte. Ma okay, dimentichiamoci di questo, non è cruciale.

Modelli Elettrici: Legge di Ohm e Canali Ionici Quindi qui la domanda è, okay, sembra che per un canale ionico... ho provato la settimana scorsa a dirvi che questa è una specie di descrizione corretta. È solo un resistore, solo un pezzo di metallo. O se volete, devono essere... alcuni ioni devono incontrare qualche attrito. Quindi la legge di Ohm... *falls through*... vale. Quindi la... V è uguale, la resistenza per la corrente. Quindi questa è la **legge di Ohm**.

$$V = R \cdot I$$

che, tra l'altro, posso anche riscrivere così, se mi permettete:

$$I = \frac{1}{R} \cdot V$$

E forse, se mi permettete, posso solo ridefinire questa quantità. Invece di essere una resistenza (R), potrei essere più a mio agio a parlare di **conduttanza** (G).

$$I = G \cdot V \quad \left(\text{dove } G = \frac{1}{R} \right)$$

E in effetti questo sarà... ma puramente perché non mi piace avere 1 diviso qualcosa. E anche perché se avete uno o due di questi pori e sono in parallelo, intuitivamente ha perfettamente senso che la conduttanza complessiva della membrana sia più alta rispetto al caso in cui avete un solo canale ionico.

Quegli esperti in teoria dei circuiti... ma lo rivedremo più tardi, forse alla fine di oggi o la prossima settimana... Ovviamente, quello che sto invocando è che avete un circuito con resistori in parallelo. La resistenza totale non è la somma. Ricordate che è $1/(1/R_1 + 1/R_2)$, se questo è R_1 e questo è R_2 . Quindi questo significa... ed è più intuitivo dire... G_{totale} (o $G_{equivalente}$) è $G_1 + G_2$.

Mi piacerebbe rimanere in questo mondo, ma è la stessa cosa, è assolutamente equivalente. La chiave, tuttavia, è che abbiamo visto che se la membrana è tale che si ha una distribuzione diseguale di ioni, di concentrazioni ioniche, allora c'è una sorta di batteria da mettere da qualche parte. Non so dove metterla, onestamente. La metto in parallelo? Perché in effetti, il potenziale di Nernst è in parallelo. Quindi metto queste cose, le attacco qui in parallelo.

Questo è rilevante perché potrebbe essere che con lo stesso linguaggio e strumenti e matematica e fisica dei circuiti elettrici, io possa finire per capire perché avete -70 millivolt. Che è, alla fine, quello che accadrà.

Quindi non è solo un resistore, è una combinazione di quelle due cose. E devo fare un passo contro questa ipotesi di equilibrio che ho fatto finora.

Oltre l'Equilibrio: L'Approssimazione Ohmica Quindi, in questo momento, sto ancora considerando una singola specie ionica. Sto considerando una membrana semipermeabile, ma **non sono all'equilibrio**. Quindi non metterò $J = 0$, e non dirò che uno è meno l'altro.

Quindi l'unica cosa che posso fare è guardare intensamente (*to pair intensely*) quell'equazione, che non è realmente "corrente uguale qualcosa", anche se $J...$

vi ho detto che potete convertire i flussi in densità di corrente moltiplicando per ZF , la valenza e la costante di Faraday.

$$J_{tot} = -uRT \frac{dC}{dx} - uCZF \frac{dV}{dx}$$

Quindi se dovessi moltiplicare, come farò tra un momento, ZF su entrambi i lati, avrete ZF lì e qui... okay, quindi è un gran casino, ma c'è il potenziale (V). Quindi non è troppo diverso da un resistore secondo la legge di Ohm. E in effetti, è qualcosa che ha una sorta di attrito. Ma per il momento, è troppo complicato da vedere. Non posso davvero scriverlo in un... non posso identificarlo e dire: "oh sì, qui, tutto questo è G ". No, non c'è linearità.

Quello che posso fare, posso iniziare a osservare, fare alcune ipotesi drammatiche e provare a "massaggiare" questa equazione.

Quindi la prima cosa che faccio è fattorizzare $u \cdot C \cdot ZF$.

$$J_{tot} = -uCZF \left(\frac{RT}{ZF} \frac{1}{C} \frac{dC}{dx} + \frac{dV}{dx} \right)$$

Quindi, se lo faccio, vedete che ottengo questo RT/ZF qui. Quindi qui non c'è nulla da capire. Ho solo... ho deciso di... se volete, dividere e moltiplicare il primo termine di questa somma per ZF ... in modo da... l'avevo al denominatore... perché vedete, non c'era ZF lì. Quindi ho dovuto moltiplicare e dividere affinché le cose rimanessero equivalenti. E poi ho... potevo fattorizzarlo perché ZF ora è al numeratore di entrambi i termini.

E voglio farlo perché voglio anche rimuovere la concentrazione C , perché vorrei rendere questo dV/dx "nudo". Non mi piace se c'è roba davanti. Anche se è puramente... beh, non sono numeri perché C è una funzione e potenzialmente è una funzione del punto. La concentrazione potrebbe cambiare nello spazio.

Dopo questa fattorizzazione, quello che posso fare è dividere entrambi i lati per $u \cdot C \cdot ZF$. Quindi, fondamentalmente, in altre parole, ho preso questa roba e l'ho portata al denominatore del lato sinistro. Ma dato che c'ero già, ho moltiplicato J per ZF . Devo moltiplicare e dividere, altrimenti non sono autorizzato a chiamarlo "uguale". Ma se lo faccio, okay, al denominatore otterrò $Z^2 F^2$. Per favore, provate a farlo una volta nella vostra vita per ricrearlo, perché all'esame potrei chiedervi di ri-derivare questa roba. Ed è solo... l'unica cosa che dovete... beh, dovete essere equipaggiati con l'algebra e dovete essere in grado di scrivere l'espressione di ciascun flusso. Ma per il resto non è niente, è solo una manipolazione, è solo una manipolazione tipografica.

$$\begin{aligned} -\frac{J_{tot} \cdot ZF}{uC(ZF)^2} &= \frac{RT}{ZF} \frac{1}{C} \frac{dC}{dx} + \frac{dV}{dx} \\ \frac{J_{tot}}{uCZF} &= -\frac{RT}{ZF} \frac{1}{C} \frac{dC}{dx} - \frac{dV}{dx} \end{aligned}$$

(Manipolazione per arrivare a...)

$$\frac{J \cdot ZF}{uC(ZF)^2} \approx \frac{J_{Ionica}}{uCZ^2F^2} = -\frac{RT}{ZF} \frac{d(\ln C)}{dx} - \frac{dV}{dx}$$

Faccio questo perché questo, $J \cdot ZF$, è una **densità di corrente** (I), ed è simile alla legge di Ohm... beh, almeno alla parte della legge di Ohm. Questo è qualcosa che non so esattamente. u è una mobilità, Z è una valenza, F è la costante di Faraday, e okay, C è la concentrazione.

E qui, di nuovo, mi ritrovo con una derivata, quindi differenziali perfetti. Quindi sono tentato di, di nuovo, **integrare entrambi i lati** attraverso la stessa membrana di prima.

$$\int_{x_{in}}^{x_{out}} \frac{I_{ionica}}{uCZ^2F^2} dx = \int_{x_{in}}^{x_{out}} \left(-\frac{RT}{ZF} \frac{d(\ln C)}{dx} - \frac{dV}{dx} \right) dx$$

E coglierete la mia arroganza in un momento, perché non vado così lontano. Sì, okay, sul lato destro è facile, perché quello è un differenziale perfetto. E tra l'altro, sembra, dopo questa manipolazione molto sciocca, molto stupida, sembra molto... almeno questa parte... assomiglia molto al potenziale di equilibrio di Nernst.

$$\begin{aligned} \int_{x_{in}}^{x_{out}} \dots &= -\frac{RT}{ZF} [\ln(C_{out}) - \ln(C_{in})] - [V_{out} - V_{in}] \\ \int_{x_{in}}^{x_{out}} \dots &= \frac{RT}{ZF} \ln \left(\frac{C_{out}}{C_{in}} \right) + (V_{in} - V_{out}) \\ \int_{x_{in}}^{x_{out}} \dots &= E_{Nernst} + \Delta V \end{aligned}$$

Ma **non siamo all'equilibrio**, e infatti, questo è solo un pezzo. Non è più $V = E_{Nernst}$.

E qui, di nuovo, ho due scelte. La prima che vi presento è chiamata, per ovvie ragioni, l'**approssimazione ohmica**. Ed è un'approssimazione. Anche l'altra sarà un'approssimazione, ma è un po' più elegante. È l'equazione di Goldman che vedremo più tardi.

Ma nell'approssimazione ohmica, fondamentalmente dico quanto segue: **all'interno della membrana, penso che il flusso (J) sarà costante**. Non dipenderà da dove ti trovi nella membrana. Lo immagino come... prendo un canale ionico, e in qualche modo sono uno ione che attraversa il canale ionico, e il flusso (che è di nuovo definito come numero di particelle o moli, millimoli, per secondo per quadrato... qualunque cosa, micrometro in quel caso, o qualunque cosa sia) sarà indipendente dalla posizione.

Se posso farlo, posso portarlo fuori [dall'integrale].

$$I_{ionica} \cdot \int_{x_{in}}^{x_{out}} \frac{1}{uCZ^2F^2} dx = E_{Nernst} + (V_{in} - V_{out})$$

Questa quantità $1/(uCZ^2F^2)$ è solo un numero, quindi è una costante, non dipende dallo spazio. L'unica cosa che rimane dipendente dallo spazio è la

concentrazione (C). Ma, okay, questo è un integrale definito, finito, quindi sarà un numero, okay? Quindi questo è un numero, questo è un numero.

Quindi è: corrente (okay, densità di corrente) moltiplicata per un numero, uguale a qualcosa. Corrente moltiplicata per qualcosa... okay, quindi, scusate, è come qui. La corrente moltiplicata per qualcosa è uguale a qualcosa che dimensionalmente è un potenziale elettrico.

Qui avete $V_{in} - V_{out}$ che viene da quel termine dV/dx . L'altro è esattamente il potenziale di equilibrio di Nernst. Solo la forma, l'espressione matematica... non è all'equilibrio. E infatti, qui non è zero. Se fosse zero, sarebbe equilibrio.

Quindi, qui, fondamentalmente avete: **Corrente** \times **Resistenza** = $\Delta V + E_{Nernst}$

Okay, anche se questa [Resistenza] è brutta e non so cosa significhi, sarà fissa. E qui avete il potenziale di Nernst con un meno... (*Riorganizzando i termini*)

$$I_{ionica} \cdot R_0 = (V_{in} - V_{out}) - (-E_{Nernst})$$

(Assumendo $V_{out} = 0$ e $V_{in} = V$)

$$I_{ionica} \cdot R_0 = V - E_{Nernst}$$

E questo è, se volete, il V_{out} , il potenziale elettrostatico esterno, lo chiamate riferimento. Lo chiamate zero. Quindi è il potenziale intracellulare (V) meno il potenziale di inversione (E_{Nernst}) uguale alla densità di corrente (I) moltiplicata per qualcosa che assomiglia a una resistenza (R_0).

Quindi questo è veramente un sistema "fatto in casa" (*home-made*), perché sto solo assumendo che vada così. E quindi questa quantità, su cui non cercherò nemmeno di elaborare di più perché dipende dalla concentrazione... Quindi non è come in un metallo, in un conduttore, dove sapete che la resistenza dipende dalla resistività (ρ), è proporzionale a... quindi moltiplicata per la lunghezza (L) e divisa per la sezione trasversale (A). Qui è una specie di strano animale che dipende da qualche parametro strutturale del portatore di carica e anche dalla concentrazione.

Ma non sto affermando di capirlo. Sto fondamentalmente dicendo: I (densità di corrente) moltiplicata per la resistenza (R_0) è uguale a questa differenza ($V - E_{Nernst}$).

Circuito Equivalente: Serie, non Parallelo Vi suona un campanello? Se vi ho detto che il problema iniziale era che avevo un resistore per il canale ionico e avevo una batteria... lasciatemi descrivere la batteria come un simbolo di un generatore di tensione ideale, o se volete con il segno della batteria che dimentico sempre quale è più e quale è meno...

Quindi potete provare, con le leggi di Kirchhoff, a vedere cosa succede se avete il resistore in **parallelo** con la membrana... con il generatore di tensione, o in **serie**.

[Immagine di circuito in serie: $V(in) \rightarrow R \rightarrow E \rightarrow V(out)$] [Immagine di circuito in parallelo: $V(in) \rightarrow R \parallel E \rightarrow V(out)$]

Questo sarà V , questo sarà V , e questa sarà la densità di corrente I .

Posso dirvi che questo [il parallelo] è sbagliato. E lo vedete immediatamente, perché qui sembra che la caduta di tensione, o la tensione attraverso questo canale ionico, sarà il potenziale di equilibrio di Nernst (E), il che potrebbe non essere il caso. Non è necessariamente quello che registriamo.

Questo [la serie], d'altra parte, sembra essere... per la legge delle tensioni di Kirchhoff... che dice, poiché il campo elettrico è un campo conservativo, il lavoro fatto dal campo non dipende dal percorso, dipende solo dal punto iniziale e finale. Quindi qui significa che devo descrivere tutti i...

Quindi questo sarà, chiamiamolo E (il potenziale di Nernst). E qui ho la caduta di potenziale attraverso questo resistore. Chiamiamo questo resistore R_0 . Questo è $R_0 \cdot I$, perché la corrente I è ciò che è dato e, in effetti, è ciò che attraversa il resistore. Quindi prendo questa direzione e scriverei: $E + R_0 \cdot I = V$... Scusate.

(Applica la LKT alla maglia)

$$-V + E + (R_0 \cdot I) = 0$$

$$V = E + R_0 \cdot I$$

$$V - E = R_0 \cdot I$$

E potete vedere molto chiaramente che se spostate questa quantità... [errore nel parlato, l'equazione derivata $V - E = R_0 \cdot I$ corrisponde già a $I \cdot R_0 = V - E_{Nernst}$] ...avete quell'equazione.

Quindi il modello, la descrizione di un canale ionico, è **questa qui**, dove avete un **resistore in serie con una batteria**. Non il parallelo.

Potete provare a vedere se... beh, in questo caso [parallelo], l'equazione sarebbe semplicemente $V = E$, che non è quello che vi aspettate. Non è quello che è scritto qui. Qui avete che V meno il potenziale di Nernst è la corrente [per R].

Potenziale di Inversione (Reversal Potential) Dico solo l'ultima cosa, e poi ci fermiamo per 10 minuti. Questo [potenziale di] Nernst è anche chiamato **potenziale di inversione** (*reversal potential*) perché se il potenziale intracellulare (V) è più grande o più piccolo del potenziale di Nernst (E), il **segno della corrente (I) si inverte**.

Ok, allora. Questo è il circuito equivalente della membrana attraverso un canale ionico. E ho cercato di farvi vedere, per chi di voi non è così fluente con l'elettrotecnica banale (che dovrebbe essere nel curriculum di molti di voi), perché automaticamente... perché automaticamente ha a che fare, richiama, la **serie** fra un resistore e un generatore di tensione, e non il parallelo.

Ho spiegato ai vostri colleghi poco fa che questa era un'altra possibilità teorica di come io, sapendo che da qualche parte c'è una batteria e sapendo che da qualche parte c'è un resistore, prima di arrivare qui... dove qui è un'equazione in cui la leggo e dico qual è il circuito equivalente... avrei potuto combinarli anche in modo parallelo.

L'ho detto prima dell'interruzione: il potenziale di Nernst viene chiamato non soltanto potenziale di equilibrio. Vi faccio presente e sottolineo che in questo caso **non si tratta di condizioni di equilibrio**. Infatti, c'è una corrente che prima era stata assunta essere zero (che è una densità di corrente). Si chiama anche **potenziale di inversione** perché vedete che se V_{in} (il potenziale intracellulare) è maggiore o minore del potenziale di Nernst, la corrente cambia segno.

$$I = \frac{1}{R_0}(V_{in} - E_{Nernst})$$

In modo ancora più banale, se non doveste vederlo, potete scrivere l'equazione, rappresentare in modo grafico l'equazione in forma grafica. È un'equazione di una retta. Per cui vi rammento, R_0 era una costante, E_{Nernst} pure è una costante nota. E nel piano corrente-tensione, o che lo scriviate come $I \cdot R = V$ oppure $I = G \cdot V$ (che è la forma che adotteremo, è semplicemente una convenzione), abbiamo che è una retta.

Come faccio a sapere che è orientata in questo modo? Io mi ricordo che quando... mi ricordo dal liceo, $y = m \cdot x$, quando m era positiva nel piano yx la retta era in quella direzione, era un coefficiente angolare positivo. In questo caso c'è un termine noto. Il termine noto non l'ho mai intuitivamente apprezzato se non quando mettevo la x a 0, cioè quando il valore della coordinata indipendente, coordinata orizzontale, fosse 0, e allora quell'intersezione con gli assi era... i .

In questo caso vedete che io ottengo $I = 0$ (quindi è l'altra intersezione, con l'asse orizzontale, non con l'asse verticale) quando il secondo membro si annulla. Quando V_{in} diventa uguale a E_{Nernst} , perché è l'unico modo, è l'unico valore che annulla, essendo V la quantità incognita (gli altri ho detto sono parametri, numeri), è l'unico grado di libertà. $V_{in} = E_{Nernst} \implies I = 0$.

Quindi qui vedete che a questa intersezione ($V = E_{Nernst}$), la corrente prima è positiva (o negativa, a seconda della convenzione) e dopo è negativa (o positiva). Quindi viene anche chiamato **potenziale di inversione**.

Il fatto che io utilizzi il termine G o R è semplicemente che, quale che sia il valore numerico, io definisco uno o l'altro come 1 diviso l'altro.

La Legge di Kirchhoff e la Combinazione delle Correnti Visto che dobbiamo a un certo punto invocare la legge della conservazione della corrente (ho parlato di Kirchhoff ai vostri colleghi), in cui dato un qualche circuito, avendo un nodo, voi sapete che posso identificare quello che viene chiamato un "co-ciclo", oppure una superficie chiusa che non intersechi la struttura dei singoli componenti. In questo caso, la somma algebrica delle correnti entranti e uscenti (vuol dire che devo stabilire una regola di chi entra, chi esce, se è positivo o se è negativo) è nulla, è zero. Vuol dire: **la carica non si distrugge**.

Allora, visto che avrò la corrente per il **sodio (Na)**, in cui avrò G_0 che è G_{Na} (perché sono canali che sono permeabili al sodio), e avrò E_{Nernst} del sodio (che era 56 millivolt, quello che era). Poi avrò un'altra corrente che sarà per il **cloro (Cl)**, in cui avrò G che è del cloro (perché i canali sono altri canali, sono selettivi al passaggio di alcune specie ioniche, non a tutte), e avrò il potenziale

di inversione del cloro. E poi avrò la stessa cosa per il **potassio (K)**, per il **calcio (Ca²⁺)**. Avrò tante correnti.

E vorrei a un certo punto, come in questo caso in cui... ok, è sbagliato farlo in questo circuito... ma nella membrana, avendo questo tipo di correnti attraverso la membrana, potrei dire che la membrana stessa si comporta come un cociclo e quindi che in qualche modo mi rappresenta la condizione: **somma delle correnti = 0**. Che è esattamente quello che faremo.

Per questo preferisco quella descrizione con la conduttanza (G), però è solamente un fatto di forma. È la legge di Ohm, che Ohm è quel signore nel riquadro. Quindi G_0 , per esempio, è $1/R_0$.

Mi sapete dire le unità di misura di... se questo $[R]$ è **Ohm (Ω)**, in onore di quel tizio, G (le conduttanze) come si misurano? [Risposta implicita: Siemens (S)].

Limiti dell'Approssimazione Ohmica e Rettificazione Ci sono in realtà delle alternative, e ve ne presento una, perché l'approssimazione Ohmica non funziona tanto bene quando, in casi estremi... (questa è una descrizione matematica che ha un accordo perfetto o molto molto buono con l'esperimento)... quando il rapporto delle concentrazioni è molto estremo, molto piccolo oppure molto grande.

Nel caso del calcio, vi ho fatto presente che la concentrazione intracellulare è praticamente 0 (10^{-2} millimolare), mentre fuori è dell'ordine di 10-20 millimolare, 5 millimolare... Nella corteccia, nel *medium* extracellulare dei neuroni corticali, è comunque di diversi millimoli, al contrario dell'intracellulare che è praticamente assente.

In quel caso, la relazione fra densità di corrente e potenziale **non è lineare**. Vedete che ha una forte **rettificazione**. Ogni traccia rappresenta un caso in cui il rapporto delle concentrazioni è indicato da questi *small numbers*: è 1000 volte uno e 1000 volte l'altro, oppure addirittura è 0.5 volte, 0.2 volte, 0.1 volte.

Vedete che non è una linea, ha un comportamento di rettificazione. Ma non evokerò alcun diodo, che in elettronica viene usato come termine di rettificazione. Vorrei capire se dal punto di vista biofisico riesco ad ottenere una descrizione più accurata, perché alla fine delle fini, se devo trovare un bilanciamento della corrente per arrivare a questo benedetto -70 millivolt... non vedo se la batteria è... *scala*.

Voglio avere un'espressione che mi possa descrivere: corrente = qualcosa.

L'Equazione di Goldman (GHK) Vi faccio vedere come si deriva, è molto importante per il suo uso in elettrofisiologia, in elettrofisiologia cellulare, in particolare in neuroscienze. Si chiama **equazione di Goldman** (o GHK: Goldman-Hodgkin-Katz) e ha una forma che è diversa, vedete che non è ohmica.

Il flusso (J), o la densità di corrente (I), ha una dipendenza dal potenziale (in questo caso ho solo scritto V_{in} , se volete scrivere $V_{in} - V_{out}$ dovete mettere anche qua, ma qui in questo caso $[V_{out}]$ è stato preso convenzionalmente come zero).

$$J = P \cdot A \cdot V_{in} \frac{C_{out} - C_{in} \cdot e^{A \cdot V_{in}}}{1 - e^{A \cdot V_{in}}}$$

$V_{in} - V_{out}$ qui è $V_{in} - V_{out} \dots$ quindi è parente vagamente [della legge di Ohm], ma non è una relazione lineare.

Perdona, io avevo questo un tempo... Ok.

È parente, nel senso che contiene le concentrazioni all'esterno (C_{out}) e all'interno (C_{in}) della cellula. Questo A è parente, se non mi ricordo male, adesso lo vediamo, dovrebbe essere l'inverso, ZF/RT . Comunque è un numero.

Quindi le dipendenze sono diverse, ma le quantità sono le stesse. Quindi funzionalmente questa descrizione è più accurata perché cattura questa rettificazione. Non la posso più rappresentare con degli equivalenti circuitali.

Come ha fatto Goldman a raggiungere questa nuova approssimazione? È un pelino meglio, come potete vedere, di quella ohmica. Che è sempre la rappresentazione ohmica... l'approssimazione ohmica è l'espansione in serie di Taylor arrestata al primo ordine, quindi sono parenti.

Infatti una cosa che vi chiedo è quella di provare, data questa funzione matematica di una variabile indipendente V , di scrivere Taylor. Spero che non sia una cosa drammatica, la possiamo poi eventualmente fare assieme. Troverete esattamente la stessa espressione ohmica che abbiamo derivato in un altro modo.

Quindi: non linearità, rettificazione, e permette di estendere il comportamento anche dove l'approssimazione ohmica non vale più (l'approssimazione ohmica essendo l'espansione in serie di Taylor). In particolare per il calcio non possiamo usare la formula ohmica, eppure... in teoria per capire come funzionano le cose.

Quindi $A = ZF/RT$, che è l'inverso di RT/ZF , che quindi è $1/(25 - 26 \text{ mV})$ a temperatura ambiente per $Z = 1$, per la valenza unitaria.

E P , anche P era importante, è un parametro chiamato **permeabilità**, che è parente della mobilità (u), chiaramente della temperatura (T), e in qualche modo ha una dipendenza dalla geometria della membrana (Δx , lo spessore).

$$P = \frac{u \cdot RT}{\Delta x}$$

E torna: se la membrana è molto piccola [sottile], la permeabilità è molto grande. La permeabilità della membrana a un certo ione non è più solamente un termine generico... *conversativo*, ma è una quantità misurabile. Se la temperatura è elevata, immaginate che ovviamente dal punto di vista diffusivo sia facile per uno ione magari attraversare la stessa membrana. E ovviamente deve dipendere linearmente, o comunque direttamente, dalla mobilità di quell'ione.

Però, vedete, ha una forma un po' più complicata, quindi non è una conduttanza elettrica in senso lato. Le conduttanze non dipendono dalla temperatura e dai parametri lineari in questo modo, dai parametri geometrici e dai parametri strutturali in questo modo. Questa è specifica per gli ioni ai capi di una membrana. E vedrete perché, quali sono le ipotesi che Goldman ha fatto.

Quindi il possibile esercizio è: provate a linearizzare (o che è la stessa cosa, a scrivere l'espansione in serie di Taylor al primo ordine) di questa espressione. Dovete calcolarla attorno al potenziale di inversione, al potenziale di Nernst. E qui non figura il potenziale di Nernst, quindi lo dovete mettere voi: $E_{Nernst} = (RT/ZF) \ln(C_{out}/C_{in})$. È un numero, però in qualche modo se lo fate vedrete che le quantità R, T, Z, F , etc. si cancellano con... *varie*... come P e A sono definite.

L'unica cosa che richiede attenzione, di lavorare per un paio di minuti senza fare errori, è calcolare la **derivata prima rispetto a V** di questa funzione, che è il prodotto tra V e quest'altro pezzo, che è un rapporto. Voi sapete come si fa la derivata di un prodotto o la derivata di un rapporto. E poi c'è il solito termine esponenziale e sapete come si deriva.

Derivazione dell'Equazione di Goldman Come ha fatto questo Goldman a derivare questa equazione? È partito esattamente da dove siamo partiti noi, quindi la definizione di flussi: *drift* (deriva) e diffusione. I due termini. Non c'è alcuna ipotesi di equilibrio e adesso non faccio neppure l'ipotesi di approssimazione ohmica.

$$J = -uRT \frac{dC}{dx} - uCZF \frac{dV}{dx}$$

Per facilità chiamo A questo ZF/RT (o RT/ZF ? [Controlla] $A = ZF/RT$). E questo è il pezzo che vi darà più fastidio: definisco io arbitrariamente questa funzione $H(x)$. Voi dite: "Come ha fatto?" È perché questo era un genio che ha visto un modo per semplificare questa espressione, perché alla fine queste derivate, questi esponenziali... alla fine dicono più o meno la stessa cosa a un matematico che ha l'occhio fine.

Quindi, supponete di staccare il cervello per un attimo e dire: ok, questa è una nuova funzione che non ha alcuna relazione con la biofisica, la definisco io così:

$$H(x) = uRT \cdot C(x) \cdot e^{A \cdot V(x)}$$

Nota: sto pensando che V possa essere una funzione del punto dentro la membrana, in teoria.

Ricordo, magari me lo dite voi, che se uno ha un condensatore a facce piane parallele, quindi non tanto teoria dei circuiti ma elettromagnetismo, sa che qui dentro, per questo particolare accorgimento, per questa particolare geometria, il campo elettrico (E) qui dentro, quindi nel dielettrico (nella membrana), com'è? Com'è il campo elettrico? **Costante**.

È una cosa molto importante. Se il campo elettrico è costante, il potenziale vuol dire che varia **linearmente**. E non ci vuole una particolare scienza, perché se qui supponete siete a massa, questo è 0 millivolt, e qui siete, che ne so, il condensatore carico, vedete che ha 5 volt... da 0 a 5 qualcosa deve succedere all'interno del dielettrico. Avete tante ipotesi: potrebbe essere una discontinuità di prima specie, potrebbe essere un profilo sinusoidale... Quello che nell'ipotesi, e poi nel caso specifico di un condensatore a facce piane parallele infinito, è ovviamente

un potenziale che rispecchia il campo elettrico costante. Il campo elettrico costante è il gradiente del potenziale ($E = -dV/dx$). Per avere un campo elettrico costante (una costante), dovete avere qualcosa che... *viene* costante. Vuol dire che il gradiente deve essere di una quantità che varia linearmente con x , così quando fate la derivata non avete più la dipendenza da x , avete una cosa costante. Però lo vediamo.

Data questa quantità $H(x)$, provo a vedere che succede se faccio la **derivata rispetto a x** (dH/dx). Perché vedete che facendo la derivata rispetto a x ci somiglia parecchio a questo flusso (J).

Questa cosa qua [il flusso J] viene dalla biofisica. Qui è puramente matematico che, scrivendo le cose così, una funzione che è sia della concentrazione (C) sia del potenziale (V), a un certo punto facendo la derivata... per esempio, a un certo punto qui sarà la derivata di un prodotto. Adesso lo guardiamo assieme. Anzi, guardiamolo subito assieme.

uRT è una costante. La derivata di una costante per qualcosa è la costante (la linearità), la costante che moltiplica la derivata di quel qualcosa. Il “qualcosa” è un prodotto fra funzioni ($C \cdot e^{AV}$). La derivata di un prodotto, vi ricordate, è: (derivata del primo) \times (secondo) + (derivata del secondo) \times (primo), se l’ho detta giusta.

$$\frac{dH}{dx} = uRT \left[\frac{dC}{dx} \cdot e^{AV} + C \cdot \frac{d(e^{AV})}{dx} \right]$$

Quindi qui avete che ho fatto la derivata del primo, dC/dx . Non lo so qual è C , qual è la forma, quindi lo lascio indicato nel caso generico, perché C può avere un profilo di concentrazione arbitrario. C può essere... anziché imporre una diversa distribuzione di concentrazioni dentro o fuori, potrei imporre una tensione dall’esterno con una batteria e lì avrei una ridistribuzione di carica e un cambiamento delle concentrazioni. Quindi in teoria vorrei avere come prima qualcosa che sia autoconsistente. Io a mio piacimento dico: “adesso l’incognita è una”, “adesso l’incognita è l’altra”.

L’altro pezzo è la (derivata del secondo) \times (primo). Quindi il primo era C , per la derivata di questa funzione composta ($e^{AV(x)}$), che però è l’esponenziale... è simpatico perché resta la stessa derivata, a parte fare la derivata dell’argomento ($A \cdot V(x)$). E quindi c’è una A che è rimasta qui, questo è l’esponenziale che è sopravvissuto, e poi c’è la derivata di questo pezzo, dV/dx .

$$\frac{dH}{dx} = uRT \left[\frac{dC}{dx} \cdot e^{AV} + C \cdot e^{AV} \cdot A \cdot \frac{dV}{dx} \right]$$

Vedete che dV/dx c’era anche qui [nel flusso J]. Qui c’è una derivata... ok, qui è la derivata del logaritmo... qui c’è una derivata... insomma, non è troppo diverso.

E lo posso anche provare a riscrivere in questo modo, fattorizzando questa... *concentrazione*... questo termine qui (e^{AV}). Oppure, se siete pignoli, vuol dire che ho moltiplicato e diviso questa quantità (dC/dx) per C . Lo posso fare perché la quantità $[C]$ è non nulla e mi permette di portare fuori la C , questa C ,

che adesso premoltiplica sia questo che questo termine. Però, ovviamente, qui la pago: è $1/C$.

$$\frac{dH}{dx} = uRT \cdot C \cdot e^{AV} \left[\frac{1}{C} \frac{dC}{dx} + A \cdot \frac{dV}{dx} \right]$$

$1/C$ per la derivata di C ... forse vi ricorda che forse si può scrivere come la **derivata del logaritmo** ($\frac{d(\ln C)}{dx}$). La derivata del logaritmo è esattamente... *quanto vogliamo qui*. Quindi questo Goldman è stato molto lungimirante, perché vi faccio vedere che fra poco abbiamo praticamente l'espressione del flusso.

$$\frac{dH}{dx} = uRT \cdot C \cdot e^{AV} \left[\frac{d(\ln C)}{dx} + A \cdot \frac{dV}{dx} \right]$$

Non vuol dire niente per il momento, è una similitudine, ma “massaggiando” e lavorando su quest'altra equazione differenziale, posso ottenere più facilmente, molto facilmente, una nuova espressione che mi metta in relazione il flusso (J), la concentrazione (C) e il potenziale (V).

Faccio ancora un... quindi qui non è cambiato nulla, scusate... ho fattorizzato anche l'esponenziale e^{AV} . E quindi qui ho la derivata del logaritmo e qui ho la derivata di V .

A parte questo uRT ... e ZF ... perché A è ZF/RT . Quindi qui forse non vi darà troppo fastidio se io di nuovo multiplico e divido per RT e poi lo fattorizzo, in modo tale che qui al denominatore ho di nuovo RT . Quindi quel termine (A), a parte che si chiama A , di $1/(26 \text{ mV})$, lo riscopro, ma diventa una similitudine con la parte fra parentesi notevole.

(Ricordando l'espressione del flusso J e $A = ZF/RT$)

$$J = -uRT \frac{dC}{dx} - uCZF \frac{dV}{dx}$$

$$J = -uRT \left(\frac{dC}{dx} + C \frac{ZF}{RT} \frac{dV}{dx} \right)$$

$$J = -uRT \left(\frac{dC}{dx} + C \cdot A \cdot \frac{dV}{dx} \right)$$

(Confrontando con dH/dx)

$$\frac{dH}{dx} = uRT \cdot e^{AV} \left[\frac{dC}{dx} + C \cdot A \cdot \frac{dV}{dx} \right]$$

(O c'è un errore nella trascrizione originale o nella derivazione parlata, perché $d(\ln C)/dx$ non porta direttamente a dC/dx . Assumendo che la fattorizzazione corretta fosse $uRT \cdot e^{AV}$ dall'espressione precedente...)

$$\frac{dH}{dx} = e^{AV} \left[uRT \frac{dC}{dx} + uRT \cdot C \cdot A \cdot \frac{dV}{dx} \right]$$

$$\frac{dH}{dx} = e^{AV} \left[uRT \frac{dC}{dx} + uRT \cdot C \cdot \frac{ZF}{RT} \cdot \frac{dV}{dx} \right]$$

$$\frac{dH}{dx} = e^{AV} \left[uRT \frac{dC}{dx} + uCZF \frac{dV}{dx} \right]$$

$$\frac{dH}{dx} = -e^{AV} \cdot J$$

Ed è qui, è rappresentata qui. *[La trascrizione sembra saltare dei passaggi algebrici, ma arriva alla relazione cruciale].*

Qui c'è la concentrazione... qui c'è anche la concentrazione. Se lo fate una volta carta e penna lo vedrete.

Quindi posso anche scrivere, vedete quanto è simile e quanto è geniale, che la derivata di questa funzione “del piffero” ($H(x)$) — che io onestamente non l'avrei vista, non avrei saputo — è praticamente il flusso (J), a parte il segno e il prodotto per questo esponenziale.

$$\frac{dH}{dx} = -J \cdot e^{A \cdot V(x)}$$

La domanda è: ma se io applico l'integrale da ambo i membri, qui e qui, non è che me la cavo? E la risposta è sì, me la cavo meglio.

Ho riscritto la quantità là sopra. Applico l'integrale ai capi della membrana (x_{in} a x_{out}). Questo $[dH/dx]$ è un differenziale perfetto. Questo [lato destro], devo fare delle ipotesi.

$$\int_{x_{in}}^{x_{out}} \frac{dH}{dx} dx = \int_{x_{in}}^{x_{out}} -J \cdot e^{A \cdot V(x)} dx$$

$$H(x_{out}) - H(x_{in}) = -J \int_{x_{in}}^{x_{out}} e^{A \cdot V(x)} dx$$

Le ipotesi sono: 1. Come prima, che il **flusso (J) non dipenda dal punto** dentro un canale. Di nuovo, questa non è un'approssimazione troppo irrealistica perché penso che il canale ionico non abbia una “pancia” che si deforma... come se uno ha il *beer belly* per cui la birra a un certo punto si accumula e poi... un paragone che non è elegante, come d'altronde leccare il proprio sudore non era elegante in primo luogo. Però, quindi, immaginando che è una proteina che crea uno spazietto attraverso la membrana nel doppio strato fosfolipidico e permette agli ioni di passare, penso (come alcune simulazioni di dinamica molecolare hanno rivelato) è più simile a una specie di contagocce, dove le singole gocce sono gli ioni. Quindi il flusso non può cambiare granché, c'è una specie di conservazione, in punti diversi il flusso è lo stesso, non c'è un accumulo, non c'è una specie di “tasca” (ecco la parola) che permette l'accumulo di ioni. 2. Resto con un integrale di una quantità $e^{A \cdot V(x)}$. A è un numero, è $1/(26 \text{ mV})$. E qui l'unica cosa che posso fare, visto che il dominio di integrazione è all'interno della membrana (da qui a qui), è quello di dire: se è veramente un condensatore a facce piane parallele, allora il **potenziale (V) rappresentato come un cambiamento lineare** è un'approssimazione perfetta.

Le cose non stanno esattamente così, perché la membrana non è solamente un doppio strato lipidico, c'è un sacco di altre molecole dentro, cariche (perché voi

sapete che le macromolecole biologiche, dipende dal pH qual è la loro carica), quindi non è così sempre, non è detto che il potenziale dipenda linearmente dalla coordinata *verticale*. E un'altra ragione per cui questo potrebbe non essere vero è perché i canali ionici non sono dei tubicini, non sono dei pori, sono dei complicati *arrangement*, quindi complicate disposizioni tridimensionali di amminoacidi che hanno una distribuzione di carica, quindi non sono neutri. Hanno alcuni punti del canale ionico che sono carichi. Ed è proprio quello il motivo per cui hanno, per esempio, una selettività, per cui fanno passare uno ione potassio anziché uno ione sodio. Quindi non è esattamente un dielettrico, perché ci sono delle cariche libere dentro. Comunque, questo è semplicemente per darvi elementi di biofisica.

Se mi sta bene che J non dipenda dal punto (che va bene) e che il campo elettrico sia costante (quindi V cambi linearmente), quindi sia una quantità... adesso l'ho scritta così ($V(x) = M \cdot x + P$), però spero che voi possiate aiutarmi a scrivere M e P in funzione di quelli che sono i valori all'estremità del condensatore. In un caso è 0 (o V_{out}), l'altro caso è V_{in} . Sto invocando quello che avrete visto: è l'equazione di una retta che passa per due punti. Scusate, no, ecco... c'è la retta che passa per un punto, dove il punto lo specifico con le coordinate. Non me lo ricordo, adesso lo vediamo.

Ok, ho scritto qui l'espressione lineare, così che chi di voi sia particolarmente insospettito dall'integrale di una quantità che dipende da una funzione, possa vedere che qui è l'esponenziale di una somma, che è il prodotto degli esponenziali.

$$e^{A \cdot V(x)} = e^{A \cdot (M \cdot x + P)} = e^{A \cdot M \cdot x} \cdot e^{A \cdot P}$$

Quindi il primo termine è $e^{A \cdot M \cdot x}$, che è il solito esponenziale *boring* di cui io so tutto e so fare l'integrale, perché l'ho spogliato di qualunque complessità. Questo esponenziale moltiplica un altro esponenziale che è $e^{A \cdot P}$, però è un numero, non c'è più x , non c'è più la variabile di integrazione.

Quindi la primitiva dell'argomento di questo integrale è molto facile:

$$\int e^{A \cdot M \cdot x} \cdot e^{A \cdot P} dx = e^{A \cdot P} \cdot \frac{1}{A \cdot M} e^{A \cdot M \cdot x} = \frac{1}{A \cdot M} e^{A \cdot (M \cdot x + P)}$$

E per il teorema fondamentale del calcolo integrale, lo calcolo in x_{out} meno lo calcolo in x_{in} . Ho fatto la stessa cosa a sinistra, ma lì era un differenziale perfetto ($H(x_{out}) - H(x_{in})$).

Quello che ho dovuto fare era ricordarmi che, sì, a parte dividere per $A \cdot M$, quando fate la derivata per tornare indietro per verificare che quella sia la funzione primitiva, si cancelli. Perché se io faccio la derivata di $e^{A \cdot M \cdot x + P}$, qui mi viene fuori $A \cdot M$ come prodotto, quindi lo devo cancellare. Comunque, se provate a farlo, lo vedrete.

E, quindi, perché sto dicendo "se l'espressione della retta che passa per due punti"? Dicendo che questo è x , qui ho x_{in} , qui ho x_{out} , qui è V_{out} ... ok sì, sono due punti, perché sono rimbambito. E quindi qui è (x_{in}, V_{in}) e qui è (x_{out}, V_{out}) .

Se non ve la ricordate, potete pensare che debba essere qualcosa che agli estremi... quindi muovendo una delle due variabili, che potete fare con la variabile

indipendente x per esempio, vi porta al valore della variabile dipendente. Quindi, tanto per intenderci:

$$V(x) = V_{in} + (V_{out} - V_{in}) \frac{x - x_{in}}{x_{out} - x_{in}}$$

Quando $x = x_{in}$, questo termine si cancella perché il numeratore è 0, quindi va a 0 tutto, e in effetti a $x = x_{in}$, $V = V_{in}$. Mentre quando $x = x_{out}$, questo termine diventa unitario perché c'è questo termine di normalizzazione al denominatore, sopravvive $(V_{out} - V_{in}) + V_{in}$ e quindi si cancella V_{in} , resta V_{out} . Oppure invocate o guardate l'espressione della retta che passa per due punti.

Quello è il coefficiente angolare ($M = (V_{out} - V_{in})/(x_{out} - x_{in})$). Lo posso sostituire e posso ottenere questa espressione, e ancora questa. Praticamente abbiamo finito. Posso rimaneggiare leggermente per identificare la famosa permeabilità P .

No, perdono, non ho finito. Adesso che ho qui la differenza di questa funzione apparentemente complicata, discesa dall'arcangelo Gabriele che l'ha data a Goldman per semplificarci la vita, posso calcolarla dove è indicato qui: in x_{out} , meno la stessa funzione calcolata in x_{in} .

$$H(x_{out}) - H(x_{in}) = uRT \cdot C_{out} \cdot e^{A \cdot V_{out}} - uRT \cdot C_{in} \cdot e^{A \cdot V_{in}}$$

Ed è facile, perché quando V lo calcolo in x_{in} o in x_{out} ottengo per definizione il potenziale agli estremi.

Qui non ho fatto nulla, è esattamente la stessa cosa.

$$uRT(C_{out}e^{AV_{out}} - C_{in}e^{AV_{in}}) = -J \left[\frac{1}{A \cdot M} e^{A \cdot V(x)} \right]_{x_{in}}^{x_{out}}$$

(Sostituendo M e $\Delta x = x_{out} - x_{in}$)

$$\dots = -J \frac{\Delta x}{A(V_{out} - V_{in})} (e^{AV_{out}} - e^{AV_{in}})$$

E posso rendere esplicito J dividendo ambo i membri per questa quantità [l'integrale calcolato].

$$J = -uRT \frac{A(V_{out} - V_{in})}{\Delta x} \frac{C_{out}e^{AV_{out}} - C_{in}e^{AV_{in}}}{e^{AV_{out}} - e^{AV_{in}}}$$

Qui vedete che questa differenza di esponenziali, che prima era qui al numeratore, adesso l'ho portata al denominatore dall'altro lato. Lo provate a fare per 10 minuti e dovrete vedere che è noioso, ma che inizia a contenere tutti gli elementi che c'erano nell'espressione di Goldman, che poi è questa.

Si può massaggiare ancora, fattorizzando $e^{A \cdot V_{out}}$ perché questa quantità la posso portare fuori. Ovviamente devo moltiplicare e dividere per $e^{A \cdot V_{out}}$, ma gli esponenziali quando si moltiplicano o dividono vuol dire fare delle operazioni di, rispettivamente, somma o differenza dei loro argomenti, dei loro esponenti.

Quindi potete arrivare a scrivere 1 meno... in quel caso era C_{out} meno... in cui l'esponenziale non ce l'avete da entrambe le parti, ce l'avete da una parte sola, e qui avete l'esponenziale della differenza, perché era il rapporto degli esponenziali avendo fatto questa fattorizzazione sia al numeratore che al denominatore.

(Assumendo $V_{out} = 0$, $V_{in} = V$ e $A = ZF/RT$)

$$J = -uRT \frac{A \cdot V}{\Delta x} \frac{C_{out} - C_{in}e^{AV}}{1 - e^{AV}}$$

(Definendo la Permeabilità $P = uRT/\Delta x$)

$$J = -P \cdot A \cdot V \frac{C_{out} - C_{in}e^{AV}}{1 - e^{AV}}$$

Questa è la versione più stringata possibile. Non è particolarmente più complicata. Adesso vi faccio vedere come si può per esempio plottare, vi faccio vedere l'esempio di un *notebook* che avete sul repository di GitHub, e in teoria potreste giocare, potreste esplorare quanto si discosta dall'approssimazione lineare... pardon, ohmica.

E qui ora per il momento potete verificare che $uRT/(x_{out} - x_{in})$ conviene descriverlo a parte come **permeabilità** (P). Questo è interessante perché diverse conduttanze ioniche avranno una diversa permeabilità, quindi alcuni canali ionici potrebbero avere una diversa propensione a far passare quella specie. Alcune sono semplici... non parlo solamente di selettività, ma anche di conduttanza. Magari le conduttanze sodio sono molto più grandi di quelle potassio. In teoria questo dà una chiave per misurare dal punto di vista biofisico.

Combinare Diversi Ioni: L'Equazione GHK Vi anticipo che, a parte menzionarvi l'uso di questa forma, di questa equazione di Goldman, preferisco usare l'**espressione ohmica** delle correnti (di come il flusso o la densità di corrente dipende dal potenziale), perché ho in testa Kirchhoff, la legge delle correnti. E a un certo punto vorrei mettere insieme questi ioni. Vi ho detto: -70 [mV] evidentemente esce dal mettere e combinare assieme, non in una media aritmetica ma in qualche modo, i contributi dovuti a ioni diversi. Con Kirchhoff, intuitivamente, mi dà una speranza che posso immaginare che valga la conservazione della carica.

Qui [con Goldman] posso tranquillamente farlo, ma mi troverò a fare una sommatoria, una somma di questi termini. Non mi è evidente come fattorizzare questi elementi, ma vedrete perché ho queste preferenze.

Ok, questo doveva apparire prima, ma questa è l'equazione di Goldman. Se io ve la dovessi chiedere all'orale, non vuol dire che io sto zitto; vi aiuto se avete delle incertezze e a fare i passi, che può essere che vi interrompa prima di arrivare fino in fondo. Quindi tecnicamente dovete solo partire, avere in mente le ipotesi e partire dalle definizioni del flusso. E ovviamente ricordarvi questa funzione $[H(x)]$, però uRT , oramai ne avete la nausea, avete la concentrazione e il potenziale. e^{AV} ricorda... ok, no, voi non... ok, niente. Quindi questo dovete ricordare, ma se non ve lo ricordate ve lo dico io all'esame. Quindi non temete troppo, al di là del fatto che vi ho già raccontato la prima lezione quale sia

la media e il voto tipico che ho dato ai vostri colleghi del primo anno. Non vi ammazzo all'orale, tanto per intenderci. Mi accorgo se avete un'ottima memoria fotografica e se state riproducendo perfettamente le slide o quello che ho scritto alla lavagna. Io vorrei che vi restasse qualcosa, vorrei che l'aveste capito. Qui è una macchinetta che mettete in modo puramente di derivate, ma in generale valuto meglio l'aspetto di comprensione e di derivazione piuttosto che l'aspetto mnemonico.

Questo non lo faccio, però vi invito a provarci. Si mostra che facendo la derivata [l'espansione di Taylor] trovate praticamente l'equazione, la formulazione ohmica. E vi esce fuori Nernst, esce fuori continuamente.

Il Potenziale di Membrana a Riposo (GHK) E adesso togliamo tutte le ipotesi, tutte le restrizioni che abbiamo fatto. Quindi: 1. Non considero l'equilibrio. 2. Considero (cosa che non ho fatto finora) **più specie ioniche simultaneamente**.

Quello che mi porterà è alla caratterizzazione, alla comprensione dell'esistenza del potenziale di membrana a riposo, con quella che si chiama l'equazione di **Goldman, Hodgkin e Katz (GHK)**.

Forse avete mai sentito parlare di Hodgkin e Huxley? Nella prima puntata vi ho raccontato chi erano e, nonostante fossero dei fisiologi, hanno un'equazione a loro intitolata.

Qui adotto, per varie specie ioniche (che per semplicità qui, per non scrivere Na, K, Ca, magnesio, cloro, sto usando un pedice k), dove k è 1, 2, 3... è un indice con cui chiamo le specie ioniche. E di nuovo, qui sto semplicemente scrivendo che, data una membrana, esistono dei flussi, delle densità di corrente per ciascuna specie ionica, di cui so tutto. In teoria l'avrei potuto scrivere con un'altra espressione, con quella di Goldman, e lo faccio dopo. Ma qui lo voglio fare soltanto con l'**equazione ohmica**.

$$I_k = G_k \cdot (V - E_k)$$

Ciascuno avrà la sua conduttanza (G_k), ciascuno avrà il suo potenziale di equilibrio o potenziale di inversione di Nernst (E_k). Chiamatelo come volete. Ho chiamato conduttanza l'inverso della resistenza. Chiamatelo come volete, è qualcosa che non solo c'è, ma si può facilmente misurare. Misurare vuol dire misurare in un esperimento con un amplificatore, con un amplificatore elettronico, un esperimento biologico.

E quindi sto pensando che la membrana sia caratterizzata da pori, ciascuno dei quali è in realtà una **serie** fra una batteria (un generatore di tensione ideale) e una resistenza.

Nota: queste resistenze, o questi generatori, sono ovviamente, al contrario del caso elettrico, permeabili a specie ioniche diverse. Mentre quando io lo scrivo così, il circuito elettrico, lì è un elettrone, può passare in qualunque ramo. Però questo va bene per derivare quello a cui siamo interessati: di capire perché c'è questo dannato **-70 millivolt** o come esce fuori.

In particolare, se questo cambia nel tempo, che cosa qui può cambiare così rapidamente nel tempo?

Quindi ho messo quei rami attraverso la membrana perché spero che intuitivamente anche voi vi immaginiate la superficie di un palloncino con questi pori. E questi pori in qualche modo sperimentano, per questo ramo interno (intracellulare), lo stesso potenziale intracellulare. Non ne abbiamo parlato particolarmente, ma il potenziale intracellulare, visto che non è un conduttore ideale... però comunque posso considerare il potenziale elettrico intracellulare come V_{in} , isopotenziale. Anzi, ne abbiamo parlato la settimana scorsa quando vi ho fatto vedere che facevo sparire le resistenze che erano all'interno e all'esterno, immaginando cioè che fosse più difficoltoso per uno ione diffondere o passare attraverso la membrana piuttosto che muoversi in un elettrolita (in un conduttore ideale), piuttosto che attraverso una membrana che di per sé è un isolante e ha delle strutture.

Quindi, a rigore, dovrei metterci anche il condensatore qua. Però il condensatore ce lo mettiamo fra poco. Però vorrei farvi notare che tutti questi [canali] stanno sperimentando lo stesso V_{in} e lo stesso V_{out} ai loro estremi. Però ognuno ha la sua conduttanza (G_k) e il suo potenziale di inversione (E_k).

Quindi il circuito a cui finalmente voglio applicare Kirchhoff ce l'ho. Il nodo in particolare, qui, a cui voglio applicare Kirchhoff ce l'ho, ed è questo nodo qui [il nodo intracellulare]. Dove io dico, oppure se non vi piace il nodo, semplicemente posso dire che la corrente... e poi è una conseguenza... la somma algebrica delle correnti è zero, o la carica (e vi ricordo che la corrente è carica nell'unità di tempo, quindi le due cose sono intercambiabili) si conserva.

Quindi, se io rappresento la corrente totale (I_{tot}), la posso scrivere come la sovrapposizione degli effetti. Ma non sto facendo ipotesi particolarmente strambe, sto trasferendo in termini matematici quello che è il **parallelo** di queste correnti. Vanno tutte in parallelo. I canali ionici, tutti quanti, sperimentano la stessa differenza di potenziale fra la loro "testa" e la loro "coda", fra la bocca extracellulare e la bocca intracellulare.

$$I_{tot} = \sum_k I_k = \sum_k G_k(V - E_k)$$

Quindi qui è la stessa V (V_{in} , V_{out} è zero). Però ognuno ha una conduttanza (una resistenza) diversa e una batteria in serie diversa.

Il Potenziale di Riposo come Media Pesata Però, se io a un certo punto vi dico: "Sono in una condizione di riposo" (se volete, di non-equilibrio termodinamico, in cui le singole correnti sono zero perché sono morte, e quindi non c'è più alcun passaggio né di sodio né di potassio), "ma la somma degli effetti, in media, statisticamente, il totale è zero"... Voi algebricamente dite: "Ok, sì, questo è Kirchhoff".

$$I_{tot} = \sum_k G_k(V - E_k) = 0$$

Questa corrente totale... a meno che non ci sia io con una pipetta, qui, a imporre una pipetta di vetro, a metterci dentro una corrente che decido io... se non c'è questa pipetta, se la pipetta legge solo, registra soltanto il potenziale, voi dite: "Ok, metti questa quantità a zero e andiamo a casa. Perché ci rompi le scatole da tre settimane su questa cosa del -70... due settimane forse?". Ed è esattamente quello che avviene.

Se lo faccio, posso prima, se volete per semplicità, fattorizzare V . E quindi vedete che è $G_1 \cdot V + G_2 \cdot V + G_3 \cdot V \dots$ a parte $G_1 \cdot E_1, G_2 \cdot E_2, G_3 \cdot E_3$.

$$0 = (G_1 \cdot V + G_2 \cdot V + \dots) - (G_1 \cdot E_1 + G_2 \cdot E_2 + \dots)$$

$$0 = V \cdot \sum_k G_k - \sum_k G_k E_k$$

Però sia G che E sono costanti, sono numeri. Uno è -80 millivolt, l'altro è -62, quello del sodio è +56 millivolt, quello del calcio era +120... sono numeri. E anche le conduttanze sono dei numeri.

Quello che è interessante è che questa parte qui $[V]$ premoltiplica la somma delle conduttanze ($\sum G_k$). E ok, torna con l'elettrotecnica, perché il parallelo delle resistenze... l'ho cancellato qui. Questo è un parallelo delle conduttanze, la conduttanza si somma. La resistenza è 1 diviso la somma degli 1 diviso... *degli inversi*... l'inverso è la somma degli inversi.

Quindi, fatto così, se io qui lo metto a zero (perché sto dicendo: ok, in condizioni di riposo, dove "riposo" vuol dire che il flusso netto è zero, quindi non i singoli flussi, che vorrebbe dire che sono morto, ma il totale è zero), voi mi dite: "Ok, porto questa quantità orribile $[\sum G_k E_k]$ al primo membro... scusate, al membro di sinistra, e divido ambo i membri per questo $G_1 + G_2 \dots$, per la sommatoria delle conduttanze".

$$V \cdot \sum_k G_k = \sum_k G_k E_k$$

$$V_{\text{rest}} = \frac{\sum_k G_k E_k}{\sum_k G_k}$$

Se lo faccio, scopro che il **potenziale di riposo** (V_{rest}) non è la media *algebrica*... non è la media *aritmetica* dei singoli componenti. È la **media pesata**.

E di nuovo, a posteriori, sembra un'ovvietà. Se ho diversi canali, diverse porte, però sono specifiche (quindi solamente tra di voi gli ioni sodio passano da un lato, gli ioni potassio passano da un lato)... in questo modo, avendo dei potenziali di inversione diversi (per il sodio è +56, per il potassio era -80, era negativo per la storia del logaritmo che è ancora lì), posso immaginare che dipenda se le porte sono aperte o sono chiuse.

Posso immaginare che il potenziale di riposo dipenda da quanto sono questi "pesi" (G_1 rispetto a G_2). Supponete che non ci siano gli altri: se G_1 è grandissimo e G_2 è 0, G_1 e G_1 si semplifica, V_{rest} diventerebbe uguale a E_1 . Mentre se per caso G_1 fosse invece piccolo (magari la porta è stata chiusa, oppure perché

la porta è molto stretta), V_{rest} sarebbe più pesato... è pesato di più da un altro potenziale di inversione, un altro potenziale di equilibrio.

Tutto questo per cercare di darvi una comprensione profonda e intuitiva di questa parte, in cui il risultato è molto semplice: è la media pesata, e le conduttanze giocano la parte principale.

E in effetti, se io questo a un certo punto... come faremo credo nelle prossime ore, iniziamo la parte sull'eccitabilità... Potrei dire: "Ma se io questo non lo vedo stare a -70? Se da un momento all'altro questo schizza a +20 millivolt e poi ritorna e va a -90 millivolt e poi ritorna a -70... Come caspita è possibile?"

È vero che per il momento non sto considerando i termini capacitivi. Gli elettronici fra di voi direbbero: "Sì, stai considerando solamente le cosiddette correnti di trasporto, in cui c'è fisicamente un trasporto da dentro a fuori. Non sto considerando le correnti di spostamento, che sono fenomeni elettrostatici per cui se io col mio carisma elettrico mi avvicino qua, sicuramente un sacco di gente viene attratto dall'altra parte della 'porta' del condensatore". Però li mettiamo fra poco.

L'Equazione GHK (Versione Permeabilità) Quello che storicamente è stato fatto — quindi questa equazione è quella che viene chiamata equazione di **Goldman-Hodgkin-Katz (GHK)**, con le conduttanze per ovvi motivi — si può fare con la formulazione di Goldman.

Perché (e adesso vedete come), se mi consentite la semplificazione che considero tutti correnti relativi a ioni con la **stessa valenza** (se le valenze sono diverse non viene così semplice l'espressione, la potete fare numericamente ma non viene così semplice), posso prendere questi flussi [dall'equazione di Goldman] e dire J_1 (che è del sodio) + J_2 (del potassio) + J_3 + J_4 ... tutti uguali a zero.

$$J_{\text{tot}} = \sum_k J_k = 0$$

Sicuramente non è immediato, vediamo cosa succede.

Quindi questi sono tutti i termini [dell'equazione di Goldman per ogni ione k], dove semplicemente ho messo un pedice k addove le cose sono diverse.

$$J_k = -P_k \cdot A \cdot V \frac{C_{\text{out},k} - C_{\text{in},k} e^{AV}}{1 - e^{AV}}$$

Sono diverse nella **permeabilità** (P_k), non certamente in V_{in} e V_{out} (perché come nell'altro caso, di nuovo, i canali sperimentano lo stesso V_{in} e V_{out}), e l'ho messo il pedice k (o 2 o 1, quello che è) alle **concentrazioni** ($C_{\text{out},k}$ e $C_{\text{in},k}$), perché quelle dipendono se sei sodio, se sei potassio (dentro c'è poco sodio, fuori c'è tanto sodio; se sei potassio è viceversa, dentro c'è tanto potassio e fuori c'è poco potassio).

Posso fattorizzare il termine comune $A \cdot V / (1 - e^{AV})$.

$$J_{tot} = -A \cdot V \frac{1}{1 - e^{AV}} \sum_k P_k (C_{out,k} - C_{in,k} e^{AV}) = 0$$

Già di default questo termine $[A \cdot V]$ e questo termine $[1 - e^{AV}]$ non dipendono dal pedice. E qui ottengo una cosa che è un pochino fastidiosa, perché ho la somma di questi binomi: $(P_k C_{out,k} - P_k C_{in,k} \cdot e^{AV})$. L'esponenziale $[e^{AV}]$ l'ho potuto... *[errore nel parlato, e^{AV} è dentro la sommatoria]*... No, non posso. Ho dovuto spezzare la sommatoria. E non è una brutta idea, perché vi faccio vedere cosa si riesce a scrivere adesso.

$$\begin{aligned} \sum_k P_k C_{out,k} - \sum_k P_k C_{in,k} e^{AV} &= 0 \\ \sum_k P_k C_{out,k} - e^{AV} \sum_k P_k C_{in,k} &= 0 \end{aligned}$$

Quindi, quando dico che il flusso totale è zero, per lo stesso motivo di Kirchhoff (in cui sto dicendo di nuovo: è un equilibrio dinamico, non è la “morte termodinamica” in cui i singoli flussi sono a zero, ma... *la morte*... è un equilibrio dinamico, il totale, la loro somma degli effetti è mediamente nulla), mi accorgo che qui ci sono due casi per far venire questo flusso totale zero. Vuol dire che: 1. O il potenziale intracellulare (V) è nullo. È ok, è un caso legittimo, ma non mi interessa perché sperimentalmente io non lo vedo nullo, non lo vedo zero. Vedo che c'è una caduta di potenziale ai capi della membrana, che è quello che vorrei capire. 2. Questo al denominatore non conta. Questo termine [il numeratore] può essere zero, essendo un prodotto di termini, solo se il primo $[-A \cdot V / (1 - e^{AV})]$ o il secondo [la sommatoria] sono 0. Il primo... ok, $[V = 0]$ non mi interessa il caso semplice. 3. O il caso che questa quantità [la sommatoria] sia 0. Ed è un pochino... mi intimidisce, perché apparentemente... *non è un bordello*, però è grande, è complicato, non mi piace.

La somma di termini vuol dire che questa differenza è 0. Cioè vuol dire che questa somma qui $[\sum P_k C_{out,k}]$ è uguale a quest'altra somma qui $[e^{AV} \sum P_k C_{in,k}]$.

$$\sum_k P_k C_{out,k} = e^{AV} \sum_k P_k C_{in,k}$$

A parte questo termine $[e^{AV}]$. Quindi lo posso scrivere e posso dividere ambo i membri per questa quantità qua $[\sum P_k C_{in,k}]$.

$$e^{AV} = \frac{\sum_k P_k C_{out,k}}{\sum_k P_k C_{in,k}}$$

No, perdono. Ok, la porto... C_{in} ... sotto. E resto con un rapporto di somme, che sarà brutto però è quello che è. E a destra con $e^{AV_{in}}$.

Non mi piace l'esponenziale. *No problem*, applico ad ambo i membri il **logaritmo**, così da ammazzare l'esponenziale. Qui ho il logaritmo del rapporto di queste due somme, e a destra ho $A \cdot V_{in}$.

$$A \cdot V_{in} = \ln \left(\frac{\sum_k P_k C_{out,k}}{\sum_k P_k C_{in,k}} \right)$$

(Ricordando $A = ZF/RT$)

$$V_{rest} = \frac{RT}{ZF} \ln \left(\frac{\sum_k P_k C_{out,k}}{\sum_k P_k C_{in,k}} \right)$$

(Considerando Na , K ($Z=1$) e Cl ($Z=-1$))

$$V_{rest} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{P_{Na}[Na^+]_{out} + P_K[K^+]_{out} + P_{Cl}[Cl^-]_{in}}{P_{Na}[Na^+]_{in} + P_K[K^+]_{in} + P_{Cl}[Cl^-]_{out}} \right)$$

Trovo un'espressione stranamente simile al potenziale di Nernst. Qui non ci sono le G [conduttanze], qui io sto vedendo le P [permeabilità]. E continuo a vedere le concentrazioni (cosa che vi ho "nascosto" nella parte ohmica).

Ovvero: la parte ohmica per un ingegnere è semplice e immediata, sono delle resistenze. Al totale ci sarà una qualche resistenza che fa vincere... una qualche conduttanza che fa vincere, fa "pendere" il potenziale di membrana alla batteria che ha la conduttanza più grande, che fa vincere.

Qui è più complicato perché non lo vedo, però somiglia molto al caso di Nernst, in cui qui la **media è pesata sulle permeabilità** e continuano ad apparire le concentrazioni.

Quindi sembra che se... quindi dovrei rifraserlo... qui addirittura la dipendenza è con il logaritmo, quindi è più sofisticata. Dipendentemente da quella che è la permeabilità della membrana a una specie o all'altra (compatibilmente con le concentrazioni della specie stessa), il potenziale di riposo pende per l'una o l'altra. Pende più verso il potenziale di inversione del sodio (che è +50 millivolt) o il potenziale di inversione del potassio (che è -80 millivolt)?

L'Intuizione da Premio Nobel Prima di finire vorrei (e fare 10 minuti di pausa) vorrei semplicemente disegnare quello che vi ho appena detto.

Quindi, ho detto che... dovete chiamare questo asse V . Qui, **+50 millivolt** (circa) è il potenziale di inversione del sodio. Quindi è E_{Na} , il potenziale di Nernst del sodio. Qui, **-80 millivolt** (circa) è il potenziale di inversione del potassio (E_K). È un pochino più depolarizzato... era -68 millivolt, questo è il potenziale del cloro (E_{Cl}), se proprio ci interessa.

Questo perché magari in alcuno di voi potrebbe venire in mente adesso di dire: "Se questo potenziale di riposo, che normalmente sta piantato qui [a -70 mV], dovesse cambiare rapidamente e andare, come durante un **potenziale d'azione**, andare verso +20 millivolt, e poi andare verso -80 millivolt, e poi ritornare a un potenziale di riposo...". Come sembra dalle tracce che vi ho fatto vedere, se avete l'occhio, se vi ricordate qualcosa.

Potrebbe essere strano, o interessante, il fatto che non ecceda questo *range*: +50, -80. Che sono esattamente, in certe condizioni, i valori massimi e minimi che una distribuzione di ioni sodio e di potassio permettono al potenziale di membrana

di assumere. Se ci fossero solo quelli, e se le altre permeabilità sparissero (se le porte sono chiuse per il potassio e per il cloro, c'è solo la porta aperta per il sodio), allora questo è possibile.

Questa intuizione è quella che chiamerò nella prossima ora “intuizione da premi Nobel”, perché qualcosa del genere ha permesso a Hodgkin e Huxley di prendere il premio Nobel, spiegando non soltanto la parte di riposo, ma la parte di azione.

Eccitabilità

Grazie. ... il prossimo capitolo. Il prossimo capitolo è quello della **eccitabilità**.

La cosa che mi colpisce, o mi ha sempre colpito (al di là del fatto che io probabilmente ho 30 anni più di voi), è che comunque il chiarire l'origine e i meccanismi del potenziale di riposo, e poi della eccitabilità neuronale, non è qualcosa che si è sempre saputo da secoli e secoli. È relativamente recente. Recente della serie: negli anni '50. Meno di 60-70 anni fa, qualche anno più di 60 anni fa.

E non era così ovvio quello che oggi a lezione io vi racconto e in quattro e quattr'otto, spero senza troppe difficoltà, potete anche capire sia a livello quantitativo che a livello più intuitivo.

Contesto Storico La gente aveva iniziato a vedere che le caratteristiche elettriche di cellule eccitabili, come quelle nervose, non era costante nel tempo. Schizzava ogni tanto, in tempi molto piccoli, in frazione del secondo, nel milisecondo in particolare. Diversi personaggi, che sono indicati qui (ma solamente mi interessa farvi vedere le date), avevano inizialmente pensato che ci fosse una specie di propagazione in alcune parti della morfologia del neurone, nell'assone. Ci fosse una specie di propagazione di un'“irritazione” oppure di una propagazione di **correnti ioniche inward** (entranti).

Alla fine queste persone vedevano che il potenziale dentro rispetto a fuori (lo chiamo d'ora in poi V_M , potenziale di membrana; fuori è il mio riferimento che considero zero, perché ho un elettrodo di riferimento, io lo attacco nell'amplificatore, nell'altro spinotto dove segna zero), avevano visto che a un certo punto il potenziale di membrana diventava molto positivo. Quindi non era così strano per loro dire: “Boh, devono esserci delle correnti *inward*”, che vuol dire entranti, e in qualche modo portassero delle cariche positive all'interno della membrana.

Fra parentesi, adesso che voi sapete qual è il bilancio della concentrazione di ioni dentro e fuori, potreste dirmi come potrebbe essere chiamato questo ione. Che ione è? [Riferendosi a Na] Non è calcio perché c'è solo un “+”, non è cloro. Per lo stesso motivo per cui ce n'è tanto fuori, potrebbe essere che se succede qualcosa, per pura... in accordo con un... (fugge il termine)... con un **gradiente elettrochimico**, dato che ce n'è tanto sodio fuori, può naturalmente entrare dove ce n'è meno. E se questo succede, il potenziale potrebbe, dovrebbe, aumentare.

Non è stato così chiaro. Ci è voluto **Bernstein** e altri all'inizio del Novecento a pensare che non ci fosse necessario... fosse meglio non ragionare in termini assoluti di correnti, ma di **permeabilità**, di cambiamenti di permeabilità. Proprio per quello che vi è venuto in mente a voi, cioè: se c'è una condizione per cui

se apro la porta entra un marasma di gente (perché ce n'è tanta fuori e poco dentro), forse la chiave di tutto è capire la permeabilità.

All'epoca... è stato fino agli anni '70 che la gente non aveva capito che ci fossero dei canali, dei pori della membrana. Hodgkin e Huxley non avevano immaginato che ci fossero dei pori. Pensavano che ci fosse una specie di trasportatore, una qualche particella carica elettricamente (perché ora vedremo perché carica elettricamente) che facesse una specie di ponte. Ma il fatto che ci fossero dei pori è stato visto negli anni '70 e '80 da **Neher e Sakmann**, due elettrofisiologi tedeschi che pure vinsero il Nobel.

Vole... fino al '40, prima della Seconda Guerra Mondiale (dove ci fu un'interruzione), era tutta gente in Inghilterra in un laboratorio a Cambridge molto, molto notevole, particolarmente Hodgkin e Huxley. Adesso non mi ricordo se Cole e Curtis erano lì o erano in un'altra università, adesso non me lo ricordo. Non mi ricordo se fossero in Australia. Comunque, durante la Seconda Guerra Mondiale si è fermato tutto.

E ci è voluto diversi anni dopo questa ipotesi di Bernstein affinché la gente misurasse un cambiamento di permeabilità. E questo cambiamento di permeabilità, Hodgkin e Huxley con Katz eccetera, l'hanno poi messo in correlazione a queste correnti entranti. E alla fine il modello meccanicistico, quindi la spiegazione meccanicistica che descrive come le permeabilità ioniche possano sostenere (e come debbano cambiare, che cosa cambia e perché) per generare o per spiegare il potenziale d'azione, si ebbe negli anni '50.

E la cosa interessante è che questi signori, che dieci anni dopo vinsero il Nobel (Hodgkin e Huxley), lo formularono con un **modello matematico**. Cioè, il tipo di matematica ed equivalenti circuitali che vi ho raccontato, a un certo punto diventa un po' complicato da fare a mano. Fin tanto che si tratta di invocare l'equilibrio o le condizioni di riposo (per cui la corrente totale è zero), questo è relativamente facile. Capire in un contesto dinamico, in cui le quantità cambiano nel tempo, è un po' più complicato. Come d'altronde l'analisi di circuiti che non siano circuiti lineari (fatti cioè da componenti lineari: condensatori, resistori, induttori, eccetera) non è necessariamente banale. Vengono fuori delle equazioni differenziali. Poi alla fine l'equazione differenziale è sempre quella, però in alcuni casi diventano equazioni non lineari, come quella che appunto è.

Quindi lo strumento del calcolatore elettronico (o meccanico, come era alla loro epoca) si rivela fondamentale per capirci qualcosa.

Piano del Capitolo sull'Eccitabilità Seconda puntata di questo capitolo, si chiama eccitabilità, che ovviamente... *crescia*... Scusatemi.

In parte seguendo questo libro, **Sterratt**, e trovate anche materiale su **Abbott & Dayan**, che come ho detto forse la prima lezione e anche forse la settimana scorsa, contiene alcuni capitoli, qualche materiale (non è per intero), e questo Abbott & Dayan è molto più difficile come testo. E di nuovo, questi dovrebbero essere testi di supporto al vostro studio.

Quindi la partenza è quella che ci sia una concentrazione, una distribuzione di cariche e di ioni che non è omogenea fra dentro e fuori. Qui c'è il gattino, che è molto più dignitoso piuttosto che il paragone che vi avevo detto. Spero che

in un modo o nell'altro, o con i gattini o con il sudore, possiate ricordarvi della composizione del fluido extracellulare.

Gli equivalenti elettrici li abbiamo visti. Vorrei cercare di mettere tutto assieme, di mettere in un circuito equivalente (non perché io sono ingegnere, ma perché Hodgkin e Huxley, che erano fisiologi, l'hanno fatto) sia le proprietà **resistive** che quelle **capacitive**. E le metto assieme perché vedo che sono tutti componenti equivalenti che possono essere descritti come tutti sperimentanti lo stesso potenziale extracellulare e intracellulare. Se sono in parallelo... se il palloncino che vi ho fatto, che ho disegnato prima, la membrana con i singoli pori e le singole correnti che in qualche modo insistevano in modo parallelo, non vi convinca già abbastanza, già a sufficienza.

Questo è il punto di partenza, lo sto ripetendo. E questo di nuovo a riposo. Grazie, l'abbiamo capito.

Vediamo che nel prosieguo... (vi avrei dovuto far vedere una cosa, più tardi mi fermo per far vedere il notebook dell'equazione di Goldman)... tiene fuori fra poco la solita equazione differenziale del primo ordine a coefficienti costanti. In realtà i coefficienti non saranno costanti, ma in una trattazione a parte che facciamo per semplicità diventerà esattamente quella a coefficienti costanti.

Vi ricordate che se volete rendermi felice, dovete fare attenzione che la variabile di stato (che ovviamente in un'equazione differenziale è una funzione) abbia un **coefficiente negativo**, perché va all'esponente e i sistemi biofisici, biologici, dovrebbero essere sistemi dissipativi. Dovrebbero non esplodere, ma spegnersi o comunque convergere a qualche quantità. Di sicuro non sono quantità che esplodono, perlomeno non esplodono sempre o in ogni momento.

Quindi avere comprensione, memoria, conoscenza di come si risolve questa equazione differenziale è essenziale. E anche come si "plotta" una funzione, come si deriva il grafico di una funzione del tipo: **costante + esponenziale**, dove l'esponenziale è decrescente ($k \cdot e^{-t/\tau}$).

Vi ho raccontato l'altra volta che posso immaginare che il termine esponenziale a un certo punto sparisce. "A un certo punto" vuol dire quando la variabile di stato... poniamo... è sufficientemente grande in valore assoluto. L'esponenziale di una quantità molto negativa è zero. Quindi a un certo punto questa quantità la posso trascurare. Questo modo di guardare alle soluzioni e alle funzioni matematiche alle volte aiuta, piuttosto che avere chiaro l'analisi funzionale di come si fanno i limiti, le derivate, la concavità... perché "a spanne" si può avere più o meno lo stesso risultato.

Obiettivi Specifici Quindi l'idea è quella di combinare questi aspetti capacitivi e resistivi in quella che viene chiamata **equazione del bilanciamento di carica**, in cui non considero più l'ipotesi di riposo, di *rest*, di condizione di riposo.

1. Vi faccio vedere com'è possibile ottenere un **circuito a parametri concentrati**, nonostante sia la membrana sia un circuito esteso nello spazio.
2. Poi in effetti vi ho già annoiato durante le prime lezioni in cui vi ho raccontato che i neuroni, descritti come le "farfalle dell'anima" da un grande

neuroanatomico, sono degli oggetti spazialmente estesi. Sono tanto spazialmente estesi quanto può essere la distanza fra il mio tratto piramidale e il mio piede, in prima approssimazione. Quindi potrebbe essere che questa cosa delle descrizioni a parametri concentrati non sia valida sempre. Però adesso la consideriamo. Vi dirò perché, che cosa vuol dire “parametri concentrati” se non avete fatto qualcosa di simile in qualche corso su elettromagnetismo.

3. E dato che si parla di equivalenti circuitali, vorrei **derivare il modello circuitale equivalente**. Di nuovo, l'ambizione è che guardando il modello io possa inferire delle considerazioni su quello che è il segnale elettrofisiologico che misuro sperimentalmente.
4. Parlerò di un modello (questa è la cosa *latere* che vi faccio in modo semplice) in cui esce fuori la solita noiosa equazione differenziale a coefficienti costanti.
5. Qui vi faccio vedere quello che tecnicamente viene chiamato l'**equivalente circuitale di Thévenin**. C'era anche Norton che era un amico, ma io preferisco Thévenin. Nel caso in cui le cellule non siano eccitabili (e adesso vi dico che c'entra con l'eccitabilità), permette di fatto di avere un **RC** [circuito Resistore-Condensatore] di cui forse avete già sentito o masticato.
6. Quindi guarderemo come si può vedere la risposta a uno stimolo. E lo posso fare carta e penna, o comunque lo faccio, avete tutto sulle slide. E avere delle intuizioni sullo *steady state*, sullo stato stazionario.
7. E poi c'è un esercizio in cui vi racconto **quanti ioni sono scambiati** durante un potenziale d'azione. Quindi quanto spesso dovrete mangiare banane e cioccolata per supportare il fatto che la maggior parte delle cellule nel vostro cervello adesso sta “sparando” come uno ossesso da diverse ore, da stamattina e anche durante la notte. Quindi, quanto metabolicamente è costoso essere eccitabili?
8. E a un certo punto (non sono sicuro che lo facciamo oggi) vi parlerò di quello che è la descrizione cinetica, efficace, fenomenologica dei canali di membrana, che non sono tutti dei pori che stanno lì e non fanno niente. Sono delle strutture che cambiano in modo molto rapido (la zona geografica si presta al paragone: sono delle Ferrari del mondo molecolare, della biologia molecolare) perché sono in grado di cambiare forma estremamente rapidamente, con una frazione di millisecondo. Però non voglio fare *spoiler*.
9. Questa descrizione è la stessa descrizione che molti di voi già conoscono nelle reazioni chimiche. Forse però nessuno vi ha fatto vedere che le reazioni chimiche (sodio più... cloruro di sodio), questa notazione con qualche numeretto sopra che forse avete indicato con le costanti K_1 , K_2 , quello che è, in realtà è un'equazione differenziale. Però nessuno forse ve l'ha raccontato. Si chiamano schemi cinetici marcoviani, a suo tempo.
10. E vi dirò che c'entrano con la descrizione completa, che combina *su* tutte queste cose di prima, il **modello proposto da Hodgkin-Huxley** per spiegare meccanicisticamente il perché avviene il potenziale d'azione.

L'Equazione del Bilanciamento di Carica (Charge Balance Equation) Quindi richiamo Lavoisier, del “nulla si crea, nulla si distrugge”, e fra le altre ipotesi semplificatrici che avevo fatto, la principale adesso era quella del

considerare a riposo, o allo *steady state*. Sarebbe stato più corretto dire che le grandezze non cambiavano nel tempo (-70 [mV] restava costante), quindi non c'erano grandezze che variavano nel tempo.

Tolgo anche quello, e vi anticipo che questo vuol dire che voglio mettere anche gli **effetti capacitivi**, che di per sé, di loro, hanno una caratteristica di integrazione temporale. Il condensatore (o capacitore) ha una capacità, accumula. È come la vasca da bagno in casa vostra o il lavandino: è un accumulatore. Quindi è un termine che ha "memoria". La memoria fa pensare al tempo (memoria non... ancora non memoria neurobiologica, ma memoria dinamica, di sistema dinamico).

E invocando la conservazione della carica, e quindi invocando Lavoisier, posso combinare le cose assieme.

In particolare, dico che il bilancio di carica totale è zero. Non si distrugge o non si crea la carica. In un sistema elettrolitico, nel mio cervello, in un neurone, non c'è una distruzione di carica e non c'è una creazione di nuova carica.

E i cambiamenti della carica (ΔQ) nel caso della membrana di un neurone possono aversi per due motivi (ve l'ho già anticipato e sto insistendo nella speranza che non siano informazioni troppo complicate o troppo tecniche):

1. Da un lato c'è lo **spostamento** (le correnti di spostamento, I_C). Non apro la porta, mi avvicino però sono molto carico positivamente... anzi, negativamente... e da fuori le cariche positive vengono per neutralizzarmi, però beccano il dielettrico, l'isolante. Quindi io so che nel caso di un condensatore, questa carica spostata (ΔQ_C) dipende dalla differenza di potenziale (ΔV). Differenza di potenziale che, per esempio, sto rappresentando nel contesto temporale. Di nuovo, prendo l'orologio, faccio passare un Δt , so che ci sono... quindi esprimo in termini di corrente ($I_C = \Delta Q_C / \Delta t$) questo rapporto Δ carica rispetto a Δ tempo. Vuol dire: quanta carica è cambiata (ed è uno spostamento) nell'unità di tempo, Δt .
2. E il **trasporto** (le correnti ioniche, I_{ion}). Invece è questa corrente... questa è una corrente di trasporto. È data da quelle correnti, non ha a che fare con la capacità, ma ha a che fare con quei flussi, o con le densità di corrente, determinate dai flussi ionici delle singole specie: sodio, potassio, calcio, cloro.

Quindi il totale della carica... *[erroneo nel parlato, si intende la variazione di carica]*... è la corrente per il Δt . E in questo caso [capacitivo] è data da ΔQ_C . Questo per il condensatore non c'entra il tempo... *[erroneo nel parlato, $Q = CV$ è la relazione base, ma la corrente dipende dalla variazione di V nel tempo]*. Questa è la differenza di potenziale ai capi della membrana, punto. Se io so quello, se io so quanto c'è ai capi della membrana, posso capire qual è il ΔQ_C , la quantità di carica spostata. Questa è la carica del trasporto ($\Delta Q_{ion} = I_{ion} \cdot \Delta t$) che richiede di ricordarsi che cos'è una corrente, che quindi è carica nel tempo.

Se questa corrente totale... *[la somma delle variazioni di carica]*... non cambia, vuol dire che... $\Delta Q_C + \Delta Q_{ion} = 0$

(Ricordando $Q_C = C \cdot V$ e $\Delta Q_{ion} = (\sum I_k) \cdot \Delta t$) $(C \cdot \Delta V) + (\sum I_k) \cdot \Delta t = 0$

... $C \cdot \Delta V$ deve essere uguale alla somma... scusate, $C \cdot \Delta V$ più questa sommatoria

delle correnti per Δt deve essere uguale a 0. Quindi $C \cdot \Delta V$ uguale a **meno** questa quantità $[\sum I_k \cdot \Delta t]$. Prima erano tutti al primo membro, adesso ho spostato al secondo membro le correnti, cambiandole di segno.

E ho *fregato* loro... ho diviso ambo i membri per una quantità che non è diversa da zero (quindi lo posso fare), Δt . Qui mi è venuto $C \cdot \Delta V / \Delta t$. Qui non ce l'ho più il termine di Δt .

$$C \frac{\Delta V}{\Delta t} = - \sum_k I_k$$

E facendo il limite per Δt che tende a zero, di fatto questa cosa qua è l'**equazione costitutiva di un condensatore in parallelo con un parallelo di resistori**.

Però qui la mente da elettronico non l'ho dovuto utilizzare. Qui è il bilancio di carica. Infatti questa equazione viene dal bilanciare la carica. Incidentalmente, è la stessa equazione che Kirchhoff proporrebbe. E alla fine, ovviamente, i paralleli sono spiccati.

L'Importanza del Segno Meno (Sistemi Dissipativi) A proposito di rendermi felice o triste: notate questo **meno**. Queste correnti singole (I_k), se vi ricordate, erano $I_k = G_k \cdot (V - E_k)$.

$$C \frac{dV}{dt} = - \sum_k G_k (V - E_k)$$

Il fatto che ci sia un meno, al di là della convenzione se entra o se esce, si potrebbe aiutare mnemonicamente a pensare che quando scrivete l'equazione del bilanciamento della carica ($C \cdot dV/dt = \dots$), il fatto che ci sia un meno (che ovviamente io non lo ricordo mai, infatti lo sbagliavo quando ve l'ho detto ad alta voce un attimo fa, non l'ho considerato)... questo meno mi fa **invertire** questa differenza.

Questa differenza ($V - E_k$) incidentalmente è anche un nome, si chiama **driving force** (non è la forza elettromotrice). È un termine forzante: avendo un particolare potenziale intracellulare, per quella specie ionica il fatto di essere più o meno distanti dal potenziale di Nernst gli causa una corrente più o meno intensa.

O... il meno diventa qualcosa che diventa $G_k \cdot (E_k - V)$.

$$C \frac{dV}{dt} = \sum_k G_k (E_k - V)$$

Quindi io sono contento perché c'è il **meno** V . Quindi non dimenticatevi questa cosa per rendermi contento: di buttare un occhio sul fatto che quello che scrivete o che vedete scritto (quello che in teoria potreste numericamente validare con una simulazione al calcolatore) potrebbe non esplodere, non dovrebbe esplodere.

Perché questo sistema, nonostante sia un sistema elettrico, ionico, è un **sistema dissipativo**. I canali ionici sono sistemi di trasporto **passivo**. Non è necessario consumare ATP di per sé per far funzionare gli ioni. Consumate ATP per far funzionare le **pompe ioniche**, che sono meccanismi di trasporto **contro** il gradiente elettrochimico. Quindi [se] sono uno ione sodio, ho bisogno di una pompa ionica per farmi buttare fuori; ho bisogno di energia perché fuori c'è un sacco di sodio.

Comunque, vi prego di farmi felice perché qui è la stessa variabile di stato, V , che compare con un esponente... [errato, intende coefficiente]... negativo. Lo so che qui ci sono un sacco di termini ($G_{sodio}(E_{sodio} - V) + G_{potassio}(E_{potassio} - V) \dots$), ci sono tanti... Però concettualmente, se anche sono tanti, è facile che questo termine “meno” propagato possa comunque giustificare l'esistenza di un sistema dissipativo. Quindi di soluzioni che abbiano qualcosa a che fare con esponenziali decrescenti e non esplosivi, che non vadano le grandezze biofisiche all'infinito.

Il Circuito Equivalente (Modello a Parametri Concentrati) Quindi questa equazione qui non è altro che il **parallelo** fra un condensatore e una serie di resistori (ovviamente resistori con anche delle batterie).

Questo è lo schema circuitale di un pezzettino (viene anche chiamato *patch*, “toppa”) di membrana, in cui vedete che il doppio strato fosfolipidico è indicato come equivalente a un **condensatore** (C_m). Quindi se io sono uno ione, mi fermo qua, non vado dentro perché lì c'è un... anche energeticamente sarebbe impossibile, avrei bisogno di un sacco di energia per farmi spingere dentro. Proprio come nei condensatori avete bisogno del cosiddetto *breakdown* del dielettrico per avere una corrente di trasporto all'interno di un condensatore. I fulmini sono un esempio di *breakdown* del dielettrico e ovviamente avete un'energia enorme. Qui non “bucate” fisiologicamente il dielettrico della membrana.

Però, se siete uno ione, potete (come avevo fatto nel disegno dell'altra volta), se il canale vi fa passare (perché è quello selettivo a voi) e se il canale è aperto (potrebbe essere magari come la porta chiusa), vi fa passare fra da dentro a fuori o viceversa.

Qui ho indicato anche la punta di un **elettrodo di vetro**, quello che vi ho mostrato durante le prime due lezioni, perché in teoria la punta di questo elettrodo (che vi ricordate contiene un filo di argento-cloruro, che azionato opportunamente da una corrente elettronica rilascia o si “succhia” una corrente cloro)... Quindi io qui in teoria “sputacchio” o “succhio”, quindi interagisco con l'ambiente ionico intracellulare. Ed è come se questo possa essere caratterizzato da un circuito equivalente pari a un **generatore di corrente ideale** (I_{ext}). Quale che sia la caduta di potenziale ai capi della membrana, la corrente è quella che metto io. Adesso non ne metto perché voglio vedere cosa fa il neurone. Se voglio magari stimolarlo, butto qualche decina o centinaio di picoampere (nel caso di una pipetta e nel caso di un neurone di mammifero sarebbe una corrente abbastanza tosta).

Però la membrana è estesa. E quindi ci sono tanti canali. Vedete che alcuni canali sono di tipo diverso, infatti la batteria è orientata nel modo diverso. Nulla da capire, è solo per me per ricordarmi che alcuni sono per il sodio (E_{Na}), altri sono per il potassio (E_K), e ognuno ha un potenziale di Nernst che non è uguale,

addirittura ha delle differenze di segno (quelli del sodio sono +50, +56 quello che è; il potassio è -80, eccetera eccetera). Quindi non sono tutti identici. Al di là del fatto che sono dei canali che sono selettivi solamente a una specie ionica, ma elettricamente io me ne frego che siano selettivi a una specie ionica. Però le batterie, il segno e l'ampiezza, devo tenerne conto.

Quindi una cosa che si fa... (che finiva così senza suspense, pensavo che apparissero... qualcosa che non me lo ricordavo)... uno potrebbe dire: "Ma non è che per caso posso **semplificare** questo circuito che adesso in questa configurazione ha parametri distribuiti?"

Quindi in teoria, o meglio, no, è sempre a parametri concentrati, soprattutto perché i punti qui all'interno e all'esterno sono isopotenziali. Non c'è una resistenza che descriverebbe (o dentro o fuori) una differenza di distribuzione, una differente distribuzione di potenziale elettrico cambiando il punto. Però potrei decidere di semplificarlo perché sono noiosi da gestire eventualmente carta e penna.

Richiami di Teoria dei Circuiti (Leggi di Kirchhoff) Quindi vi faccio dei cenni di cosiddetta teoria dei circuiti, o elettrotecnica, in cui non ho un approccio veloce, ve lo rammento soltanto. Non ho un approccio astratto e formale che richiederebbe quello di invocare la teoria dei grafi e dire che un circuito è una collezione di nodi e di archi... (non vi ricordo come si dice *link* in italiano)... nodi e *edge*. E per ciascuno di questi nodi io posso associare due grandezze elettriche. Lo posso fare arbitrariamente. Posso queste grandezze elettriche orientarle come voglio, quindi avranno un orientamento, orientazione algebrica. Posso fare quello che voglio, purché poi io sia consistente.

Quindi la faccio molto più semplice di così. Vi ricordo che queste quantità vengono utilizzate nelle cosiddette **Leggi di Kirchhoff**, discendono da principi fisici dell'elettromagnetismo: 1. **Prima Legge di Kirchhoff (Legge delle Correnti, LKC)**: Della conservazione della carica. Dato un qualunque nodo, la somma algebrica ($\sum I$) di tutte le correnti che entrano o escono (con segno) è **zero**. 2. **Seconda Legge di Kirchhoff (Legge delle Tensioni, LKT)**: Nel caso della circuitazione uguale a zero del campo elettrico, quindi dovuto alle proprietà conservative energetiche del campo elettrico. Il percorso che faccio (vado da qui a qui e poi qui... un percorso chiuso, quindi una maglia) ha la somma ($\sum V$) di quantità di queste grandezze elettriche di potenziale... la somma algebrica, presa con i segni, con un verso che volete (purché siete consistenti), la somma è **zero**.

Quindi una cosa che si fa in elettrotecnica o in elettronica, si può scegliere (ma è puramente convenzionale) è la cosiddetta **convenzione degli utilizzatori**. In cui dati due nodi, tipicamente si prende il potenziale (V) orientato così (con la freccia che va all'insù) e la corrente (I) che va all'ingiù. Semplicemente perché nel caso di un utilizzatore, di un componente passivo, di una resistenza, l'equazione costitutiva di una resistenza dice che se tu prendi il potenziale orientato così e la corrente orientata così, $V = R \cdot I$. Con questa convenzione. Se no avrebbero dei segni diversi. Ha a che fare con il fatto che... con la solita storia del dislivello, il paragone con il potenziale gravitazionale: se uno ha una differenza di quota, ha un flusso di carica. Il dramma è che si pensava che fossero cariche

positive a condurre le correnti elettriche. Quindi se vedete la lezione scorsa o due lezioni fa, la carica positiva, quando il campo elettrico è orientato in questo modo, si muoverebbe scendendo, come la massa fa quando c'è un dislivello di quota (un fiume va a valle, non risale una montagna). Però questo è rimasto e la legge di Ohm funziona con queste assunzioni.

Non è fondamentale. Vi sto raccontando queste cose, primo: per suggerirvi, se non le avete fresche, magari di riguardarvele. Se non le avete mai fatte, potreste essere curiosi, potreste essere ambiziosi a dire: "Ma perché ci vuole un genio per avere un'infarinatura di teoria dei circuiti?" No, non c'è questo. Era in particolare questa cosa del senso di inferiorità... era particolarmente vivo quando ero in Belgio, in cui gli studenti non avevano un background tecnico e quindi dicevano: "Ah no, io non sono un fisico, un matematico, un ingegnere, non lo faccio". Prova. Vedrai che è semplicemente una roba di algebra, non serve particolarmente altro.

Qui lo uso soltanto per farvi vedere che quel parallelo di resistenze e condensatori (perché anche il condensatore è una proprietà in teoria distribuita) possono essere compattati in un punto.

Quindi, in teoria, ho bisogno di tutti gli strumenti dell'analisi dei circuiti, che vi ho in parte già proposto senza in effetti fare un richiamo formale. Queste sono le equazioni di Kirchhoff. E gli *hardcore*, diciamo gli appassionati di elettrotecnica formali dicono: "Ah ok, io ho un numero di equazioni uguale al numero delle incognite e quindi qualunque circuito io lo posso descrivere, posto che mi dai l'equazione di Kirchhoff e le equazioni costitutive dei componenti".

Comunque: * **Equazione delle correnti (LKC):** Tra ogni giunzione (ciciclo, nodo, come lo volete chiamare... l'importante è che questa superficie chiusa non intersechi la parte, per esempio, di un componente come un resistore o un condensatore, non entri dentro, perché altrimenti le ipotesi dell'elettrotecnica non valgono più, bisognerebbe ricorrere all'elettromagnetismo). Ci sono dei video di YouTube molto interessanti di Veritasium, che è un divulgatore eccezionale, che forse l'anno scorso ha parlato proprio di fenomeni di propagazione elettrica, della corrente o del campo elettrico che si muove nello spazio. Comunque, se vi interessa vi do il link, è molto bravo. Quindi, equazione di Kirchhoff, la legge di Kirchhoff per le correnti: la somma delle correnti è zero ($\sum I = 0$). La carica si conserva. Alla fine la corrente è carica per tempo ($\Delta Q / \Delta t$), Δt chi se ne frega, ΔQ totale uguale a zero, quindi si conserva. * **Equazione delle maglie (LKT):** O i cicli (*loop*). Il potenziale, la somma algebrica per qualsiasi maglia o ciclo che parte in un punto e *ritrova*... torna nello stesso punto, coinvolgendo quanti nodi voi vogliate, fa sì che la somma sia zero ($\sum V = 0$), dove sono grandezze orientate. Questo è dovuto alla conservatività del campo elettrico. Questa è conseguenza della circuitazione (se avete familiarità con le equazioni di Maxwell) del campo elettrico. Ma comunque, queste sono richiami eventualmente per risuonare in chi di voi ha queste informazioni.

Equazioni Costitutive dei Componenti Le equazioni dei componenti, alla fine: * Il **condensatore** e la **resistenza** sono gli unici due componenti che vediamo (a parte forse i generatori ideali di corrente e tensione). * **Resistore:** $V = R \cdot I$ * **Condensatore:** $I = C \frac{dV}{dt}$

Sono le uniche equazioni che abbiamo in effetti già masticato. E tenete conto che valgono così se prendete queste convenzioni, che è la convenzione degli utilizzatori (se prendete la tensione che punta in alto e la corrente che va nel senso opposto, per motivi di cui vi ho detto). Quindi V è V qui in alto meno V in basso, ma tipicamente vuol dire, scrivendo così, V è la differenza di potenziale tra questi due punti.

Nel caso di un induttore... non li vedremo mai perché non esistono, o perlomeno non sono apprezzabili i fenomeni induttivi nel caso della biofisica delle membrane eccitabili e dei neuroni, delle cellule eccitabili in generale.

Quello che vediamo è, al limite, le equazioni costitutive di una **batteria** (o generatore ideale di tensione) o **generatore ideale di corrente**: * **Generatore di Tensione**: Sono molto facili. Se il generatore di tensione è V (ripeto, presa così la V), $V = E$. Dove E si pone che sia positiva, ma anche se negativa è uguale. $V = E$, poi sarà E che se la gioca lei quello che è il segno, se magari cambia nel tempo non importa. * **Generatore di Corrente**: $I = A$. Dove in effetti dovete fare un pochino più di *tensione* [attenzione], perché per i generatori vale un'altra convenzione, che è quella dei **generatori** (convenzione degli *utilizzatori*... [errato, intende "dei generatori"]), in cui corrente e tensione sono allineati e vanno nella stessa direzione.

Se li mettete in un circuito elettrico in cui avete un generatore di tensione (in cui questa è V , in cui questa è I) e questo è un resistore (per esempio il circuito di una lampadina a incandescenza), capite perché la gente ha utilizzato questa convenzione in cui dal generatore la corrente ha quel segno. Quando è positiva... se fosse negativa, amen, avrebbe segno meno. Comunque, questa è una convenzione che potreste dover sapere, però ripeto, non credo che lo utilizzerete mai nel caso della... se non probabilmente per la descrizione... ok, se andate a fare ingegneri neuromorfi, ovviamente, però dovreste masticare i circuiti *per sé*.

Esercizi: Serie e Parallelo Prima di fare il break, l'interruzione. Un possibile esercizio per derivare su questa base: 1. Il perché due **resistenze in serie** hanno una resistenza equivalente (R_{eq}) che è la somma delle resistenze ($R_{eq} = R_1 + R_2$). 2. E invece un **parallelo di resistenze** è equivalente a una resistenza che ha come resistenza un valore il cui inverso è la somma degli inversi ($1/R_{eq} = 1/R_1 + 1/R_2$).

Se fossero conduttanze: 1. Il parallelo è la somma delle singole conduttanze ($G_{eq} = G_1 + G_2$). 2. Per le conduttanze, la serie di conduttanze sarebbe una conduttanza equivalente il cui valore, il cui inverso, sarebbe la somma degli inversi ($1/G_{eq} = 1/G_1 + 1/G_2$).

Si può fare esattamente con le leggi che vi ho raccontato, mettendo cioè equazioni costitutive a ogni nodo delle grandezze elettriche di tensione e di corrente. Se volete, ripeto, lo possiamo fare poi assieme.

Queste sono le equazioni di Kirchhoff per questo nodo e questo nodo [circuito serie], e questa è l'equazione dell'unica maglia che è presente da questo nodo a quest'altro e ritorno. Queste sono le equazioni costitutive. È un sistema di n incognite in n equazioni. A un certo punto riuscirete a farlo a occhio, a vedere che visto che non c'è nessun filo che "esce" qui... dal punto di vista idraulico,

è come se aveste un tubo che ha una certa portata con del liquido qui, quindi quello che è il flusso di liquido che entra qua deve conservarsi, deve continuare a essere qui e deve continuare a uscire. Quindi sì, $I = I_1$, $I_1 = I_2$. Però a un certo punto forse dovreste vederle a occhio queste cose qui, se non già le vedete a occhio. Però [lo dico] semplicemente perché qualcuno di voi mi ha detto che non è fresco, non è particolarmente a suo agio con i circuiti per il proprio background. E questo è legge di Ohm ripetuta due volte.

Se fate la stessa cosa qua [circuito parallelo], dovreste in qualche modo fare la stessa cosa per questo circuito di sinistra e per questo circuito di destra. E capire quando le due relazioni fra V e I (quindi fra questa V e fra questa I , che è la stessa che c'è qui... fra questo e questo e la I grande che c'è qui) diventano uguali. In questo caso vedreste che l'unico modo è che la R equivalente qui è $R_1 + R_2$. Qui dovete chiamarlo in un modo diverso. Mentre qui [parallelo] vedreste che è un pochino più fastidioso, ma è algebra.

Ok, questo se volete, di nuovo, lo potete fare per conto vostro e sono a disposizione se avete problemi. È semplicemente mettere dei numeri, perché molte volte queste cose restano appese. Supponete di avere questo tipo di circuito, che potrebbe essere il potenziale di Nernst del sodio, e due... in effetti in questo modo qui non sarebbe biologicamente realistico, dovrei cambiarlo e farlo biologicamente realistico. Comunque, avete due resistenze in parallelo.

La prima domanda potrebbe essere: ma qual è la tensione ai capi di queste due resistenze? Qui, anche se uno non ha rudimenti di Kirchhoff e non invoca Kirchhoff, lo si vede: che fra questo punto e questo punto il potenziale elettrico è quello imposto dal generatore. Quindi V è noto. La cosa che non è nota (perché di nuovo, nel parallelo idraulico, nell'analogia idraulica, qui qualunque cosa esce si confronta con una biforcazione, una parte entra qui e una parte entra lì)... quindi dipende. Allora lì ho bisogno magari di usare Kirchhoff.

Potrebbe non essere comunque così strettamente necessario se pensate che la corrente potrebbe avere una difficoltà maggiore o minore di andare in un percorso a resistenza maggiore o minore. **La corrente va nella direzione di resistenza minore.** Come d'altronde... non le biciclette, ma anche le biciclette se sono in caduta libera in una valle... sto pensando alla discesa del gradiente in *machine learning*. Quindi un torrente va giù, segue la direzione lungo il potenziale (gravitazionale in quel caso), ovviamente scegliendo il percorso che ha meno restrizioni. Però nel caso idraulico non è... ma forse sì, anche nel caso idraulico lo è.

Per fare questo esercizio dovete scrivere semplicemente l'equazione di Kirchhoff a questo nodo e le equazioni costitutive. Trovereste la corrente che scorre in ognuno di questi resistori, oppure la corrente che scorre qui in questo parallelo di resistori.

Potrebbe essere interessante perché quando la membrana è un parallelo fra la conduttanza sodio, la conduttanza potassio e la conduttanza cloro, voi iniettate della corrente... potrebbe avere un interesse. Quindi non avete un generatore di tensione. In effetti ci sono delle modalità sperimentali in cui si può applicare (si chiama *voltage clamp*, ma non ve ne parlo) in cui si può applicare una tensione. In quel caso la corrente che voi vedreste è quella che viene dal percorso a resistenza minore, o a conduttanza maggiore, come intuitivamente uno

si aspetta.

Se avete problemi me lo dite, sono a disposizione. Qui era la storia del partitore resistivo, per chi di voi ha vaghe reminiscenze di elettrotecnica, in cui appunto, mentre la corrente segue il percorso alla resistenza minore, il potenziale si divide proporzionalmente con la resistenza. Ma non è cruciale.

Semplificazione: Parametri Concentrati (Lumped Parameters)

Prima di interrompervi vorrei allora dirvi: che cosa ne faccio di questo equivalente circuitale in cui ho un sacco di condensatori in parallelo, con intermezzo anche dei tanti canali? Ne avrò qualche decina di milioni di canali sodio, uno vicino l'altro... magari non sono tutti vicini, ma per me tutto è isopotenziale in questa membrana, in questa cellula potenzialmente sferica, isotropa e uniforme.

Quindi ho un sacco di condensatori in parallelo e un sacco di resistenze in parallelo. Non è che posso scrivere un unico condensatore che ha la **capacità equivalente** (C_{eq})? * **Per i condensatori** è facile, e anche per le conduttanze è facile. Perché se voi immaginate l'espressione della capacità ($C = \epsilon A/d$) che scalava linearmente con la superficie (A) e inversamente con la dimensione fra le due piastre (d), potreste pensare che questo caso qua [parallelo] è come se voi steste mettendo (in effetti lo state facendo) dei condensatori a facce piane parallele, uno in *conduzione elettrica* [connesso] all'altro. Quindi è come se steste ampliando la capacità. E quindi la **capacità totale equivalente è la somma delle capacità** ($C_{eq} = \sum C_i$), perché la superficie totale è la somma delle superfici. Quindi nel caso della capacità è semplice e intuitivo, e vi basta. Se volete però "rompere il capello", dovrete scrivere $I_i = C_i \frac{dV}{dt}$ (equazione costitutiva) per ciascuno di questi condensatori, e scrivere, visto che tutte quante le correnti devono conservarsi (la loro somma algebrica deve essere 0), potreste scoprire che questo è equivalente a scrivere tante volte $I_{tot} = I_1 + I_2 + \dots = C_1 \frac{dV}{dt} + C_2 \frac{dV}{dt} + \dots$. E vedete che $\frac{dV}{dt}$, visto che è condiviso, può essere fattorizzato. Quindi lo potete anche vedere algebricamente. * Mentre **per le conduttanze** con in serie una batteria è un po' più fastidioso, però concettualmente... se voi avete non una porta, ma avete (perché qualcuno spacca per lavori di ristrutturazione e fa tante aperture), è ovvio che sia come conduttanza, permeabilità, la possibilità che voi possiate in un caso di incendio fuggire da questa stanza aumenta. È più facile, siete facilitati se non avete soltanto qui e lì (avete un ingorgo). Se ne avete di più, la corrente può distribuirsi. Di nuovo, la corrente totale è la somma delle correnti; la **conduttanza [equivalente] è la somma delle conduttanze** ($G_{eq} = \sum G_i$).

Un ultimo [modo], prima di fermarmi, metodo con cui io ricordo questa cosa qua è che la **capacità di membrana** (che dovete ricordarvi a memoria) è **1 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$** (un microFarad al centimetro quadro), la capacità specifica. Quindi se io ho una membrana che è piccola o grande o grandissima, visto che [l'unità di superficie] è al denominatore, se la voglio totale, devo prendere questa cosa qua e moltiplicarla. Quindi più grande la membrana, più in effetti ho tante di quelle capacità, tanto più la capacità totale sarà aumentata. Quindi: quanto più una cosa è grande, tanto maggiore è la capacità (perché avete l'unità di superficie sotto).

E la stessa cosa avviene per la **conduttanza**. Adesso dico un numero a caso per-

ché non me lo ricordo: $3 \mu\text{S}/\text{cm}^2$ (microSiemens al centimetro quadro). Anche la conduttanza specifica è per centimetro quadro. E di nuovo, questo è facilmente comprensibile se vi ricordate la definizione di resistenza come resistività (ρ) per lunghezza (L) diviso area (A). La conduttanza è il contrario, quindi cresce linearmente con l'area.

Quindi: quanto più è grande la superficie che moltiplico, tanto più grande è la capacità [e la conduttanza].

Quindi dipende dai vostri gusti: se siete particolarmente intuitivi, visuali; oppure se siete amanti delle unità di misura; o se invece (ed è legittimo, io sono a metà) preferite avere una macchinetta, un metodo matematico che staccate il cervello, azionate la matematica e avete la risposta giusta che vi parla dello stesso sistema. Ancora meglio. Avete tutti gli stessi strumenti.

Provate a farlo: a dimostrare che la capacità [equivalente] è la somma delle capacità e le conduttanze [equivalenti] sono somma delle conduttanze. Occhio: perché non sto dicendo che sommate assieme le conduttanze di tipi diversi. Sto parlando delle stesse conduttanze, dei singoli canali ionici [dello stesso tipo], sommate assieme. E avete un unico ramo [per tipo]: “tutto il sodio va lì”.

Come uno dei vostri colleghi durante l'interruzione mi ha fatto notare, alla fine è abbastanza scontato il fatto che il modello circuitale equivalente di una membrana, che è costituita da tanti singoli canali ionici, possano essere raggruppati per tipo (altrimenti se hanno un diverso potenziale di inversione, o potenziale di equilibrio di NERNST, *e il mestiano* [misciano?])... non potrebbero essere messi assieme, lo potete verificare nell'esercizio precedente).

La cosa che io ho fatto notare è che se in generale anche l'esercizio di fare o di farvi pensare al parallelo di capacità di condensatori torna utile (può sembrare banale qui, anche se a ogni intermezzo fra due canali in teoria è come se uno avesse un condensatore), torna utile nel caso in cui ci siano delle cellule che siano spazialmente distribuite. Per dire, in cui la condizione di ipotesi di isopotenzialità non valga, il potenziale non è lo stesso in tutti i punti dentro o in tutti i punti fuori, semplicemente perché è lungo, perché è esteso. Lo vedremo molto precisamente, perché questa componente spazialmente estesa permette di capire l'origine dei segnali extracellulari. Ma prima di capire i segnali extracellulari, dobbiamo capire i segnali intracellulari.

L'Equazione Completa del Bilanciamento di Carica Quindi vedete qua che le proprietà capacitive sono concentrate in un unico ramo di questo circuito. Esiste il generatore ideale di corrente (I_{ext}) che è messo in parallelo (la punta della pipetta continua ad essere qua). E tipi simili, tipi analoghi, tipi affini di conduttanze o di canali ionici — selettivi al sodio (G_{Na}), selettivi al potassio (G_K), selettivi in generale (questo è un termine che Hodgkin e Huxley hanno definito non selettivo e che qui viene chiamato *leak* come “perdita”, G_L , *leakage* è un termine inglese per dire perdita) — di fatto sono rami diversi e sono messi in parallelo.

Quindi, dato questo circuito, o viceversa, guardando quella equazione di conservazione della carica che abbiamo visto all'inizio dell'ora precedente, si scriveva: $C \frac{dV}{dt} = -(I_1 + I_2 + \dots)$

Quello che volete, più magari metto io, la corrente la chiamo I -grande-ext (I_{ext}), non so se si legge, c'è scritto I_{ext} , che è la corrente esterna dovuta a uno sperimentatore, dovuta a me che inietto delle correnti sui neuroni perché non so che fare. O viceversa, potrebbe essere una corrente dovuta a un altro neurone che “parla”, quindi un qualche processo di cui vedremo (e forse con Zoli state già ampiamente esplorando) della neurotrasmissione, conversazione... La situazione fra segnali elettrici in chimici, e da chimici in elettrici di nuovo.

Quindi o scrivete queste equazioni invocando la conservazione della carica (quindi l'equazione del bilancio della carica), oppure guardando questo circuito scrivete (come fecero Hodgkin e Huxley) l'equazione differenziale che descrive l'andamento nel tempo di questo potenziale ai capi della membrana. Alla fine, ai capi del condensatore. Potrei dire ai capi della conduttanza sodio, però visto che sono in parallelo... Simile al caso di un RC in cui era la capacità, il condensatore, ad avere in qualche modo memoria. Come in questo caso biologico, è la capacità che rende ragione della dinamica, del fatto che le grandezze non cambino istantaneamente ma abbiano un'inerzia.

Quindi sia che sia un sistema idraulico, meccanico, chimico, elettrico, biologico, c'è sempre un'inerzia. Nulla, anche se siete Schumacher, funziona che voi cambiate istantaneamente. Nulla in natura ha delle transizioni istantanee, perché tutto ha una certa latenza, dinamica, inerzia. E questa è un'inerzia elettrica, quella dovuta al caricare e scaricare il condensatore.

Quindi potete fare o quell'approccio [bilancio di carica], o qui [analisi circuitale], utilizzando le equazioni costitutive dei singoli componenti. Ma principalmente fate **Kirchhoff a questo nodo** [intracellulare], scrivendo che la corrente totale... questa corrente totale è zero.

$$I_{tot} = 0$$

$$I_C + I_{Na} + I_K + I_L - I_{ext} = 0$$

Quindi 0 è la somma di tutti questi termini: sodio, potassio, alla fine questa somma qua, più il termine di corrente esterna. In realtà **meno** [I_{ext}], perché va con il segno opposto. Quindi qui l'ho scritto con il più [nella slide], ma proprio perché tutti questi [le correnti ioniche] dovrebbero essere al primo termine... questo meno [I_{ext}] rende ragione del fatto che sono orientati in una direzione [uscenti] e la corrente esterna è orientata in un'altra [entrante]. Vedete la corrente esterna *e vada* fuori *a* dentro. Io assumo di iniettare dentro delle cariche positive, perché vorrei io essere con una pipetta a far “sparare” (praticamente si dice così) sparare il neurone, iniettando una corrente che lo depolarizza, che lo rende più positivo dentro rispetto a fuori. Vorrei essere io a buttarci dentro degli ioni positivi.

La cosa che manca è il termine capacitivo (I_C), che pure lui però è un ramo come gli altri. Quindi dal punto di vista dell'elettrotecnica non devo fare un'eccezione. Qui è una corrente, poiché è una corrente fisicamente di spostamento, ma dal punto di vista elettrotecnico è una corrente di cui ho l'equazione costitutiva, che è questa qua: $I_C = C \frac{dV}{dt}$.

$$C \frac{dV}{dt} + I_{Na} + I_K + I_L = I_{ext}$$

Questi sono i termini delle singole conduttanze [ioniche]: $I_k = G_k(V - E_k)$

E questo è il termine di Nernst che, come vedete, nonostante sia stato derivato in condizioni [irrealistiche], mi continua a figurare nella descrizione matematica di quelle che sono le correnti o densità di correnti.

L'equazione di bilancio della carica quindi prende questa forma:

$$C \frac{dV}{dt} + G_{Na}(V - E_{Na}) + G_K(V - E_K) + G_L(V - E_L) = I_{ext}$$

Ripeto, questo G_{leak} (G_L) è un termine che convenzionalmente racchiude conduttanze generiche di cui non c'è una conduttanza selettiva. Nel modello di Hodgkin e Huxley ha ancora un altro significato leggermente diverso, però qui se volete potete aggiungere i rami per il calcio, per il cloro, per il magnesio, eccetera, assumendo che ci siano per ciascuno delle conduttanze specifiche di cui magari potete avere misurato o volete misurare quelle grandezze.

Analisi del Modello (Caso Passivo) Quindi, vedendo un'equazione del genere, la prima cosa che uno dovrebbe pensare è: “È un'equazione di quelle... ok, c'è il **meno** davanti alla stessa variabile di stato (V) che compare qui al primo termine sotto il segno di derivata. Quindi Michele Giuliano è tranquillo, non gli viene il panico. Quindi presumibilmente questa cosa qua non esplode.”

La prima cosa che potete pensare è: “Ma questi altri termini, che sono numerici, sono costanti nel tempo oppure no?” E_{Na} , E_K , E_L [leak]... potete pensare che sia il potenziale di equilibrio o di inversione nerstiano delle correnti cloro... sono numeri. Sperando che voi continuate a mangiare banane e cioccolata, presumibilmente le vostre pompe ioniche continuano a mantenere sempre il sodio attorno a +56 millivolt, il potassio a -80, -90, quello che era, il cloro a -68.

Restano ovviamente le **conduttanze** (G).

Se le conduttanze fossero **costanti**, io le potrei anche... potrei fattorizzarle, come ho fatto adesso. E vedete che faccio sempre la stessa cosa (adesso ovviamente non la farò più), in cui sono in una condizione per cui sono in una condizione molto più generale rispetto a prima, perché qui ho i fenomeni tempo-varianti.

$$C \frac{dV}{dt} + V \cdot \sum_k G_k - \sum_k G_k E_k = I_{ext}$$

Potrei adesso dire: “Studio le condizioni di *steady state*, di stato stazionario, di riposo”. Come faccio? Assumo che la variabile di stato (V) sia tempo-invariante, sia costante nel tempo. Ma se è costante nel tempo, vuol dire che la derivata di V nel tempo ($\frac{dV}{dt}$) è zero, perché è una costante, la derivata di una costante è zero.

$$0 + V_{rest} \cdot \sum_k G_k - \sum_k G_k E_k = I_{ext}$$

Quindi: zero = quella pizza lì. *Gratis o che, non lo so se.*

Quindi, facendo l'ipotesi che esista uno *steady state* (non so se esiste, però dico: ok, supponi che esista), qui metto 0. Il V_{rest} lo posso ottenere prendendo questa parte $[\sum G_k E_k]$, mettendola al primo membro (il segno meno va via), e poi divido ambo i membri per questa somma di conduttanze $[\sum G_k]$.

$$V_{\text{rest}} = \frac{\sum_k G_k E_k + I_{\text{ext}}}{\sum_k G_k}$$

Trovo l'equazione basata sulle conduttanze di *Goldman* [errato, GHK o Eq. del potenziale di riposo], Hodgkin e Huxley, che mi dice che il potenziale di riposo è la somma pesata dei potenziali di inversione delle singole specie ioniche.

Nota: quando lo fate, buttate un occhio sull'unità di misura. Avete, in quel caso, al numeratore avete (Conduttanza \times Millivolt), fortunatamente diviso Conduttanza (diviso la somma delle conduttanze, che è Conduttanza). Quindi Conduttanza e Conduttanza si semplificano e vi resta Millivolt. Quindi torna. Che $V = \dots$ [formula]... vi può aiutare notevolmente a buttare un occhio sull'analisi dimensionale.

Una cosa che potreste accorgervi da qui è che non è vero che V può essere la media pesata, a meno che voi non abbiate spento il vostro generatore di corrente ($I_{\text{ext}} = 0$). Se state iniettando una corrente, potreste avere un termine in più. Non è strano, perché alla fine un'equazione... questo è un RC. Se voi iniettate una corrente costante nel tempo, a un certo punto caricate o scaricate il condensatore e vi resta quello come valore di *steady state*.

Semplificazione: Il Modello RC Comunque, quello che voglio fare è immaginare che queste grandezze (G_k) siano **costanti**, perché vorrei capire qual è la dinamica. Veramente esplode? Non esplode? Com'è questa storia?

Quindi sono costanti. Se sono costanti, io le posso chiamare: * Questo $[\sum G_k]$ lo chiamo G_{tot} (o G grande). * E questo termine qui $[\frac{\sum G_k E_k}{\sum G_k}]$... lo chiamo E .

Questo è esattamente il potenziale di riposo dato dall'equazione di Goldman, Hodgkin e *Axley* [Huxley] (versione conduttanze, non versione permeabilità, non versione Goldman, non con i flussi Goldman). E G è la somma totale.

Di nuovo, quello che ho fatto è stato fattorizzare questa quantità che ho chiamato G grande.

$$C \frac{dV}{dt} + G \cdot V - G \cdot \left(\frac{\sum G_k E_k}{G} \right) = I_{\text{ext}}$$

$$C \frac{dV}{dt} + G \cdot (V - E) = I_{\text{ext}}$$

Qui ovviamente non c'era, ho dovuto moltiplicare e dividere per fare questa fattorizzazione. Visto che ho diviso... e prima l'avevo chiamato V_{rest} (potenziale di riposo), adesso lo chiamo E (comunque è un numero, supponete -70 millivolt).

Riesco a ottenere questa equazione qua, che è molto semplice, perché è la solita equazione differenziale, *boring*, noiosa e disgraziata, di cui si sa tutto.

$$C \frac{dV}{dt} = -G \cdot (V - E) + I_{ext}$$

A parte il fatto di questa $E - V$... [*Riorganizzando*] ... di nuovo, io sono contento che ci sia il segno **meno** V . Il fatto che ci sia questo termine, questo termine forzante (*driving force*), non è particolarmente complesso. Potreste fare un cambio di variabili, forse sarete stati abituati. Potreste chiamare questo $V - E$, lo potreste chiamare v piccolo. [*Il prof inverte la definizione nel parlato, ma il senso è traslare l'origine*] Perché se voi pensate di sostituire v piccolo qui... viene la stessa cosa... [*passaggi confusi nel parlato*] Matematicamente è noioso, è una cavolata, però vuol dire che fisicamente ho preso gli assi e li ho traslati in modo tale da far venire, anziché era -70 millivolt qui, ho preso l'asse delle X e l'ho spinto qui, così "0" per me è lì. E ottengo una cosa che è l'equazione di un **RC**, che forse avete visto in varie salse.

Risposta a un Impulso di Corrente (Step) Vorrei per una volta (e di nuovo spero che vogliate provare anche voi a risolverla a mano) [analizzare il caso] quando il valore della corrente esterna (I_{ext}) sia **costante**, o perlomeno **costante a tratti**.

Mi sto immaginando un caso in cui ho una cellula, ho un elettrodo che metto nella "pancia" di questa cellula con il solito filo di argento-cloruro, e qui dentro inietto una corrente che prima è zero. A un certo punto accendo il generatore di corrente, lo tengo costante per un po' e poi lo spengo.

E cosa potrà far mai questa cellula se è simile a un condensatore? Esplodere... o non esplode ve lo garantisco, perché grazie al cielo abbiamo visto che viene il segno meno, non ci sono errori e viene il segno meno.

Quindi risponderà all'input di corrente come un **circuito passivo**. Non ci sono transistori, non c'è nulla. C'è un dannato condensatore e una dannata resistenza. Il che vuol dire che la carica che voi mettete dentro si accumula sul condensatore (in questo caso si accumula dentro la membrana, state sputando tanti ioni positivi) e... *negativi*... non li può... si accumulano dentro. Però ci sono dei buchi, ci sono dei canali ionici, e quindi è chiaro che ci sarà una *pelle*...

Come il lavandino: in cui il rubinetto del vostro lavandino è questo generatore di corrente (I_{ext} , corrente d'acqua); il lavandino è la capacità (C), la conca che vi tiene la quantità; il potenziale (V) è l'altezza di liquido nel lavandino (questo si fa addirittura matematicamente, è esattamente equivalente); e il *leak* (G), quindi questa perdita, questo componente dissipativo, è il buco, perché non l'avete tappato. Se lo tappate mi fate dispetto perché non è più analogo a questo sistema. Ok, in quel caso non c'è l'analogo del potenziale di inversione (o potenziale di riposo, in questo caso).

Quindi questa situazione è probabilmente quella che vedete: cioè, ok, aprite il rubinetto, il buco non è particolarmente grande, il livello a un certo punto sale, si stabilizza e poi non sale più. Però dovete continuare a buttare acqua. Appena chiudete il rubinetto, il livello torna a scendere, per poi annullarsi completamente. Qui non si annulla. Per come è scritto questo termine qua [E],

ricordatevi che ho spostato gli assi, quindi eventualmente il potenziale sta decrescendo in modo esponenziale, dissipando l'energia... quello che è... in realtà va verso questo potenziale di riposo che è E .

Soluzione dell'Equazione Differenziale (RC) Di nuovo, anche qui lo faccio ma è una cavolata, concettualmente è la stessa cosa che ho fatto prima. Qui posso dire: "Ah, che bella equazione differenziale". La prima cosa che faccio è vedere quali sono i punti di equilibrio dinamico, non dal punto di vista biofisico. E dico: "C'è uno *steady state*?" Se c'è uno *steady state*, vuol dire che le grandezze non cambiano nel tempo. Se V non cambia nel tempo, la derivata è costante [nulla]. Quindi che succede quando metto qui 0?

$$0 = -G \cdot (V_{ss} - E) + I_{ext}$$

Per quale valore di V ho questo *steady state* (V_{ss})? 1. **Senza corrente** ($I_{ext} = 0$): Potete semplicemente... con un'equazione algebrica scoprire che nel caso della corrente esterna nulla, voi avete questo caso soltanto quando $V_{ss} = E$. 2. **Con corrente** ($I_{ext} = I_0$): E invece avete una corrente in più. Ok, V_{ss} dipenderà anche da questa corrente.

$$V_{ss} = E + \frac{I_0}{G}$$

Dipende da questa corrente sulla base della legge di Ohm. Infatti la capacità di membrana (C) non c'è più, sparisce perché compare solo qui [nel termine dV/dt]. Quindi potete avere un neurone o un lavandino grande come volete, alla fine allo *steady state* il potenziale non dovrebbe dipendere dalla capacità. Devo pensare, perché intuitivamente non lo direi, però qui è vero. Qui V dipende solo da I_{ext} ed E [e G]. Dipende dalla grandezza del buco (G) e non dalla capacità (C). La capacità vuol dire la dimensione del lavandino. Questo è il punto che non vi so dire. Penso che ve lo dico.

Quindi, la solita equazione differenziale.

$$C \frac{dV}{dt} = -G \cdot V + G \cdot E + I_{ext}$$

Potete mappare le cose se volete, a parte questo cambiamento di variabili che potrebbe rendervi la vita più facile. Se no, semplicemente expandete questo prodotto e avete $-G \cdot V$ (che è uguale a questo $-A \cdot x$ [notazione generica]). Notate, qui è sbagliato, dovrebbe essere f , questo f non è x . Quindi $-G \cdot V$. E poi avete un termine forzante, costante (B), che è $G \cdot E + I_{ext}$. Quindi non è un'equazione omogenea, è un'equazione con un termine extra. Non soltanto quello della corrente costante, ma il termine extra (a meno che non cambiate le coordinate). Quindi questo termine B è dovuto sia a questo I_{ext} sia a $G \cdot E$. Però nulla di male, nulla di male. Ok, scritto qua.

Carica del Condensatore (Iniezione di Corrente) Ok, l'esercizio è il seguente. Guardo questa equazione differenziale e questa è la corrente (ripeto,

costante a tratti). Vuol dire che io so la soluzione analitica, in teoria, a occhi chiusi.

Fase 1: $I_{ext} = 0$ (per $t < 0$) Quindi semplicemente lo guardo quando il termine forzante I_{ext} è costante ($I_{ext} = 0$). Se è costante, mi aspetto che sia costante da un bel po' di tempo. Ok, tipicamente dovrei dire che è da $-\infty$ che la corrente era 0. Però potrei dire: ok, a un certo punto la soluzione di questa equazione differenziale sarà la somma di due termini: uno esponenziale decrescente più un termine *forzante* [particolare]. E l'equilibrio qua è quello che viene dato quando non cambia più, il potenziale non cambia più e quando la corrente esterna è zero. Quindi qui metto zero ($I_{ext} = 0$) e poi dico qual è il potenziale di equilibrio. Questo $[dV/dt]$ lo metto a zero. L'unico è quando $V = E$. Quindi se anche nessuno mi ha fornito la condizione iniziale (di cui mi sono accorto adesso di averla fornita), che mi dice qual è in questo punto il valore di inizializzazione alla fine della carica sul condensatore... Posso in teoria, sapendo che questa condizione permane da sempre, assumere che ci fosse comunque un transiente. Finito il transiente, presumibilmente c'è un equilibrio. Qual è questo equilibrio? Quello che annulla il secondo membro (perché il primo membro l'ho messo a zero nell'ipotesi che esistano equilibri, esiste un punto di equilibrio).

Fase 2: $I_{ext} = I_0$ (per $0 \leq t < T_{pulse}$) Appena muovo I_{ext} da 0 a un qualche valore, che qui chiamo I_0 (supponete 100 pA, 50 pA, quello che volete; 50 pA potrebbe essere un ordine di grandezza ragionevole per una cellula relativamente piccola), ovviamente avete un'equazione differenziale in cui qui c'è stato un gradino. Dovete calcolare la risposta al gradino.

Ve la faccio breve: avete la condizione iniziale ($V(0) = E$). Avete la soluzione della somma di due termini: 1. **L'omogenea:** La soluzione dell'equazione differenziale omogenea associata ($C \frac{dV}{dt} = -G \cdot V$), che è un esponenziale con il termine all'esponente il **meno** che mi rende felice, poi G/C . Perché lo standard, l'etichetta di quell'equazione differenziale noiosa, prevede che qui a sinistra [davanti a dV/dt] non ci sia nulla. Quindi dovete ricondurvi (i matematici lo dicono bene) al caso... formale è $\frac{df}{dx} = -\alpha \cdot f$. Ok, qui non c'era niente [davanti a df/dx]. Quindi questo C lo devo prendere e dividere ambo i membri per C .

$$\frac{dV}{dt} = -\frac{G}{C}(V - E) + \frac{I_0}{C}$$

Quindi qui viene G/C . Che conoscete, perché se non fosse G ma fosse R , sarebbe $1/R$. Dividendo per C sarebbe il famoso $1/RC$, la **costante di tempo** ($\tau = C/G = RC$) di questa equazione. La soluzione omogenea è: $V_o(t) = K \cdot e^{-t/\tau}$
2. L'integrale particolare: Questo pezzo qui è dovuto al cosiddetto integrale particolare. Che risolvo... (come vi ho fatto, e se volete guardatevi quei pochi video di preliminari matematici)... non lo trovo con l'integrale di convoluzione, che sarebbe la tecnica. Io spero che queste cose qui le abbiate già un pochino orecchiate, dovrete aver fatto esami di matematica. Ma comunque, non lo faccio con l'integrale di convoluzione, ma lo faccio con un metodo euristico. Dico: "Ma qui, se questo termine è costante (il termine forzante è $(G \cdot E + I_0)/C$), se questo è un termine forzante ed è costante, allora anche la soluzione [particolare] sarà costante". Questo lo posso fare tipicamente se le soluzioni [forzanti] sono un termine sinusoidale, allora anche la soluzione sarà sinusoidale. Se il termine

ha una rampa, allora anche l'uscita avrà una rampa. Per un motivo tecnico, matematicamente (non so se sapete, ve l'hanno mai detto) si dice che una classe di funzioni, le funzioni cisoidali (che sono una combinazione fra esponenziali e sinusoidi), sono autofunzioni di questa classe di equazioni differenziali. Vuol dire che se le mettete dentro, le "sputano" circa uguali, come nel caso dell'algebra lineare, gli autovalori/autovettori. Ok, chiusa parentesi. Quindi se invece... quindi se seguite questa strada potreste dire: "Ok, V_p [particolare] è uguale a una costante". Quale costante? La chiamo Q , o la chiamo come volete. La sostituisco, quindi per ispezione diretta, la metto lì dentro e vedo quale deve essere il valore di Q . Visto che è costante, la derivata di questa Q è 0. Quindi questo termine $[dV/dt]$ si vanifica. *[Il prof torna all'equazione non divisa per C]...*

$$0 = -G(Q - E) + I_0$$

Ho un'equazione algebrica in cui devo scrivere $Q =$ qualcosa.

$$Q = E + \frac{I_0}{G}$$

La C non c'era... la C è andata via...

Quindi questa soluzione [totale] è i due termini: $V(t) = V_o(t) + V_p(t) = K \cdot e^{-t/\tau} + (E + I_0/G)$.

Tolto il cappello da matematico: di nuovo, qui è un termine con il meno e la t . L'esponenziale col meno va giù, quindi a un certo punto non c'è più. E quello che sopravvive è E (che era il potenziale di riposo) più (se I_0 è positiva) un qualche termine che dipende dalla corrente iniettata e dalla conduttanza.

Quindi mi immagino che... se deve arrivare... quindi questo è il valore [iniziale] E (potenziale di riposo). Io qui accendo la corrente. Mi aspetto che qui non so cosa succede, ma a un certo punto, dopo che i transistori sono esauriti, io ho questo valore qui, che è $V_{ss} = E + I_0/G$. Sembra la legge di Ohm e non è particolarmente complicato.

Però, matematicamente, rigorosamente, si può fare. Come abbiamo fatto: da qui (E) a qui (V_{ss}), come farà mai? Sicuramente non credo che faccia un arco di esponenziale così [concavo], perché dovrebbe essere un qualcosa che poi qui ha una discontinuità nella derivata prima, sarebbe strano. Presumibilmente fa una cosa del genere [convesso], che è la famosa **curva di carica** di un condensatore. Non lo sapete? Plottate questa equazione qui.

Quindi, identificando il valore della costante K con la condizione iniziale ($V(0) = E \Rightarrow E = K + V_{ss} \Rightarrow K = E - V_{ss} = -I_0/G$), avete formalmente quella che è l'espressione di questo arco di esponenziale:

$$V(t) = \left(E + \frac{I_0}{G} \right) - \frac{I_0}{G} e^{-t/\tau}$$

Però intuitivamente ci arrivavate più o meno uguali, ci arrivavate lo stesso.

Scarica del Condensatore (Fine Corrente) Questa soluzione vale però fin quando non staccate la corrente, fin quando non la mettete a zero (a $t = T_{pulse}$).

Fase 3: $I_{ext} = 0$ (per $t \geq T_{pulse}$) Quando la mettete a zero, l'equazione si trasforma: questo $[I_{ext}]$ sparisce.

$$C \frac{dV}{dt} = -G \cdot (V - E)$$

L'unica cosa che ereditate è il valore di **condizione iniziale** per il nuovo caso, dato da questa soluzione [della Fase 2] quando t è, [ad esempio], 100 millisecondi. Sarà quello che sarà, sarà magari $V(T_{pulse}) \approx E + I_0/G$.

Che cosa mai potrà fare questa cosa qua quando spengo? Ok, andrà a zero... scusate, **andrà a E** [il potenziale di riposo].

E questo tipo di... quindi la tangente all'esponenziale in questi due punti di attacco e stacco, si interseca dopo una costante di tempo ($\tau = C/G$) *gli assi orizzontali*.

Quindi è solo per dirvi: la **velocità** con cui questa cosa carica e scarica è **la stessa**. Ve lo dico perché vi farò vedere un sistema legato alla trasmissione sinaptica dove questo non avviene, dove carica e scarica non sono gli stessi. Ma qui sì. Qui l'equazione matematica resta la stessa, l'unica cosa che sparisce è questo termine qua $[I_0]$, che a un certo punto diventa diverso da zero (però sempre costante, se è costante so fare il metodo euristico e lo so gestire), e poi a un certo punto si spegne e si stacca.

Quindi qui si è staccato. Il valore di *questo...* so che è 0... [errato, $I_{ext} = 0$]. Tuttavia, se lo devo risolvere, lo risolvo come ho fatto prima. Di nuovo, anche qui c'è un termine forzante che è il solito $G \cdot E$. Soluzione dell'equazione omogenea associata ($K \cdot e^{-(t-T_{pulse})/\tau}$) più l'integrale particolare con il metodo euristico (che è E). Di cui però io adesso so qual è la condizione iniziale, che è quando $t = 100 \text{ ms}$ $[T_{pulse}]$ è questo valore qua che era prima, che è probabilmente $E + I_0/G$.

$$V(t) = E + (V(T_{pulse}) - E) \cdot e^{-(t-T_{pulse})/\tau} \quad \text{per } t \geq T_{pulse}$$

$E + I_0/G$ viene raggiunto matematicamente solo dopo un tempo infinito. Quindi se questo gradino di corrente $[T_{pulse}]$ è molto più piccolo rispetto a questo tempo C/G $[\tau]$, allora non arriverà allo *steady state*, non satura la curva.

Comunque, qui vi suggerisco di farlo una volta nella vostra vita.

Visualizzazione con Python (Google Colab) E adesso vi mostro, prima di chiudere (fra 5 minuti), un modo con cui avete a disposizione per "plottare" [disegnare] le funzioni. All'epoca mia c'erano i calcolatori grafici, forse voi non l'avete mai visti, erano delle calcolatrici fighe che avevano un display dove potevate mettere le funzioni. Oggi lo fate addirittura come una pagina web. Credo

nel modulo di *refresh* matematico c'è un sito dove potete mettere le espressioni di funzioni matematiche e farvelo plottare.

Quello che vi faccio vedere è un approccio leggerissimamente più complicato, però dovrebbe essere alla vostra portata. Questo lo facciamo la prossima volta... per poter prendere confidenza, plottare queste funzioni, i risultati di questa lezione.

L'idea è quella di andare sul sito del corso, risorse, *notebooks*, "To be or not to be...".

Questo, spero che voi sappiate, **Google Colab** è nel cloud. È una specie di macchina virtuale che Google mette a disposizione gratis con limitate risorse di calcolo, ma basta un dannato browser. Non serve che abbiate, che installiate sul vostro computer qualche cosa. E potete scrivere del codice.

Qui per esempio vi faccio vedere com'è. Scrivendo del **codice Python**, ho definito i parametri numerici necessari per farmi plottare l'**equazione di Goldman** (quella formula, non la chiamo orribile, è quella formula un po' fastidiosa che aveva gli esponenziali, le *capacità*... che aveva le *A*, le *P*, eccetera, eccetera, eccetera). Mi sono andato a guardare quali sono i parametri numerici, perché non mi ricordo a memoria quanto vale la costante di Faraday, non mi ricordo a memoria qual è la carica dell'elettrone (1.6×10^{-19} C), eccetera, eccetera.

E posso paragonare... (cosa che non vedo qui)... posso paragonare... ok qui, l'espressione. Posso plottare l'espressione del flusso della corrente (*J*) in funzione del potenziale (*V*). E dopo pochi istanti, usando una libreria di *plot* che dovrete conoscere (o vi converrebbe imparare perché è la più diffusa in *data science* e in qualunque tipo di possibile impiego che abbia a che fare con manipolazione e... rappresenta una delle più importanti manipolazioni di dati). Una è una libreria matematica che si chiama **NumPy** e l'altra si chiama **Matplotlib**.

Non si sta connettendo, ovviamente. Però io lo frego perché io ho già generato i grafici. E quindi avreste che per ogni singola specie ionica potete fare un grafico (questo perché *flickery*), in cui ho cambiato io con un ciclo **for** il potenziale da -100 a 50-60 mV, e ho plottato quello che è il valore numerico che l'equazione di Goldman oppone l'approssimazione ohmica mi dicono.

Senza sorpresa, l'**approssimazione ohmica è una retta** (grazie) e [è] tangente alla curva dovuta a Goldman esattamente nel punto di... dov'è il punto di inversione... scusate, il potenziale di Nernst, di equilibrio o di inversione per quella specie ionica. Per il potassio è -80 mV, per il sodio è +50 mV, eccetera, eccetera.

Vedete che anche per il potassio e per il sodio, non allontanandosi particolarmente da questo range grigio (che è questo intervallo in cui il potenziale d'azione avviene, quindi presumibilmente quello che conviene tenere conto), vedete che già l'approssimazione ohmica non è così un granché. A me disturba che la corrente sodio (che però ve la farò vedere... ve l'ho fatta vedere come ohmica) è a -50 o -70 millivolt (che è il potenziale [di riposo]), sia già fortemente diversa nelle due approssimazioni, Goldman o Ohm. Per il calcio è totalmente sballata, a meno che voi non siate in un intorno molto piccolo.

Al di là di Goldman, vi sto invitando a usare Python. Non per fare programmi di

database, semplicemente per creare una funzione di Python che, data una variabile (per esempio t), io metto dentro Python `1 - exp(...)`, metto i parametri, qui metto t , e poi la plotto e ho il grafico.

Quindi anche se in parte vi disturba la conoscenza o la richiesta di competenza analitica della soluzione analitica, avete la possibilità (e dovete in questo modo fare un minimo di pratica con Python) di usare Python per plottare della roba. Avete quell'esempio del notebook che vi plotta Goldman, ma è semplicemente una funzione matematica che viene espressa come una funzione di Python e lo plotto con un semplice comando `plot`.

Finisco semplicemente dicendovi: molto di questo codice è il mio OCD, la mia sindrome compulsiva, di fare le cose carine. Per cui: “Assolutamente, aspetta, mettiamo il grigio”, “cambia il limite degli assi in modo tale che sia zoomato opportunamente”, “fai una parte che sia colorata”. Però sono tutte cose, queste cose qui, che sono praticamente irrilevanti all'inizio. E oggi potete tranquillamente chiedere a ChatGPT, o Claude, o Copilot, o Gemini, di aiutarvi a scrivere quel pezzo che alla fine è sempre lo stesso, di cui: “Come faccio a cambiare lo spessore della linea?”, “Come faccio a cambiare il colore?”.

Eccitabilità Neuronale: Basi Ioniche

Allora, oggi vorrei continuare l'argomento sull'eccitabilità neuronale e aprirò probabilmente alla fine, o comunque nella seconda ora, una parentesi, un dei preliminari sulle eccitabilità. Trovate tutti e due i file delle slide separatamente, li trovate già sul sito, sul repository. Vorrei partire da quelle che l'altra volta ho menzionato sarebbero state delle intuizioni degne da premio Nobel. In effetti, anche se non ho la certezza che questo sia quello che ha motivato, alimentato l'intuizione corretta di **Hodgkin** e **Huxley**, due elettrofisiologi premi Nobel negli anni '60 che negli anni '50 hanno chiarito le basi molecolari, se volete, dell'emergenza dei segnali elettrofisiologici, del potenziale d'azione in particolare.

E vorrei farlo considerando un asse: questo è l'asse del potenziale di membrana, quindi sto pensando al potenziale elettrostatico dentro rispetto a fuori. Fuori per me è zero convenzionalmente, perché sapete che qualsiasi altra scelta è possibile; io scelgo quella di mettere il riferimento nel medium extracellulare a zero. E vi ho raccontato l'altra volta che per le considerazioni fatte esistono delle conseguenze specifiche della diversità di concentrazione ionica delle diverse specie ioniche che sono dentro e fuori dalla membrana. Per esempio, il **sodio** dov'è più concentrato? Fuori, grazie. Il **potassio** invece è il contrario. Il **cloro** invece è pure lui concentrato molto all'esterno, però ricordatevi che dal punto di vista della valenza, avendo un segno negativo, conta -1 nel contesto del potenziale di Nernst o potenziale di inversione a cui sto pensando.

Perché in qualche modo, come ho fatto alla fine o a metà della lezione della settimana scorsa, sto pensando che il sodio, essendo concentrato... quindi di nuovo sto pensando alla funzione $\log(x)$, da qualche parte in Nernst, nel potenziale di Nernst, c'è il rapporto fra la concentrazione... scusate, il logaritmo fra la concentrazione, fra il rapporto delle concentrazioni, e mi dimentico ma credo che sia qui *out* e qui sia *in*, perché infatti per il sodio so essere positivo. Vi ricordate grosso modo che valore aveva? Era positivo perché il logaritmo è positivo quando

l'argomento supera l'unità, e l'unità è superata quando la concentrazione fuori è maggiore dalla concentrazione dentro. E grosso modo vi ricordate che valore aveva? Che cos'erano? Millivolt, quindi è quassù, non importa, l'importante è che sia abbastanza elevato. Mentre per il potassio, vi ricordate, la situazione è inversa, quindi sicuramente è un valore negativo ed era un valore che era attorno a -80 mV . Forse ricorderete, anche per il cloro, ho mostrato in modo forzato, forzoso... frustrazione perché non era esattamente quel -70 mV a cui io ero alla ricerca.

Quindi avete in qualche modo un potenziale di inversione delle correnti potassio che è molto basso (E_K) e un potenziale di inversione delle correnti sodio (E_{Na}) che è molto alto, molto depolarizzato e molto iperpolarizzato. E se immaginate nel tempo di prendere una cellula eccitabile e in qualche modo, per esempio, siete voi che iniettate una corrente ionica all'interno della membrana, quindi rendete la membrana più positiva... perché siete voi, per esempio, che con una pipetta di vetro riempita di una soluzione di cloro e avendo questo famoso filo di argento clorurato, che vi ricordo è quello che rende possibile in qualche modo in prima approssimazione lo scambio fra un mondo, quello degli elettrodi metallici che hanno portatori di carica elettroni (sto pensando anche ai semiconduttori, lacune, ma comunque molto diversi da quelli che sono i portatori di carica in un elettrolita o comunque in una soluzione acquosa con ioni carichi). Se fate questo e date questi *step*, questi gradini di corrente, vi aspettate che al contrario di una cellula passiva, di una cellula che non è eccitabile, in cui la reazione è noiosa, è la reazione di un **RC**, una carica e scarica con degli archi di esponenziale. L'abbiamo fatto insieme e spero che qualcuno di voi dia un seguito alle mie richieste quando vi dico "provate a farlo per esercizio", alla fine è Analisi 1 o comunque è matematica elementare di soluzioni di equazioni differenziali.

Sapete che la curva di carica in questo caso non somiglia a questa. Questo è uno *sketch*, non è esattamente la forma di un potenziale d'azione ma ci assomiglia moltissimo, in cui ok c'è una curva di carica ma poi c'è una specie di fenomeno che non è descritto da quella fisica, biofisica di un RC. E la cosa che uno nota è che bene o male questo comportamento è sempre comunque compreso fra questo valore massimo attorno a $+50 \text{ mV}$ (addirittura il calcio, il potenziale di inversione Nernstiano del calcio, essendo la concentrazione dentro praticamente zero e fuori di qualche millimolare, è ancora più elevato, comunque 100 mV o 50 mV qui) e qui in basso -80 mV .

Quindi questo *range* potrebbe far pensare, e ha fatto pensare menti brillanti che ci sono arrivate quando anche dal punto di vista sperimentale la possibilità di accedere sperimentalmente a un preparato biologico come un neurone, una cellula corticale di un ratto era sicuramente molto difficile se non impossibile. Hanno basato le proprie intuizioni su queste considerazioni, quindi sulla biofisica delle membrane e sull'osservazione che a riposo, a meno che le cellule non siano morte, tutte le cellule sono polarizzate, sono negativamente polarizzate, e quelle eccitabili possono depolarizzarsi, cioè perdono la polarizzazione elettrica negativa. È tutto un gergo antiquato, se volete, perché non dire "il potenziale è negativo, diventa positivo"? Vabbè, ok, dicono "la membrana è polarizzata", il che non è banale, vuol dire che evidentemente, l'abbiamo cercato di eviscerare nelle ultime settimane, evidentemente c'è una qualche spesa energetica che cambia la concentrazione, la distribuzione delle concentrazioni ioniche.

Le cellule eccitabili hanno in più il fatto che questo potenziale elettrostatico cambia rapidamente, si depolarizza, diventa positivo, addirittura si inverte, non solo si perde la polarizzazione, al contrario diventa positiva, però comunque non supera i valori che sono grossomodo quelli del potenziale di inversione dovuto al sodio e al calcio. E alla fine si repolarizza e addirittura iperpolarizza, perché vedete che va più sotto, più in giù rispetto al valore di riposo e anche in questo caso non è che va a un valore arbitrariamente negativo, tocca quel valore.

Allora perché le intuizioni da premio Nobel? Perché il punto di arrivo di tutta la parte pregressa che ho intitolato “neuroelettronica” ci ha portato a formulare un’equazione relativamente semplice perché è formulata nel caso ohmico, sebbene sappiamo come scriverla nel caso più generale in cui è sempre un’approssimazione (sto pensando all’equazione di Goldman e all’uso che si fa di quell’equazione di Goldman per scrivere i termini di correnti ioniche quando non vogliamo la semplificazione, la semplicità dello stile dell’approssimazione ohmica). Ma quando ci accontentiamo dell’approssimazione ohmica, possiamo di fatto scrivere che il potenziale di riposo (adesso magari rilasso, tolgo la parola “di riposo”, ma comunque in certe condizioni, se c’è *steady state*, se è a riposo, non all’equilibrio, perché non auguro a nessuno la morte termodinamica) può essere considerata la somma pesata dei potenziali di riposo o di inversione Nernstiani delle singole specie ioniche, quindi pesato con le conduttanze della membrana per ciascuna specie, diviso la somma totale delle conduttanze.

$$V_{rest} = \frac{G_{Na} \cdot E_{Na} + G_K \cdot E_K + G_{Leak} \cdot E_{Leak}}{G_{Na} + G_K + G_{Leak}}$$

Vi rinnovo di buttare un occhio, forse non ve lo devo dire, voi siete già molto esperti, alle unità di misura. Se questo mi aspetto che sia millivolt, perché qui io misuro millivolt, ho un oscilloscopio, ho un tester che vedo millivolt, il potenziale elettrostatico... qui butto un occhio che ovviamente $G \cdot E_{Na}$ deve essere... non è millivolt, è una corrente (millisiemens per millivolt) deve essere diviso per millisiemens, quindi mi torna che ci sia un bilancio, un’espressione del genere, perché almeno dimensionalmente torna, al di là del fatto che l’abbiamo derivata assieme.

Fissando intensamente quell’espressione e ricordando l’idea di quello che è la **media pesata**, forse potreste avere come intuizione sviluppato quella del baricentro: se io in qualche modo porto gran parte della mia massa, la sposto, la posizione di questo baricentro si muove. In questo caso se io porto... è l’unica cosa che posso fare per portare, dato che non cambio le concentrazioni ioniche (di sicuro non le cambio così rapidamente come in un millisecondo, non riesco a spostare il sodio che c’è fuori, lo metto dentro e viceversa), quindi la cosa che presumibilmente cambia, come intuito all’inizio del secolo scorso, è che le **conduttanze** possono variare, la permeabilità ionica della membrana possa variare.

Allora potreste vedere che a seconda di quello che è il valore numerico di questi G_{Na} , G_K , G_{Leak} , il potenziale, per esempio, di riposo può pendere più per E_K e E_{Leak} (−80 o −65, quello che è) piuttosto che essere +50. Se ci fosse anche il calcio sarebbe ancora più evidente. Quindi fissando questa equazione potreste intuire che se le cose iniziano ad andare rapidissimamente, che le tracce schizzano

in meno di un millisecondo e fanno 100 mV di escursione su e giù in una frazione di millisecondo, evidentemente qualcosa cambia a questi coefficienti: G_{Na} , G_K e G_{Leak} .

Quindi quello che sto facendo è, di nuovo, invocare che sia lo *steady state*, anche se in generale voi mi dite “ma non è lo *steady state* perché la cellula sta sparando, sta emettendo dei potenziali d’azione”. Però se me lo consentite, comunque questo mi serve funzionalmente per capire che cosa può cambiare.

Quindi questo era quello che avevamo chiamato **equivalente di Thevenin** o comunque il modo per cui, ipotizzando che la membrana fosse passiva, io potessi per semplicità scrivere un unico termine di conduttanza e un unico termine di potenziale di riposo, studiando il limite, l’equilibrio, lo *steady state*. Quindi assumendo che, per esempio, per T che tende all’infinito, senza avere termini di corrente (o mettendoci termini di corrente ma che siano stazionari), a un certo punto il potenziale tenda ad avere un valore fissato. E questo valore fissato dipende dalla combinazione di questi potenziali Nernstiani e da questi valori, G_{Na} , G_K e G_{Leak} .

Se amate la matematica, o se invece amate di più se siete visuali, potreste paragonare quel caso in cui quello che ho fatto è stato mettere a zero G_{Na} e G_K . Se lo faccio, è come se... conduttanza zero vuol dire che non passa più corrente, vuol dire resistenza infinita. E l’equivalente circuitale di un resistore a resistenza infinita, o di un resistore a conduttanza nulla, è un **aperto**, un circuito aperto. Una roba che ha due terminali, uno qui e uno lì, e lì non c’è niente, non ha neppure un condensatore, non hanno nulla, la corrente non passa. Un circuito aperto. Però da questa espressione, matematicamente è più facile, perché G_{Leak} e G_{Leak} si semplificano, visto che anche al denominatore G_{Na} e G_K sono andati a zero. E quindi è ovvio che è tutto spostato su E_{Leak} , che vi ricordo è semplicemente un modo facile per accorpare tutte le conduttanze ioniche che non sono selettive, non sono particolarmente selettive, sono in parte sodio, in parte potassio, quindi con una permeabilità mista. E potete anche pensare che sia soltanto la conduttanza dovuta al cloro, non è così fondamentale.

Basti sapere che questa quantità è dell’ordine di -65 mV, -70 mV, non importa. Graficamente ho strappato quei resistori e se guardo questo circuito, anche se non ne capisco nulla di elettrotecnica, posso pensare che da qui a qui il condensatore in teoria lo posso staccare. Perché in un regime come sto studiando, in cosiddetto **regime DC** (un regime cioè in cui le grandezze non variano più nel tempo; DC tradizionalmente starebbe per *Direct Current*, corrente diretta, ma ha preso come significato quello in cui i segnali in un circuito elettrico non cambiano più nel tempo), al contrario di AC (regime AC, che di nuovo vorrebbe dire *Alternating Current*, corrente alternata, ma alternata perché necessariamente *time-variant*, variante nel tempo), mentre DC vuol dire stazionario, vuol dire costante.

E questo è un caso costante. Sapete che l’equazione del condensatore, l’equazione costitutiva del componente condensatore, che alla fine sopravvive qua, $C \frac{dV}{dt}$... diventa $I = 0$ perché quando V è costante (per questo che si dice che il condensatore “taglia” la corrente continua, perché quando le grandezze diventano costanti, la derivata è nulla), resta $I = 0$. E $I = 0$ è l’equazione costitutiva del circuito aperto, che vuol dire “non scorre corrente”.

Quindi fai pure Kirchhoff se vuoi, tanto lì la corrente non scorre, è un ramo che non c'è. Quindi è per questo che ho messo questo condensatore più in grigio o diciamo evanescente. Quello che resta è che fra qui e qui c'è una caduta di potenziale che è quella del potenziale di membrana in queste condizioni, quando le conduttanze sodio e potassio sono nulle. Quindi è come se quelli (sono canali ionici) è come se siano strizzati, se siano chiusi, sono porte chiuse. Gli ioni sodio e potassio non passano più, gli unici che passano, passano da quel G_{Leak} . E non importa quanto valga G_{Leak} , se G_{Leak} predomina rispetto agli altri vince E_{Leak} e il potenziale è uguale a E_{Leak} . Lo volete vedere dal punto di vista circuitale? Fra qui e qui la caduta di tensione è in teoria legata alla somma (Kirchhoff, legge delle maglie), è legata alla somma fra questo generatore ideale di tensione e la caduta ai capi di questo resistore. Ma la corrente qui è zero (potete fare Kirchhoff assumendo di non iniettare della corrente, questa corrente è zero), quindi qui la caduta di tensione non c'è. Quindi fra qui e qui è la stessa caduta di tensione che c'è per quel generatore di tensione. Due modi (se vi piace più l'algebra, nemmeno la matematica, l'algebra, oppure siete persone visuali per cui avete staccato dei rami e resta questo, vince questo) probabilmente riuscite a capire dove voglio andare a parare.

Quindi in questo contesto, se io lascio le cose come stanno, il potenziale di membrana ai capi di quel condensatore resta attorno a E_{Leak} . Se adesso supponete che io abbia G_{Leak} (quindi questo ramo qua lo lascio com'è, non lo tocco, assumo cioè che sia passivo), mentre il ramo (quindi quello questo) che rappresenta la permeabilità ionica per i canali che sono selettivi agli ioni sodio, adesso dico che non è più zero. Sto pensando di aprire questi canali, non vi dico quanto li apro, non è così importante.

Di nuovo, matematicamente voi vedete che qui è la media pesata fra queste due quantità, +50, +60, non mi ricordo quant'era, +56 e passa (dipende dalla specie naturalmente), ma comunque è dell'ordine di 50 mV, e questo valore qui, -70 mV. Quindi è chiaro che il potenziale è intermedio. E quanto più questa somma pesata è sbilanciata rispetto a questo valore E_{Na} , tanto più il potenziale di membrana tenderà ad avvicinarsi a E_{Na} . Infatti quello che succede se io lascio le cose così e permetto al circuito, o a questa equazione, di raggiungere (questa equazione qui) il nuovo *steady state*, con questa animazione strabiliante, è come se mi aspetto che con quella che è la sua dinamica (dinamica dovuta alle costanti di tempo in gioco, a qualunque cosa voglia dire $\tau = RC$, costante di tempo... ovviamente RC , ok, sì, la capacità è fissata, la conduttanza qui diventerebbe... sarebbe C/G la costante di tempo, G ovviamente sta cambiando nel tempo), quindi il modo con cui questo sistema si rilassava a E_{Leak} un attimo fa può essere diversa con il modo con cui adesso la dinamica temporale con cui, la rapidità con cui va verso quell'altro, questo nuovo potenziale di riposo. Quindi è chiaro che va verso... non ci arriva perché questo G_{Leak} non è 0. Se fosse 0 sì, questo termine non ci sarebbe più, non ci sarebbe più al denominatore, qui si semplificherebbe G_{Na} . In realtà è un po' sotto, dipende da quanto G_{Na} è grande. Tuttavia va su.

Adesso vi faccio vedere che cosa succede, l'altro caso: se G_{Na} lo spengo e accendo G_K . Quindi ho strappato questo ramo, ho messo a infinito la resistenza oppure a zero la conduttanza. Qui succede la stessa cosa, adesso ho la media pesata fra -80 e -70 mV, ok, andrà verso -80 mV. Di nuovo, dipende dai valori

numerici. Di nuovo, con questa animazione fantastica, la traccia va giù, con la sua dinamica. Di nuovo, la dinamica dovuta praticamente a un RC. Di nuovo lo ripeto, le costanti di tempo ovviamente dipendono dalla capacità, ma queste conduttanze cambiano nel tempo, quindi può essere che la costante di tempo non sia strettamente fissata. In altri termini la velocità con cui posso andare a un qualche *steady state* (non è detto che esista questo *steady state*, ma se esistesse nelle condizioni che vi ho detto, cioè io strappo un elemento e poi aspetto anche un tempo infinito, ho pazienza) potrebbe essere diversa, potrebbe essere molto più rapido andare su o piuttosto che andare giù, o vice versa.

Per adesso farò la cosa seguente: tolgo di nuovo G_K , metto G_{Leak} e da questa condizione iniziale di nuovo il sistema evolve. Vedete che semplicemente con un'osservazione stupida sul concetto di media pesata, immaginando che questi coefficienti, questi pesi, abbiano un significato biologico (sono biofisicamente le permeabilità, ma devono avere a che fare con qualche meccanismo che permette agli ioni di attraversare la membrana). Attraversare la membrana in modo passivo, nel senso che non è contro il gradiente elettrochimico. In altri termini, visto che c'è tanto sodio fuori, se io apro la porta per pura diffusione entrerà un po' di sodio. Questo è quello che chiamo corrente di spostamento, ma passiva, non è contro, non è se io ho così tanti ioni sodio fuori che devo spendere di energia per buttarne altri contro quello che sarebbe il gradiente spontaneo.

E in questo modo qui, in qualche modo, ho intuito che se la forma del potenziale d'azione è che parte da qui, va su, rallenta, si ferma, va giù, però va molto più giù del valore a cui era prima e poi si ferma, rallenta, si ferma e poi ritorna su, vuol dire che in qualche modo deve esserci una qualche sequenza di cambio della permeabilità. E non... questo cambio di permeabilità non può avvenire allo stesso momento. Non posso avere che il sodio e il potassio si aprono (i canali sodio e i canali potassio) si aprono in modo istantaneo, sincrono, perché altrimenti non avrei questo spazietto. La tipica durata di un potenziale d'azione è dell'ordine di un millisecondo, uno o due millisecondi, dipende dalla specie. I potenziali d'azione cardiaci, credo che li vedrete, se non li avete già visti, sono molto più lunghi. Idem i potenziali d'azione delle cellule beta pancreatiche, che non vedrete mai, ma ve lo dico io perché li ho studiati e sono più spanciati, più lunghi.

Vi dirò, vi darò un paio di idee del perché: coinvolgono una qualche sequenza di cambi di permeabilità e ovviamente questi cambi di permeabilità devono essere rapidi. Se il potenziale di membrana all'inizio in questa fase che viene spesso chiamata **upstroke** (la fase crescente del "colpo", è brutto in italiano, ma in letteratura si legge *upstroke*), se questo avviene in una frazione di millisecondo vuol dire che questi canali sodio devono essere in grado di aprire le porte molto rapidamente.

Ora Hodgkin e Huxley vi ho detto non avevano idea del fatto che queste conduttanze ioniche, queste proprietà di permeabilità della membrana fossero concentrate nello spazio, fossero discrete e fossero concentrate. Ve l'ho già raccontato che sono delle proteine, vi farò vedere qualche animazione, ho scoperto su internet un tizio che usa un software di modellazione tridimensionale tipico dei videogame (ve l'ho messo su Teams, per chi usa Teams per leggere gli annunci avrà visto il video). Sono fisicamente dei pori fatti da delle proteine che cambiano la loro conformazione tridimensionale anche in modo molto rapido. Non è

banale che questo cambio di conformazione e conseguente formazione di un poro per far passare degli ioni, come se fosse l'apertura di una porta e far passare degli ioni... non è banale che questo avvenga in modo così rapido.

E potreste pensare che alcune cellule non hanno questo. Sebbene abbiano degli ioni potassio, potrebbero non avere queste proprietà di permeabilità della membrana per gli ioni potassio così rapida (un po' ritardata per la verità, ritardata nel senso che accade con un certo ritardo), potrebbe semplicemente non avvenire. Potrebbe semplicemente il recupero da questo punto che si chiama **overshoot** (non lo so tradurre in italiano, *overshoot* perché è come se fosse una extra elongazione, uno sparo oltre il limite, *overshoot* perché non solo raggiunge lo zero ma eccede lo zero. È come nella teoria del controllo, quando c'è un eccesso nel controllo di una variabile, per esempio, di posizione: vorrei che arrivasse fin qui, eccede e poi eventualmente ritorna indietro). In alcune cellule potrebbe essere che il ritorno al potenziale di riposo coinvolga solo queste conduttanze che ci sono sempre, non le ho mai spente.

Quindi l'unica cosa che cambia è che qui il sodio, o la permeabilità che fa la parte del sodio... vedete che io sto parlando di sodio che è a +50 mV, ma se voi aveste per esempio il calcio che è a +120 mV, dal vostro punto di vista oggi non cambierebbe granché, perché ancora non sapete che esistono dei canali calcio, dei canali sodio e che dal punto di vista delle cinetiche alcuni sono più veloci degli altri. Quindi, in effetti, il potenziale cardiaco delle cellule dei cardiomiociti è spanciato perché ci sono canali calcio, non è sodio, è il calcio l'attore principale, che si aprono e si chiudono. Qui sembra che, per come ve lo sto raccontando, che è la parte nel caso delle cellule nervose, avete un sistema per cui non solo ho un meccanismo per far schizzare il potenziale in alto, ma ho un altro meccanismo per farlo tornare rapidissimamente in basso. Potrei farne a meno, ma allora sarei come le cellule del cuore, dove non c'è coscienza, pensiero, emozioni eccetera, dove questo avviene semplicemente per le proprietà passive RC, per cui da qui piano piano il potenziale tende al potenziale di riposo.

Hodgkin e Huxley sono andati oltre e hanno cercato di spiegare meccanicamente come possa avvenire questa cinetica di quello che loro hanno chiamato **gating**, dalla parola inglese "cancello", per cui è l'apertura e la chiusura di una porta. Sebbene loro nel '52 hanno in qualche modo addirittura fornito sperimentalmente l'evidenza che fossero più **specie ioniche** coinvolte, più cambi di permeabilità, non era un generico cambio della permeabilità come proposto qualche 50 anni prima, o verificato sperimentalmente una ventina d'anni prima. Loro hanno detto "no no, sono diversi ioni e la membrana è specificamente permeabile in modo diverso e istante per istante la permeabilità non è la stessa a tutti gli ioni".

Loro però non avevano potuto misurare il fatto che questi canali ionici fossero delle porte, dei pori, pensavano che fossero delle strutture cariche elettricamente (adesso vi dirò perché avevano questa idea che fossero delle particelle cariche), intercalate nel doppio strato fosfolipidico e in qualche modo più affini a un **trasportatore**. Una roba che afferra uno ione da un lato, ovviamente per passarlo attraverso la membrana deve essere, come vi ho detto, fortemente idrofobica e quindi nello strato lipofilo all'interno della membrana... per portare uno ione da dentro attraverso questo strato e fuori ovviamente deve essere spesa un'energia.

Loro pensavano che fosse un trasportatore e pensavano per un motivo che sarà chiaro che questo trasportatore avesse una componente di carica elettrostatica, tanto che quando il potenziale per i fatti suoi si depolarizza o iperpolarizza, queste particelle cariche (visto che sono loro sedute a metà del *sandwich* della membrana e il potenziale della membrana si sente attraverso la membrana) sentissero un campo elettrico e quindi una forza che li spingesse da un lato e dall'altro della membrana.

Per farla breve ci sono andati molto vicini, ma non avevano ovviamente gli strumenti sperimentali per poter dire “no, guarda che non è una proprietà diffusa, non ci sono dei trasportatori, sono dei pori e sono discreti” e, vedremo dopo, sono pure così piccoli che sono **stocastici**, sono rumorosi, funzionano in modo aleatorio. Non è una porta grande così, non c'entra nulla la meccanica quantistica, ma sono così piccoli che risentono di quello che è le condizioni di un bagno termico a temperatura fisiologica, 37 gradi, in cui c'è agitazione termica.

Quello che fecero, di fatto, fu di proporre un **modello circuitale equivalente**, e vi ripeto, questo mi ha sempre stupito, non erano ingegneri, erano fisiologi e non utilizzando calcolatori digitali, ma utilizzando calcolatori meccanici hanno potuto risolvere le equazioni differenziali (quattro) che hanno proposto. Voi ne conoscete già una che è l'equazione del bilanciamento della carica elettrica. E hanno paragonato quello che era la loro registrazione sperimentale di un potenziale d'azione che vedete, sì, 0 è il loro riferimento, di nuovo è semplicemente riferimento, hanno traslato gli assi e li messi a zero, ma qui parte da -70 mV, va su, si depolarizza e poi si iperpolarizza e poi impiega un certo tempo. Questo e questo grafico qua sono due diverse scale temporali, vedete che uno è fra 0 e 2 millisecondi, invece qui è *zoom out*, è fra 0 e 10 millisecondi. Quindi vedete che va rapidamente su e giù, capite perché l'hanno chiamato **spike**, perché è molto appuntito.

E questo è il modello matematico. E se non vi avessi detto chi è chi, avreste potuto dire “boh, sì, anche questo di sotto, cioè, sì, fa la stessa cosa”. Non è perfettamente identico, però c'è un po' che negli anni '50... e questo tipo di formalismo matematico e questo tipo di descrizione matematica delle proprietà di permeabilità lo continuiamo a usare fino ad oggi, 70 anni dopo.

Quello che vi ho raccontato prima corrisponde alla realtà fenomenologica di come funzionano questi canali sodio e potassio. Oggi sappiamo che sodio e potassio funzionano in modo **voltaggio-dipendente**. I canali stessi hanno al loro interno una porzione del dominio della loro conformazione tridimensionale che ha una carica elettrica netta. Tutto è elettronico, sono d'accordo, però sapete che la distribuzione di carica in una sequenza di aminoacidi, in una proteina, dipende dalla conformazione, dipende se o meno neutralizzata da altre molecole. Questi hanno una sensibilità al potenziale transmembrana, al potenziale elettrostatico ai capi della membrana.

E entrambi, questo non dovrebbe farvi confondere, **entrambi si aprono** quando il potenziale di membrana diventa più positivo, quando si depolarizza. Adesso vi faccio vedere questa specie di cartone, questa animazione. Vi rammento che c'è tanto sodio fuori e ce n'è poco dentro, e c'è tanto potassio dentro e ce n'è poco fuori. Quindi se io ho queste porte che sono selettive, quale che sia il motivo... appena si aprono, si verifica il flusso di corrente di trasporto in accordo col

potenziale elettrochimico. Quindi esce un sacco di potassio ed entra un sacco di sodio gratis. Non è perché c'è una differenza di come questi due si attivano oppure passano da uno stato chiuso a uno stato aperto. Appena passo in uno stato aperto la permeabilità è non nulla, la conduttanza è non nulla, non è più zero e quindi passano gli ioni che devono passare. Mi pare che gli ioni sodio siano quelli verdi, passeranno da fuori a dentro, e quelli arancioni che sono gialli, quello che è, da dentro vanno fuori.

Il sodio fa eccezione, vi chiedo (lo faccio andare diverse volte) di buttare un occhio a questa specie di **ulteriore porta**, è come se fosse una porta che ha un doppio... e ce l'ha solo il canale sodio, non il canale potassio. Buttate un occhio anche a questo oggetto qua mentre il potenziale d'azione viene evidenziato in qualche modo in tempo reale sulla base della ridistribuzione di questa carica ai capi della membrana. Non sto dicendo che cambiano gli equilibri, questi restano sempre uguali, ma se io apro per un momento entra un sacco di sodio, ma non è detto che ho fatto sì che il bilancio fra dentro e fuori di sodio sia alterato e sia diventato... continua a mantenersi. La quantità, diciamo, lo sbilanciamento è tale per cui se voi aprite per un po' (vi faccio vedere un esercizio prima), non è che scombiniate drammaticamente i flussi ionici. Quindi voi mangiate banane e cioccolata per mantenere quei gradienti di concentrazione ionica che, lasciando la porta aperta per un bel po', per diverse decine di minuti (vedrete), allora inizierebbero a cambiare un pochino le concentrazioni.

Questa è l'animazione. Per qualche motivo (che può essere lo sperimentatore che inietta degli ioni positivi) il potenziale inizia a diventare più positivo e i canali sodio si sono aperti e dopo un po' si sono aperti quelli del potassio. Lo rifaccio andare perché è un po' veloce.

Quindi il potenziale per altri motivi inizia a depolarizzarsi. Il sodio si apre, poi quella botola purtroppo si chiude, i canali potassio si aprono. Una terza volta: si aprono, si **inattivano** e dopo un po', perché è più lento a reagire, il potassio si apre. Fanno quella sequenza che vi ho descritto essere necessaria per spiegare questa salita, discesa e risalita.

Non ci sarebbe bisogno di questa ulteriore botola. Questa botola, che si chiama... è un *gate*, un cancelletto di **inattivazione**, di fatto si attiva con un certo ritardo dopo che il canale è aperto. Nonostante (lo rifaccio andare) il canale sia aperto, questa botola a un certo punto si chiude. Quindi come per il potassio agisce con un certo ritardo, non tutto è istantaneo, anzi dipende dalle cinetiche chimiche. Adesso il canale continua ad essere aperto, però la botola è chiusa. Questo fa sì che il potenziale qui all'apice, all'*overshoot*, si fermi.

Se non ci fosse questo ulteriore *gate*, quando i canali potassio si aprono, troverebbero ulteriore conduttanza dal sodio, perché il sodio, vi ho detto, si apre come per il potassio. Si inizia ad aprire quando il potenziale è depolarizzato, è un pochino più positivo di quello che era. Quindi se io mi apro e il potassio si apre, ok, vediamo a chi è più bravo, mentre io vi ho detto che quello di cui ho bisogno è che o c'è il sodio o c'è il potassio. Se sono tutte e due assieme attivati, le cose non funzionano, nel senso che il potenziale avrebbe un qualche valore di *steady state* (posto che lo *steady state* si possa raggiungere) intermedio. Invece io voglio che vada giù, voglio proprio togliere questa depolarizzazione. Idealmente mi serve perché vorrei ripristinare il sistema a una condizione di partenza.

Quindi l'evoluzione non solo ha creato un oggetto come il canale sodio che è fra gli oggetti biologici più veloci che esistono al mondo (riesce ad attivarsi in una frazione di millisecondo, decine di microsecondi o frazioni di millisecondi si attiva), ma ha anche un meccanismo per cui lo chiude. Mentre il potassio che è più ritardato è più *delayed*, perché per i fatti suoi ha una cinetica, è più goffo, ha una massa diversa, non mi interessa, lo tratterò dal punto di vista fenomenologico, ha una cinetica diversa.

Questo è, se vi può essere di interesse, una specie di tabellina in cui c'è il tempo caratteristico di un sacco di fenomeni biologici, espresso in scala logaritmica, quindi sono come se fossero gli ordini di grandezza, e vedete che l'attivazione di un canale sodio è fra le reazioni più rapide che ci siano, paragonato con la reazione di un enzima, con il tempo di transito di uno ione che passa dentro un canale. Ed è quello che spesso dico qui in questo territorio: ha senso, è come se fosse la Ferrari (lo dirò un paio di volte), come se fosse la Ferrari dei canali ionici, perché non solo è un canale interessante, è una roba che si attiva con il potenziale elettrico.

Molti, e non ci vuole un premio Nobel, riconoscono che il fatto che esistano delle proteine che sentono il campo elettrico sia il punto di svolta dell'evoluzione per utilizzare un **codice elettrico**, fenomeni di elettromagnetismo nel processamento dell'informazione. Questo ha senso, non sono sicuro che riusciate già a intuirlo, è molto complicato da studiare, ma è la chiave per i fenomeni elettrofisiologici. Voi avete dei pori la cui apertura e chiusura dipende dal campo elettrico, ma una volta che si aprono e fanno passare gli ioni, la loro apertura o chiusura cambia il campo elettrico.

Quindi il fatto che le cellule nervose parlino con il linguaggio dell'elettricità è perché esistono dei canali ionici che si aprono e chiudono a secondo di quello che è il valore dell'elettricità. Ma questa apertura cambia il potenziale elettrico e se cambia il potenziale elettrico cambia la permeabilità, ma se cambia la permeabilità cambia il campo elettrico. Quindi dal punto di vista sperimentale è piuttosto complicato riuscire a disaccoppiare le due cose. Io vorrei poter capire quando la porta si apre, perché io la vedo aprirsi e chiudere, come avete visto quel cartone della conduttanza sodio e della conduttanza potassio. Vedo che si aprono e si chiudono, ma chi controlla chi? Non è banalissimo da capire, come soprattutto.

Un Esercizio: Impatto Metabolico del Singolo Potenziale d'Azione

Prima della pausa volevo tornare su quel punto in cui... quindi potete pensare che sia un esercizio ma lo possiamo fare assieme... in cui: perché voi mangiate la cioccolata e le banane? È perché volete mantenere il potenziale di inversione. Avete le pompe ioniche ovviamente per quello, ma potete pensare che, ok, aprendo i canali, aprendo le porte, in qualche modo scombino drammaticamente le concentrazioni. Quindi ho un bisogno estremo che le pompe ioniche funzionino sempre. Le pompe ioniche ci sono, funzionano 24 su 24, e avete bisogno di energia (ATP) per azionarle. Però il singolo potenziale d'azione non è così drammatico in termini metabolici. Ve lo faccio vedere.

Quello che sto facendo, sto immaginando di prendere un piccolo pezzettino di una morfologia di un neurone. Qui, per esempio, sperimentalmente vedete

un **neurone piramidale**. Neuroni piramidali sono neuroni eccitatori, ve l'ho già raccontati nella prima lezione, della corteccia e anche nell'ippocampo. Questo cavo che vedete si chiama dendrite, albero dendritico, e qui vedete, intravedete l'assone. Hanno colori diversi perché questa, questi coni che vedete, è un'immagine al microscopio (microscopio in trasmissione... in realtà è un'immagine in fluorescenza, quindi adesso vi dico che cos'è). All'interno di queste pipette (qui vedete la sezione orizzontale vista dall'alto nel microscopio), vi ho già fatto vedere un paio di immagini di una pipetta che esplora e punzecchia o penetra il soma di un neurone precedentemente. Quindi avete un'altra che, per chi è molto bravo e dotato sperimentalmente, riesce a penetrare, a punzecchiare una porzione della membrana cellulare che è molto piccola, un cavo, che dentro è vuoto (nel senso che c'è uno spazio per cui se io metto un elettrodo posso misurare dentro rispetto a fuori), però è molto piccolo ed è anche complicato nel piano, in questo caso è una fettina di cervello, con una punta di un micrometro di diametro riuscire a beccarlo e non andare sopra o sotto.

Non so quanti di voi facciano ago e filo, o abbiano una volta provato nella vita a mettere il filo dentro la cruna di un ago: non è banale. Infatti pochi ricercatori riescono a fare queste registrazioni che si chiamano *somato-dendritiche*, registrazioni somatodendritiche. Hanno colori diversi perché all'interno di ciascuna pipetta c'era un colorante diverso e questo è un colorante fluorescente che quando è eccitato a una particolare lunghezza d'onda fluoresce nel blu e verde.

Considero quindi un pezzo di dendrite. Vi faccio vedere che quindi nel caso di una morfologia intera del neurone, state tranquilli che un singolo potenziale d'azione non cambia drammaticamente le cose. E quindi sto pensando a un piccolo cilindro di **lunghezza 50 m** e **diametro 10 m**. Tra l'altro è abbastanza ciiccio, abbastanza grande. Potrebbe essere nelle parti, si dice, prossimali (perché in prossimità del soma) di questo dendrite apicale. Quindi un dendrite che si estende a distanza rispetto al soma, però a giudicare dal valore di 10 m è abbastanza grande.

Quindi ho il volume e sapete che se io ho il volume e parlo di concentrazioni, mi viene proprio istinto di moltiplicare la dannata concentrazione per il volume, perché almeno ragiono in termini assoluti. Vedetevela voi se vi piacciono più contare le cose in moli o contare le cose in numero di particelle. Qui l'informazione in più è che so che il potenziale di membrana cambia, c'è un ΔV , e ovviamente ΔV sto pensando a un ΔQ , quindi una carica. Sapendo qual è la carica elementare, se voi mi dite qual è il ΔQ ... Essendo un condensatore la membrana, essendo un condensatore, se io so il ΔV forse posso inferire il ΔQ . E se so qual è la carica elementare (1.6×10^{-19} Coulomb) posso risalire a quanti ioni sono stati scambiati in questo processo.

Comunque, le cose con calma. Questa è la superficie laterale di questo cilindro, $2\pi r \cdot L$. $2r$ l'ho chiamato diametro perché ho specificato il diametro, e quindi è questa quantità qua, $\pi \cdot 500 \times 10^{-8} \text{ cm}^2$. Perché l'ho fatto in centimetri quadri? Perché la capacità di membrana che vi ho detto, capacità di membrana specifica che vi ho detto che dovete ricordare a memoria, è dell'ordine di quant'è? Prima di tutto che unità di misura ha? Una capacità. Farad. E l'unica cosa che vi chiedo è ricordare che... non è un Farad perché sarebbe un supercondensatore, è un microfarad, però non finisce qui. Visto che è una capacità specifica,

ha questo valore quando è riferita all'unità di superficie espressa in centimetri quadri. **Un microfarad al centimetro quadro** (1 F/cm^2), potete ricordarvelo. Per questo che ho convertito i micrometri in centimetri quadri. So che può essere noioso, però una volta che uno capisce o ricorda il trucchetto delle scuole superiori o forse alle elementari, si fanno le equivalenze, siete tranquilli.

La capacità (C) quindi l'ho espressa in... quindi ho moltiplicato per i centimetri quadri e questa è la capacità totale, microfarad. $\Delta Q/\Delta V = C$, quindi io so adesso come esprimere ΔQ se il ΔV è 100 mV (da -70 a $+30$, circa 100 mV, $+50$ mV quello che è). E quindi il ΔQ posso calcolarlo e ottengo una quantità che è in Coulomb. Vi invito a farlo una volta, ma il processo concettuale è... ok, pardon, qui non era il volume, è anche il volume adesso, però la superficie mi è necessaria perché questa è la capacità riferita all'unità di superficie. Se è una capacità vuol dire che funziona, la legge che vale per i condensatori è: sapendo qual è il cambiamento di potenziale nel tempo, so qual è il cambiamento di carica nel tempo.

Questo è il cambiamento di carica, ΔQ . È tanto o poco? Non lo so, devo dividere per 1.6×10^{-19} per avere il numero di ioni scambiati, il numero di particelle. Oppure se siete amanti delle moli, basta che voi dividiate per la **costante di Faraday** (F) che è la carica di una mole, semplicemente un fatto di unità. Se dividete per F avete in moli, se dividete per E (per la carica elementare dell'elettrone, 1.6×10^{-19}), avete in particelle.

Quindi sembrerebbero 10 milioni, in realtà è un numero trascurabile, se vi ricordate l'esempio che abbiamo fatto forse due lezioni fa, in cui vi facevo vedere a che cosa corrispondevano concentrazioni tipiche in millimolare. Quindi se pensate al sodio, al potassio... anche il sodio che ce n'è tanto fuori e meno dentro, comunque è... il calcio sarebbe un po' diverso e infatti ci sono delle ragioni per cui anche un singolo potenziale d'azione conta. In questo caso è una nanomole, quindi ok, potete pensare che se adesso io posso esprimere non soltanto la superficie laterale, ma tutto il volume, e penso che lì dentro ci fosse prima 1 millimolare... Qui ve l'ho convertita in numero di ioni. Un millimolare, scusate, 1 millimolare vuol dire che qui dentro ci sono dell'ordine di 10^{17} ioni, cioè sono 11 ordini di grandezza di più.

Non lo scaricate, questo piccolo pezzettino periferico della morfologia di un neurone sparando una volta soltanto. Dovreste, per svuotare quel pezzettino piccolissimo che ha 1 millimolare di concentrazione di sodio, per svuotarlo dovreste avere 240 di questi potenziali d'azione. Sono tanti, tipicamente in particolare le cellule della corteccia sparano una o due volte al secondo, quindi potete pensare che questo è dell'ordine dei minuti e perché l'equivalente di ioni è enorme. E c'era un'altra nota che ricordavo, è che se considerate una concentrazione di 50 millimolare, giusto per fissare le idee, vuol dire che dovete fare 6 minuti di sparo, di generazione di potenziali d'azione a 30 **spike al secondo**, che è qualcosa che non riesco nemmeno io a fare. 30 spike al secondo ed è, nonostante non sia una frequenza elevatissima, ma nel sistema nervoso centrale è molto elevata e tipicamente non viene sostenuta per 6 minuti continuamente. Altrimenti avete una crisi epilettica, parliamone. E infatti durante una crisi epilettica c'è un cambiamento delle concentrazioni ioniche.

Digressione: Schemi Cinetici e Legge di Azione di Massa

Ricominciamo con una digressione. Per il momento io non vi ho effettivamente raccontato come nel dettaglio questi canali ionici cambiano, come si aprono e come si chiudono. Vi ho semplicemente detto che sono fenomenologicamente dipendenti dal potenziale transmembrana e devo fare una digressione su quelli che vengono chiamati **schemi cinetici** o **cinetica del prim'ordine** oppure **schemi Markoviani**. Non so se avete mai sentito queste cose, le avete sentite nel contesto delle reazioni chimiche, dove probabilmente ve le siete bevute come una specie di formalismo che sebbene non sia... non contenga la meccanica quantistica che oggi sappiamo essere necessaria per capire perché avvengono le reazioni chimiche. Semplicemente se io vi metto alcuni di quei simboli che voi sapete, con dei più e delle freccette, voi sapete, "ok, questo mi funziona perché mi predice quello che fenomenologicamente ottengo per esempio in un becher".

Ma non è che le molecole si sommano $Na + Cl \rightleftharpoons NaCl$. È un formalismo questo, solo che ve lo siete bevuti sempre come qualcosa di qualitativo. Lo faccio diventare quantitativo, così da essere un ulteriore potenziale incubo. Spero di no.

Tutto quello che è alla base di questa descrizione che è fenomenologica (non vi sto dicendo come le molecole si combinano, i vari legami covalenti, le interazioni di van der Waals, no, butto tutto letteralmente dalla finestra) e quello che vi dico è al limite *quanto rapidamente* queste reazioni avvengono. $Na + Cl \rightleftharpoons NaCl$ vuol dire semplicemente che per qualche motivo, quando metto questi due composti, due oggetti, queste due stati, queste due conformazioni (ovviamente è più corretto dire oggetti), li metto assieme, c'è una specie di trasformazione che non descrivo, perché non è descritta qua, cambia lo stato e al limite vi dico quanto rapidamente questo avviene. Spesso, forse qualcuno di voi ricorda che si mettevano dei coefficienti, dei *rate*, delle costanti cinetiche.

Questo formalismo è dovuto, è l'istanza... l'istanziamento orribile... la conseguenza di un principio che non vi derivò dai principi primi, viene dalla termodinamica dell'equilibrio ed è dovuta a due ricercatori norvegesi del secolo... del 1800, e si chiama la **Legge di Azione di Massa**, che avrete sicuramente orecchiato. Io ve la ripeto in termini quantitativi e in termini più astratti, in cui non necessariamente sono interessato alla chimica, sono interessato a descrivere un fenomeno in cui non entro nel dettaglio, ma voglio avere un modo per descrivere quanto rapidamente questo fenomeno avviene.

E quindi, di nuovo, ci sono degli oggetti $A + B$. Possono essere specie chimiche, possono essere degli stati. Se piove e io sono influenzato, non lo so, divento radioattivo. Non c'è possibilità di tornare indietro e con una particolare velocità, un tasso di cambiamento... e alla fine di questa, sono pochissime slide, alla fine di questo ve lo racconto di nuovo in termini stocastici, in termini microscopici e non mesoscopici come stiamo parlando in questo momento.

Questo tipo di formalismo letteralmente vuol dire soltanto che quando c'è un'interazione fra questi due oggetti, il tasso con cui C appare è **proporzionale** a quanto c'è di A e a quanto c'è di B . Quindi se io lo scrivo così ($A + B \rightarrow C$), sto ignorando il meccanismo, ma dico che C , il tasso con cui C viene prodotto, appare, viene convertito (quello che è, dipendentemente dal contesto), dipende

dalla quantità di A e dalla quantità di B . Un po' torna perché se io non ho A o non ho B , C non cambierà, non si produrrà (o non sparirà nel caso di una freccia nell'altra direzione).

E badate bene, non sto parlando di quantità assolute, sto parlando di **tasso di cambio**. Ok, ho fatto la scelta infelice di chiamarla C , ma non importa, A , B , C non ha a che fare con la capacità di membrana. Il tasso di cambio vuol dire che sto descrivendo come rapidamente le quantità cambiano nel tempo. Tutta la fisica, la biofisica è fatta da relazioni... prendete Newton, prendete l'equazione di bilancio della carica... tutto è più facile quando viene espresso in termini di leggi fisiche che hanno a che fare con il cambiamento nel tempo. Non mi è facile stabilire una legge fisica per dire " C uguale...", " C in funzione del tempo uguale...". In questo caso lo facciamo, ma la legge fisica mi dice come cambia il tasso di produzione.

Quindi scritto in altri termini, il tasso di produzione di C è legata alla concentrazione, al numero, alle moli, non importa. Sapete che sono tutti concetti equivalenti. Parlare di concentrazione o di densità o parlare di numero totale di oggetti è la stessa cosa, vuol dire che sto come se potessi moltiplicare da ambo i membri per il volume. Se io ho delle reazioni in cui queste sono concentrazioni, sono in millimoli, ok, moltiplico tutte le quantità per il volume del becher, parlo di numero di oggetti. E sto dicendo di nuovo che il modo con cui per esempio $NaCl$ compare dipende dal prodotto delle concentrazioni. E tutto il punto è il tasso di produzione, non è " C , adesso quant'è?". Questo forse è più intuitivo di quello che pensiate, ma ho voluto stressarlo molto.

$$\frac{d[C]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [B]$$

Quindi un'altra conseguenza di questo è che se questo era $k \cdot [A] \cdot [B]$, vuol dire che il tasso con cui C viene prodotto non è dipendente dalla storia pregressa, dipende soltanto dallo stato attuale, stato di A e di B , quanta c'è concentrazione di A e quanta c'è concentrazione di B . Chiaramente se mettete "reversibile" dipenderà anche da C , ma non dipende dalla storia pregressa. E non so quanti di voi sappiano o conoscano in generale i **modelli Markoviani**. Forse in *machine learning* avete visto qualcosa. Esiste in teoria delle probabilità un modo per modellare dei fenomeni che si chiama con una proprietà che è Markoviana, e vuol dire "non c'è una dipendenza dalla storia precedente".

Esempi di Schemi Cinetici Qui ci sono degli esempi che vi do. Vedrete che è un giochino con cui si scrivono... vedrete che tiro fuori delle equazioni differenziali (adesso l'ho appena tirata fuori come equazione differenziale) e vedrete che è molto facile. Qui per esempio c'è A che viene convertito in B , reversibile, k_1 e k_2 per il momento hanno senso, indicano quanto rapidamente avvengono quelle reazioni.



E per scrivere quantitativamente questa equazione differenziale, di fatto sto invocando la legge di azione di massa. Di fatto, diciamo, guardo per ciascuno di questi nodi (è come se fosse un grafo, è un grafo, in questo caso c'è solo due nodi, ci sono delle transizioni fra nodi; i modelli Markoviani sono esattamente un grafo con delle transizioni). Qui, per ciascuno di questo nodo, scrivo un'equazione differenziale, che mi dice come cambia quella specie... ionica... [errore del trascrittore, intende "specie chimica" o "stato"].

Quindi qui ho A , qui ho B , ne scrivo due, $\frac{dA}{dt}$ e poi un'altra equazione, $\frac{dB}{dt}$. Quando mi metto a guardare questo A , me lo immagino come se aveste una specie di contenitore di un liquido, che ha una specie di perdita, un tubo, uno scarico, che è questa freccetta che va da A , si allontana da A . È uno scarico per me questo, di cui k_1 è come se fosse il diametro. Sto ragionando in modo leggero, ma mica tanto. Nel caso idraulico, anche lì la sezione di passaggio (e quindi alla fine l'abbiamo anche in parte discusso) del flusso di uscita darebbe un cambiamento nella velocità di sparizione in questo caso. Creazione o sparizione, produzione o sparizione o consumo, è semplicemente una convenzione per dire se la derivata è positiva o negativa, se cresce o diminuisce.

Quindi ho degli scarichi e ho dei rubinetti. Quindi quando io penso a A , penso esattamente al **bilancio**, alla conservazione della massa. A nel tempo cambia perché c'è questo scarico e perché c'è questo rubinetto. Questo scarico cambia tanto più rapido quanto più c'è A . Questa è la legge dell'azione di massa. $\frac{dA}{dt}$ sparisce tanto rapidamente quanto (vedete, **meno**, perché questo è in uscita, qui ci metto un meno) il coefficiente ce l'ho e questo $k_1 \cdot A$.

E ha senso perché se io non ho A non può sparire. In altri termini, se io avessi un'equazione in cui scrivo $\frac{dA}{dt} = -k_1 \dots$ qui non mi fate troppo contento, diciamo non sono scontento perché... ci sono... non ci sono esponenziali qui. La sapete risolvere questa equazione differenziale? Come si fa a risolvere l'equazione differenziale? Si integra... [testo confuso] Quindi questa roba qua è una retta, la soluzione è una retta con coefficiente angolare con pendenza negativa. Se non sapete la matematica ripassatevela, ma vedete che qui vuol dire che la velocità con cui A appare o scompare è costante. Quindi vuol dire che se io aspetto un minuto, due minuti, quella continua a diminuire, diventa anche negativo. Nel caso di reazioni chimiche o descrizioni quantitative di oggetti che alla fine sono o in uno stato o nell'altro (ma stiamo parlando di numero di oggetti), non può diventare negativo.

Quindi la legge di azione di massa vi risolve questo problema. È naturale che se io ho, per esempio, una reazione chimica in cui una specie si trasforma in un'altra ma non è reversibile, a un certo punto non ce n'è più, diventa zero, non diventa negativo. Quindi è per questo che non vale questa legge, torna con quella che è l'osservazione sperimentale. Quindi $-k_1 \cdot A$ (che era il livello del liquido che c'era in questo possibile contenitore che mi sto immaginando) e poi c'è il rubinetto k_2 che mi conta come **più**, perché vedete che la freccia è entrante. Chiaramente deve essere proporzionale a B e la costante di proporzionalità è k_2 . Anche qua è come se avessi due flussi, ciascuno dei quali dipende da quanta roba c'è in questo contenitore, qual è l'altezza, quanta massa c'è in ciascuno di questi contenitori.

$$\frac{dA}{dt} = -k_1 \cdot A + k_2 \cdot B$$

C'è un'altra equazione differenziale da scrivere ($\frac{dB}{dt}$) ed è facile dimostrare che ne basta una perché queste equazioni differenziali... ne servono $N - 1$ dove N è il numero di stati, perché l'ennesima è linearmente dipendente. Vi faccio infatti vedere che, a parte la simmetria (vedete che qui $k_2 \cdot B$ compariva col segno più, qui compare col segno meno; qui $k_1 \cdot A$ col più, qui col meno).

$$\frac{dB}{dt} = +k_1 \cdot A - k_2 \cdot B$$

Sono tentato di sommare queste due equazioni. Sommare due equazioni vuol dire sommare i membri al termine di sinistra e i membri al termine di destra. E se queste due equazioni sono vere, sarà vera anche la loro somma. Se io lo faccio scopro che la somma delle derivate, che posso per esempio riscrivere come la derivata della somma (grazie, invocando la linearità dell'operatore derivata), è uguale a zero. Perché questo oggetto qui si cancella con questo e questo si cancella con questo. Spero di non doverlo fare il conticino.

$$\frac{dA}{dt} + \frac{dB}{dt} = \frac{d(A+B)}{dt} = (-k_1 \cdot A + k_2 \cdot B) + (k_1 \cdot A - k_2 \cdot B) = 0$$

E se la derivata di $A + B$ è zero nel tempo, vuol dire che $A + B$ è **costante**. Ed è ovvio. Se io ho A e B , alla fine nulla si crea, nulla si distrugge. Se io ho sodio più cloro più NaCl (questa merita un po' di attenzione e lo guardiamo dopo), è chiaro che in ogni istante deve esserci la stessa quantità di materia che c'era prima. Se metto tutto questo su una bilancia, mica la bilancia aumenta o diminuisce, è semplicemente una conversione. Però il totale si conserva.

Quindi quello che faremo costantemente, faremo frequentemente, è: visto che $A + B$ è uguale a una costante, io questa costante la posso chiamare W . La posso chiamare 100%, oppure se spaccate il capello potreste dire "cambio le variabili e ciascuna... chiamo per esempio $a_{piccolo} = A_{grande}/W$, $b_{piccolo} = B_{grande}/W$ ", così che $a + b$, con questo cambio di variabile, al massimo ammonta a 1. Quindi posso ragionare in **frazioni**: frazioni di elementi che sono in uno stato A e in uno stato B . Magari frazioni di canali che sono in uno stato chiuso, o in uno stato inattivato, o in uno stato pinco-pallino. Visto che sono delle conformazioni tridimensionali discrete (questa è un'ipotesi che se volete discutiamo dopo), e mi interessa parlare di una frazione sul totale del 100%: qual è la frazione di canali sodio aperti a riposo? Sono tutti chiusi? Oppure il 25% è aperto, il 15% è aperto? Può essere conveniente ragionare in termini di frazioni.

Se lo faccio posso... prima di farlo, per dimostrarvi che le due equazioni... sono... una basta, sono linearmente dipendenti, potete utilizzare $A + B = W$ (costante), e la costante è un dato del problema (può essere 100%, può essere 1, oppure può essere quanti grammi avevate di sodio e cloro all'inizio). E vedete che io posso esprimere B come $W - A$. Quindi questa equazione differenziale ($\frac{dA}{dt}$), non ho bisogno di avere un'altra equazione differenziale accoppiata, me ne basta una, perché ottengo un'equazione in cui solamente A compare.

$$\frac{dA}{dt} = -k_1 \cdot A + k_2 \cdot (W - A)$$

E questa lascio risolvere perché è la solita, noiosa equazione differenziale del primo ordine, coefficienti costanti, e se non la risolvete all'esame mi direte il perché, dove ho fallito a risvegliare il vostro interesse per una cosa base.

Qui la cosa che posso proporvi è di... ok, utilizziamo le frazioni. E per farlo, se non vi piace il cambio di variabili, posso dire: "ok, il cambio di variabili dobbiamo farlo uguale, ma posso anche dirvi, dividiamo ambo i membri per W ". Così qui, visto che la derivata di $A...$ quindi $\frac{1}{W}$, che è una costante, la posso portare dentro il segno di derivata (tanto è una costante moltiplicativa, non dipende da t , la posso portare ad arbitrio o dentro o fuori). La voglio portare dentro perché ho già il cambio di variabile pronto. Però ho fatto $\frac{1}{W}$ qui nel secondo membro e anche qui a sinistra $\frac{1}{W}$. Diventa $-k_1 \cdot (A/W)...$ e $a_{piccolo}$. Qui ho W/W , resta 1 (il 100%, grazie a Dio le cose restano consistenti) e qui di nuovo A/W che diventa a . Quindi la posso scrivere così:

$$\frac{d(A/W)}{dt} = \frac{da}{dt} = -k_1 \cdot a + k_2 \cdot (1 - a)$$

E posso fattorizzare a in modo tale che diventi nella forma a cui sono abituato di $\frac{da}{dt} = ...$ (quella costante che mi rende nervoso se il coefficiente è positivo o negativo perché ci sono gli esponenziali che esplodono, viceversa che dissipano, e tutto sommato questo è un sistema dissipativo, non c'è ragione per cui esploda) ... + un termine forzante. E quindi la posso scrivere fattorizzando come:

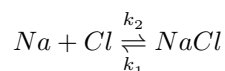
$$\frac{da}{dt} = -(k_1 + k_2) \cdot a + k_2$$

Questo è un numero perché k_1 e k_2 sono dati. Vedo con mia sommo gaudio che c'è un meno davanti quindi mi rilasso, anche perché k_1 e k_2 vi ho detto che sono le rapidità, le velocità, i *rate*, il tasso di conversione. E il tasso vuol dire "tot molecole al secondo", è positivo, non è negativo. Quindi k_1 e k_2 sono quantità positive e quindi qui ho la garanzia... La so risolvere questa equazione differenziale che è di fatto, a parte k_2 che è un termine costante, è un esponenziale... [correzione] è un arco di esponenziale che ha una parte di transitorio che poi finisce e poi resta un termine costante. Come lo so che c'è un termine costante? Lo assumo che ci sia uno *steady state*. Se c'è uno *steady state* la derivata la metto a zero, e il valore dello *steady state* (a_∞) è dovuto a $k_2/(k_1 + k_2)$.

Non so quanti di voi ricordano vagamente che questo formalismo qua permetteva (adesso chiaramente mi sbaglio perché non mi ricordo, lo devo derivare in 30 secondi ma adesso non lo faccio) permetteva da qui, anche se questa era una roba quasi discorsiva, quasi fenomenologica... era fenomenologica... di dire "guarda che se io ti do questi *rate*, ti sto dicendo come allo *steady state*... *Cloro*... il rapporto delle concentrazioni ($[NaCl]/([Na] \cdot [Cl])$) ...potrebbe essere il contrario, adesso non me lo ricordo, lo vedremo dopo perché... è uguale a una funzione di k_1 , k_2 ... una roba del genere". Quindi in chimica aveva un senso utilizzare questo formalismo perché avevate delle conclusioni sullo *steady state* molto interessanti.

Alla fine le reazioni chimiche avvengono a una velocità tale che non ve ne frega granché di derivare il transitorio. A noi sì, noi vogliamo avere il caso più generale possibile (schemi cinetici, Markoviani), vogliamo avere sia lo *steady state* che il transitorio. Perché mi interessa lo *steady state*? Perché a un certo punto fra poco applico esattamente lo stesso linguaggio a descrivere i canali ionici e vedrete che riesco a descrivere e comprendere esattamente il potenziale d'azione sulla base di quelle costanti cinetiche. Quindi sì, è la stessa equazione differenziale, la solita.

Il Caso $Na + Cl \rightleftharpoons NaCl$ e la Conservazione della Massa Parliamo di questo sodio $Na + Cl$. Credo di aver messo, ok, rispetto a quello che ho scritto sulla lavagna, in quella slide k_1 è invertito con k_2 , ma sono due parametri, sono due nomi, non hanno alcun senso. Quindi qui ho sbagliato proprio perché qui era un rapporto fra k_1 e k_2 . Comunque sia, questo è quello che forse alcuni di voi ricordano da chimica e non sono sicuro che qualcuno vi abbia mai fatto vedere da dove viene questo rapporto. E allora permettetemi di scrivere di nuovo per questo schema cinetico, di nuovo per ciascuno di questi nodi (sodio, cloruro, sodio e cloro), scrivo un'equazione differenziale.



Qui per ricordare a me e ricordare a voi che in questo contesto sono delle concentrazioni, ma posso pensare tranquillamente che siano dei numeri assoluti, moltiplicando da ambo le parti per il volume. Quindi non è così importante. Quando prima chiamavo A , B , qui potrebbe essere $A \rightleftharpoons B + C$, non importa se lo considerate come concentrazione, come frazione o come numero totale, non importa. Alla fine è semplicemente un cambio di variabile. Il concetto è che avete uno stato: lo stato della molecola sodio-cloro in una configurazione legata (*bound*), mentre in questo caso avete le singole particelle, le singole molecole non legate. Potete pensare in questi stati... ve lo sto ripetendo in questo modo perché se sappiamo che i canali ionici hanno diverse conformazioni, diversi stati (aperto, chiuso, inattivato... perché c'è quella botola dentro che quindi mi fa esplodere, non sono più due stati "aperto o chiuso". È aperto-inattivo, aperto-attivo, chiuso-attivo, chiuso-inattivo... diventano quattro se ho quella botola, sono tutte le combinazioni di due elementi, tre elementi, due a due... quella cosa lì, adesso ci devo pensare perché il *combinatorics* non era un argomento molto interessante per me).

Quindi ragionando in termini o di concentrazioni o di molecole... [si corregge] scusate sbagliavo l'ordine delle slide... quindi per ciascuno di questi scrivo un'equazione differenziale. Qui è, ok, lo considero concentrazione, scrivo $\frac{d}{dt}[NaCl]$. E di nuovo ho lo scarico e il rubinetto, quindi qui c'è un $-k_1 \cdot [NaCl]$, perché "quanto c'è di liquido in questo contenitore, tanto rapidamente me lo porta via". Quanto meno se avete una vasca che è molto piena, una vasca da bagno, un lavandino che è molto pieno, il flusso è molto più rapido perché la quantità di materia è molto più... preme sullo scarico in modo molto maggiore rispetto a se avete un filo. Ragione per cui in effetti i profili con cui l'altezza del liquido cambia in un contenitore, in un *reservoir* con delle perdite, sono degli archi di esponenziale, non è che va giù di botto istantaneamente o linearmente,

sono esponenziali. Dove sono gli esponenziali vuol dire che la variabile di stato che è qui compare anche al secondo termine, ricordatevi che questo è quello che mi rende contento o scontento, quindi è la chiave, gli esponenziali appaiono perché sono le autofunzioni di questa classe di equazioni differenziali.

Quindi qui sparisce con tasso k_1 , quindi **meno** (scompare), tanto velocemente quanto più c'è $[NaCl]$. E appare (o apparisce? no, appare) quanto più rapidamente, proporzionalmente a k_2 , quanto c'è sia la concentrazione di sodio e di cloro, per il **prodotto** come per la legge di azione di massa. Ha senso che ci sia un prodotto, il prodotto è facile da annullare, basta che una delle due sia zero, il prodotto è zero. Io ho bisogno di entrambe le specie per fare questa reazione, quindi il fatto che qui ci sia un'operazione che è il prodotto torna con l'intuizione. C'è un segno **più** e quindi esprime il fatto che qui ho la creazione, la formazione di nuovo, ho il passaggio in questo stato legato.

$$\frac{d[NaCl]}{dt} = -k_1 \cdot [NaCl] + k_2 \cdot [Na] \cdot [Cl]$$

Se prendo questa equazione soltanto e considero lo *steady state*, dico che qui non mi interessa risolverla per il transitorio. Notate, non la so risolvere ancora per il transitorio se non scrivo le altre equazioni, devo scrivere un'altra equazione differenziale per il sodio e una per il... [errore, intende cloro], perché qui è un'equazione in cui, ok, qui questa è la variabile di stato, chiamatela $f(t)$, $x(t)$, chiamatela come volete, c'è anche qui, ma qui c'è un altro termine che... sono altre quantità, in teoria è un sistema di tre equazioni differenziali accoppiate (non tutte e tre sono dipendenti per i motivi detti). Tuttavia se mi interessa soltanto l'equilibrio e lo considero dicendo "esiste lo *steady state*". Se esiste vuol dire che le quantità non cambiano nel tempo. Qui c'è una derivata nel tempo, vuol dire che la derivata è zero. In questo caso posso riarrangiare i termini, portare questo al primo membro, cambio il segno e se divido $[NaCl]$ per $[Na] \cdot [Cl]$ ottengo in questo secondo membro k_2/k_1 .

$$\text{Se } \frac{d[NaCl]}{dt} = 0 \implies k_1 \cdot [NaCl] = k_2 \cdot [Na] \cdot [Cl] \implies \frac{[NaCl]}{[Na] \cdot [Cl]} = \frac{k_2}{k_1}$$

Se lo fate una volta nella vita capirete perché i chimici vi hanno forse spesso proposto questo come metodo estremamente potente. In realtà la conoscenza di questa descrizione con il linguaggio delle equazioni differenziali è ancora più potente perché potete descrivere il transitorio, potete particolarmente anche in altri contesti più legati alla chimica, non accontentarvi di quello che è il risultato finale, ma potreste avere la necessità di capire quanto rapidamente le specie chimiche in un bioreattore, per esempio, si formano o non si formano.

Era una cosa nota questa degli schemi cinetici, oppure è la prima volta che la sentite? La sapevate già? No, ok, ok. L'idea è: vi sto annoiando oppure no. Questo... se potete datemi qualche feedback, se no.

Questo per concludere questa parte: la storia della conservazione della massa. Se lo scrivete così, richiede di essere un pochino attenti, perché ok, devo scrivere un'equazione differenziale per ciascuna specie. E di nuovo è un giochino: mi

metto qui, sto scrivendo $\frac{d[Na]}{dt}$. Vedete che sparisce (questo è uno scarico), quindi c'è un $-k_2$, proporzionalmente a quanto c'è sodio... infatti c'è... scusate, quanto c'è sodio ma quanto c'è anche cloro, altrimenti la reazione non avviene, non sparisce, chiedo scusa. Quindi $[Na] \cdot [Cl]$, premoltiplicato da $-k_2$, che è questo qua. E poi appare sodio con un *rate* che è proporzionale a k_1 per quanto $[NaCl]$ c'è. Quindi $k_1 \cdot [NaCl]$ meno... Il cloro è praticamente identico, vedete che è praticamente identico, però qui al primo membro è diverso, è l'equazione differenziale che descrive come il cloro cambia.

$$\frac{d[Na]}{dt} = -k_2 \cdot [Na] \cdot [Cl] + k_1 \cdot [NaCl]$$

$$\frac{d[Cl]}{dt} = -k_2 \cdot [Na] \cdot [Cl] + k_1 \cdot [NaCl]$$

Allora, o vi sparate una serie di passaggi algebrici del tipo “sottraete la seconda e la terza equazione”, “sommate la prima e la seconda”, quindi manipolate algebricamente quello che diventa, immaginando che ci sia lo *steady state* (quindi mettendo a zero tutti questi termini). Avete cioè un sistema di equazioni algebriche non lineari. E sapete che un sistema di equazioni algebriche non lineari richiede, eventualmente per esplicitare “qualcosa uguale a qualcos'altro”, o per esplicitare delle reazioni, richiede un pochino di algebra, dovete sudare un po'. Ho sudato per voi, ma un epsilon, non è una roba difficile.

Un altro modo è: se voi provate a sommare tutte e tre queste equazioni, a sinistra viene la somma delle derivate, che vuol dire la derivata della somma. La derivata della somma non viene zero se sommate tutte e tre le equazioni, perché è pur vero che questo termine qua ($-k_1 \cdot [NaCl]$) si cancella con questo ($+k_1 \cdot [NaCl]$) e questo termine ($+k_1 \cdot [NaCl]$) si cancella con questo ($-k_2 \cdot [Na] \cdot [Cl]$), però resta ancora questo termine qua in più ($-k_2 \cdot [Na] \cdot [Cl]$) e anche questo termine qua in più ($+k_2 \cdot [Na] \cdot [Cl]$). Non so se lo vedete, se lo provate a fare una volta vedete che non vi torna. “Ma come? Quello ci ha detto che se sommate assieme tutte le equazioni differenziali avete la conservazione della massa”.

Sì, ma in questo caso per fare... per avere la somma delle derivate uguale a zero, dovete sommare **due volte** questa equazione alle altre. Cioè $2 \cdot [NaCl] + [Na] + [Cl]$ è costante. Se lo fate vedete che avendo qui un coefficiente 2 (e anche qui un coefficiente 2), qui si cancella 1 e qui si cancella l'altro. Questo e questo fanno 2, sono uguali. E anche questo $-k_2 \cdot [Na] \cdot [Cl]$... fanno 2 volte. Quindi se voglio che il primo membro sia zero (la somma delle derivate o la derivata della somma sia zero), devo mettere due volte a questa quantità qui... ah pardon, al sodio cloruro.

E questo torna perché se immaginate di fare degli *snapshot*, delle fotografie istantanee nel tempo e partite per esempio in una condizione in cui avete 10 (di nuovo lo posso fare come se fossero molecole perché ho moltiplicato per il volume, quindi sì questa è una reazione chimica, in teoria dovrei ragionare in concentrazioni, ma sapete che le concentrazioni e le quantità assolute sono la stessa cosa a parte un fattore di scala che è il volume). Quindi ho 10 molecole di sodio, 5 di cloro. Ho bisogno di una di sodio e una di cloro per fare una di sodio cloruro. Quindi in questo caso, dopo un certo tempo, il sodio è sceso a 5, perché più di 5 non hanno... più di 5 di cloro. Quindi ciascuna di sodio reagisce

con questa di cloro e... una di sodio e una di cloro fanno... quindi sono due... una di sodio e una di cloro fanno una di sodio cloruro. Quindi qui questo non c'è più, questo è diventato 5 e questo è tornato a 5 ($10 - 5$ fa 5). Se faccio ancora, visto che la reazione è reversibile, posso pensare che due di questi sono tornati, hanno due molecole, quindi vuol dire che per ciascuna avevate 1 e 1. Infatti questo da 5 è diventato 6 e poi 7. Questo da cloro è diventato prima da 0, 1, 2. Se fate la somma istante per istante ($10 + 5 + 0$, $5 + 0 + 5$), avete sempre lo stesso numero, tranne in questo caso che, ok... Tranne in questo caso, cioè, pardon, non avete lo stesso numero a meno che non moltiplicate questa quantità per 2 (2×3 , 2×5). Un altro modo per vederlo è che sodio più cloro è più pesante, pesa il doppio, perché ne ha due di palline, una attaccata all'altra. Quindi questo è un altro modo per dire la storia della conservazione della massa. Quando avete schemi cinetici (e non li vedremo mai) in cui avete $A + B \rightleftharpoons C$, continua a valere con attenzione per il discorso del bilanciamento. Esiste comunque un bilanciamento perché la massa si conserva.

Esercizi sugli Schemi Cinetici Fatemi ora tornare indietro a questo schemino qua in cui vi chiedo di aiutarmi per scrivere l'equazione differenziale per ciascuno di questi schemi cinetici. Qui di nuovo per ciascuno di questi nodi, per ciascuno di queste quantità, devo scrivere un'equazione differenziale, quindi scriverò $\frac{dA}{dt}$ e poi dopo scriverò $\frac{dC}{dt}$.

Schema 1: $A \xrightarrow{k} C$

Mi aiutate a scrivere $\frac{dA}{dt}$? Ripeto, è un giochino. Se non ci siete, è perché o non ve ne frega niente, oppure perché state dormendo. Quindi, $\frac{dA}{dt}$... Vedete che c'è solo uno scarico? Come lo scrivo?

(Voce dal pubblico: Meno k , A)

Non vi sento, perdonate. Meno $k \cdot A$, perfetto. E C , alla fine è il caso duale, come lo scrivo?

$$\frac{dA}{dt} = -k \cdot A$$

(Voce dal pubblico: K per A)

$k \cdot A$. E infatti mi piace perché se le sommo questo e questo si cancella e $A + C$ è costante (la derivata, la somma delle derivate è zero quindi la derivata della somma è zero).

$$\frac{dC}{dt} = +k \cdot A$$

Schema 2: $A \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} C$

In questo caso qua cosa devo cambiare? Visto che non è più... non solo c'è lo scarico ma c'è anche... c'è il rubinetto dall'altro lato. Quindi lì era k_1 , quindi scrivo qua k_1 . Mi aiutate a completarlo?

$$\frac{dA}{dt} = -k_1 \cdot A \dots$$

(Voce dal pubblico: Più k_2 per C)

Ok. E qui sarà uguale ma col meno... [si corregge]

$$\begin{aligned}\frac{dA}{dt} &= -k_1 \cdot A + k_2 \cdot C \\ \frac{dC}{dt} &= +k_1 \cdot A - k_2 \cdot C\end{aligned}$$

...e infatti se le sommo torna.

Schema 3: $A + B \xrightarrow{k} C$

Alla fine questo $A + B \rightarrow C$ (reversibile/non reversibile) l'abbiamo guardato, quindi non vi stresso più di tanto. Alla fine è sodio cloruro quasi. Avete indicata anche la conservazione della massa, vedete che qui $A + B + 2C \dots$ [correzione: lo schema $A + B \rightarrow C$ implica $dC/dt = k \cdot A \cdot B$, $dA/dt = -k \cdot A \cdot B$, $dB/dt = -k \cdot A \cdot B$. La conservazione qui è più complessa, es. $A - B = \text{costante}$]. E anche qui, di nuovo, non è perché è reversibile o non reversibile che cambia la conservazione della massa. Tanto ne metto delle specie chimiche o degli stati.

Se il canale è aperto... se io ho mille canali, se 500 sono aperti, gli altri saranno chiusi. È una specie di principio, non è un'esclusione, è una conservazione degli stati. Se non è aperto deve essere chiuso. Ok, se c'è l'inattivazione ci può essere un terzo stato, però non ci possono essere dei canali che sono in uno stato "pincopallino" che non... o è aperto o è chiuso, visto che sono solo due stati. Qui o è A o è C .

Qualcosa che può essere di vostro interesse, ma non ne parlo, è utile nelle reazioni di **polimerizzazione**, in cui non avete una sola molecola di A . In effetti anche in un contesto di segnali elettrofisiologici, ma non ne parliamo, in particolari circostanze in cui siano necessari più ioni o più molecole di neurotrasmettitore per legarsi a un recettore. In realtà sto pensando al calcio, ma non ne parliamo.

Schema 4: $nA + B \xrightarrow{k} C$

Quando avete una molteplicità, visto che questo era un prodotto ($A \cdot B$), allora nel secondo membro dell'equazione differenziale la legge di azione di massa dice che il tasso di apparizione, insomma... dipende dal prodotto $A \cdot B$. Quindi avete N volte A , quindi dovete fare $A \cdot A \cdot A \dots \cdot A \cdot B$. Questa è la ragione per cui avete questo elevamento a potenza alla n . Ed è tipico delle reazioni di polimerizzazione.

$$\frac{dC}{dt} = k \cdot [A]^n \cdot [B]$$

In questo caso, occhio al di là del fatto della... quindi o ci arrivate con l'euristica intuitiva che la quantità di materia deve essere uguale, oppure rigorosamente, lavorando con l'algebra, manipolando queste equazioni, vi accorgereste che la

conservazione della materia, quindi il bilancio della massa, assume una forma che non è più quella di prima (era 2 per C nel caso di $A + B \dots$), quindi è $n + 1$. Comunque, questo non lo vedremo nel corso.

stochastic Interpretation Interpretazione Stocastica vs. Mesoscopica

Prima di chiudere questa premessa, questo *excursus* su questi schemi cinetici, [che] furono utilizzati da Hodgkin e Huxley per descrivere i canali ionici, come ho cercato di inserire più volte negli ultimi minuti. Vi dico però quella che è un'altra interpretazione, che non è un'interpretazione "di popolazione". Quando parlo di una concentrazione di sodio 5 millimolare sto pensando a un sistema di 10^{18} ioni, sto pensando a un sistema molto numeroso, al di là del fatto che la esprima in concentrazione o in densità, oppure moltiplichi da qualche parte per il volume. Quindi sto pensando a un numero enorme di particelle. Sto pensando a un sistema di tanti oggetti, **mesoscopico**. Idem quando vi ho detto poco fa "se io ho mille canali sodio..." e la settimana scorsa ne avevamo discusso dicendo "questi canali ionici sono intercalati nella membrana e dal punto di vista elettrico li posso... se è possibile, se sono tutti uguali, sono indipendenti (nel senso che non si influenzano a vicenda, per il momento non ve ne ho parlato di questo, ma si può immaginare di no), tutti quanti siedono attraverso la membrana e quindi tutti quanti sperimentano lo stesso potenziale". Kirchhoff, oppure le leggi dell'elettrotecnica della serie delle resistenze o dei resistori o del parallelo dei resistori, mi dà quelle formulette per accorparli. Però sempre ho idea che quando li accorpo parlo di una grossa popolazione, quindi in quel caso è una descrizione mesoscopica.

Queste equazioni differenziali scritte così sono equazioni **deterministiche**. Io le risolvo, ho gli archi di esponenziale e vado a casa, non ho stocasticità. In realtà lo stesso identico formalismo ha una rilettura che è molto importante dal punto di vista dei segnali elettrofisiologici, perché se voi fate un esperimento con un neurone biologico (ve lo farò vedere), non è che proprio sia un oggetto deterministico. Oggi vi faccio vedere un esempio di simulazione al calcolatore del modello di Hodgkin e Huxley e vi faccio vedere il modello deterministico e la versione non deterministica. Se voi piantate un elettrodo a qualche parte nel mio cervello non vedete -70 mV, vedete una fluttuazione come se fosse un processo stocastico. E se mi fate vedere la foto del cioccolato svizzero, cioccolato belga, alcune parti della mia corteccia temporale riconoscono e iniziano a sparare, ma non sparano così [regolare], come invece vi farò vedere che i neuroni descritti sparano in un modo da *pacemaker*, da metronomo, in modo regolare. Sparano in modo irregolare.

E quindi da dove viene la stocasticità in questa descrizione? Non c'è, sono equazioni ordinarie (potrebbero essere le derivate parziali, ma sono equazioni

deterministiche). Quando si scrive così ($A \xrightleftharpoons[k_2]{k_1} B$) e si mette la lente di ingrandimento non su una popolazione di canali, una popolazione di particelle, una popolazione di ioni, di molecole (sodio e cloruro), ma su una **singola**, vuol dire che k_1 e k_2 non sono i tassi di apparizione o sparizione, di formazione o di consumo. Sono la **probabilità istantanea** di poter fare una transizione, di legarsi. Quindi la singola molecola può (nel caso di un canale ionico) ha una certa probabilità istante per istante di cambiare stato, di saltare. E ogni volta

che io parlo di un fenomeno a cui attribuisco una probabilità, implicitamente sto dicendo “è come tirare una moneta”. Ce l’ho la moneta, se la tiro... evito di farlo, ma chissà cosa è venuto... o una specie di generatore di numeri casuali gratis, perché la natura è una natura stocastica.

Quindi in realtà è la stessa notazione ma un diverso significato, in cui A e B sono non più concentrazioni ma sono lo stato di occupazione. Nel caso di un canale ionico, un canale ionico io lo guardo e vedo se è aperto o chiuso. Nel caso di una molecola di sodio posso vedere se non è legata o è legata. E il modo corretto (ma vedrete in un attimo che la solita mia favorita equazione differenziale noiosa, sempre coefficienti costanti del primo ordine viene sempre fuori), però questa dizione dice che la probabilità che ci sia una transizione fra lo stato A e lo stato B nell’unità di tempo, condizionata al fatto che allo stato al tempo t (quindi al tempo attuale) io sia nello stato A (quindi non conta il passato, conta solo dove si è in questo momento). La transizione $A \rightarrow B$ non può avvenire se io sono in B . Se io sono in B può avvenire la transizione da B ad A . Quindi il fatto che stia usando queste probabilità condizionali... sì, sto pensando al teorema di Bayes che forse avrete orecchiato, ma non è cruciale. Sto semplicemente traducendo in un formalismo in cui le transizioni sono due, o da sinistra a destra o da destra a sinistra.

E la cosa importante è che queste probabilità sono probabilità che sono definite in un piccolo intervallo. Non so quanti di voi sanno o hanno un background relativamente ok di teoria delle probabilità o statistica. Non so quanto vi ricordiate (e probabilmente lo riprenderò, e se non lo riprenderò lo riprenderò in un altro corso l’anno prossimo). Esistono due tipi di variabili stocastiche o in realtà di processi stocastici: a tempo discreto o a tempo continuo. La probabilità che questo telefono squilli *adesso* è zero. La probabilità che una goccia di pioggia cada al centro della vostra testa è zero per un fatto matematico di misura nulla dell’insieme su cui fate una particolare integrazione. Mentre la probabilità che esca testa o croce... [correzione] non a tempo discreto, a tempo continuo... ha valori discreti e a valori continui. Una moneta ha solo due valori discreti, mentre l’istante di una telefonata è una variabile aleatoria che chiamo T_0 e questo T_0 è un numero che appartiene all’insieme dei reali (reali positivi supponete), quindi è continua.

C’è una differenza fondamentale, quindi è per questo che io qui sto dicendo che sto considerando un Δt , altrimenti non ha senso scrivere “la probabilità di transizione all’istante t ”. Quindi in teoria dovrei scrivere che la probabilità di transizione è data da queste quantità e questi k_1 e k_2 , se qui rappresentavano una velocità, un tasso (quindi dimensionalmente sono in unità di secondo⁻¹), conversione al secondo... conversione può essere adimensionale... “tre volte al secondo”, “al secondo” mi interessa. Quindi qui k_1 e k_2 non sono delle probabilità, sono delle probabilità istantanee o dei **tassi**.

Quindi la descrizione corretta di questo formalismo è che la probabilità di transizione è data da $k_1 \cdot \Delta t$. Non ve la faccio lunga, a rigore questa in realtà è l’espansione in serie di Taylor di una funzione arbitraria che non conosco ma di cui io specifico soltanto il primo ordine e dico che i termini di ordine successivo sono trascurabili. Però questo non ve lo dico e vi dico anche che la probabilità che in un intervallo di tempo Δt ci siano due transizioni è nulla perché scelgo Δt

sufficientemente piccolo. Questa è una cosa dell'espansione in serie di Taylor, di una quantità che è in generale una funzione del tempo arbitraria, cioè è una funzione Δt . Perché se io dico “qual è la probabilità che squilli il telefono da adesso per i prossimi due secondi?”, è chiaramente più piccola della probabilità “se squilla il telefono da adesso per le prossime cinque ore”. Questo intuitivamente lo potete comprendere. Probabilmente va a 1 la probabilità che quel telefono squilli da adesso a 5 ore. Però se io prendo il Δt molto piccolo, l'unica cosa che posso fare è dire, “ok, se è piccolo, penso che sia una funzione dell'intervallo e lo approssimo con Taylor”. Questa dizione k_1 è il prim'ordine di Taylor.

Il Modello di Hodgkin-Huxley: Collegare Cinetica e Conduttanza

Allora, perché la storia degli schemi cinetici Markoviani è molto interessante? Beh, è quella che Hodgkin e Huxley hanno utilizzato. Quindi di fatto per loro i cambiamenti di conduttanza G_{Na} , G_K (e nel loro modello, perché erano focalizzati sulla permeabilità di un particolare preparato biologico, l'assone gigante del calamaro) era tutto. E questo cambio di permeabilità lo hanno descritto in termini fenomenologici. Loro pensavano che ci fosse un qualche meccanismo elettricamente carico, però di fatto hanno detto “per me un canale è o **aperto** (*open*), oppure **chiuso** (*closed*)”. Non so, la permeabilità è dovuta a un numero di oggetti microscopici che può essere in due stati.

(Pausa, commento logistico sulla ciabatta)

Quindi noi i canali per il momento, per semplicità, li vediamo aperti o chiusi, o vediamo come se la sono cavati loro. Il *link* fra la componente elettrica e la componente di descrizione degli stati ve lo do adesso. Ed è fondamentalmente quella di considerare le conduttanze che vengono chiamate **attive** (perché non sono costanti nel tempo, non sono passive) come variabili. Sono conduttanze variabili, **voltaggio-dipendenti**.

Adesso vediamo dov'è che metto il voltaggio qui, dov'è che metto il potenziale di membrana. Una possibilità, pensando a quell'interpretazione microscopica (e anche qui non ci vuole un particolare genio), è che se i canali normalmente sono chiusi ma iniziano ad aprirsi quando il potenziale diventa depolarizzato, evidentemente è, almeno in questa transizione ($C \rightleftharpoons O$), da chiuso ad aperto... qui che era una probabilità nell'unità di tempo (la probabilità di fare quella transizione) oppure il *rate* nel caso mesoscopico, nel caso deterministico... è qui che verrà fuori la dipendenza dal potenziale. Ed è esattamente quello che si fa.

Cioè la conduttanza totale, per esempio supponete di parlare di G_K , dato che elettricamente noi avevamo accorpato (di nuovo cito Kirchhoff, cito le regolette dell'elettrotecnica del parallelo di resistori o parallelo di conduttanze eccetera), la conduttanza totale è la somma delle singole conduttanze. Quindi in qualche modo è il numero di questi canali (N) per la conduttanza del singolo canale (γ). Ora per fare prima dico che è il numero di canali **aperti** (N_{open}), perché se sono chiusi non contribuiscono alla conduttanza. Quindi il *link* è qui. La conduttanza dipende soltanto dall'occupazione di uno stato, nell'altro stato non c'è conduttanza. Potrebbero esserci cinque stati con valori intermedi di conduttanza. Nel caso semplice che vediamo adesso, nella descrizione di questi canali ionici di membrana, basta (è sufficiente, vi farò vedere in che termini è sufficiente) assumere che il canale o è aperto (totalmente aperto) o è chiuso.

Non è “leggermente aperto”. Però intuitivamente se sono dei cambiamenti di configurazione di struttura tridimensionale voi potreste dire “in uno stato può esserci una conduttanza minore di un altro”. Sembra che in natura la maggior parte dei casi ha che solamente uno stato coincide con uno stato elettricamente funzionale.

Quindi qui è il numero totale... scusate, il numero di canali aperti (per esempio di canali potassio) e questa è la conduttanza del singolo canale (γ), quando è aperto ovviamente. 10 picosiemens, una roba del genere, dell'ordine dei picosiemens. Se io ho 1000 canali e 500 sono aperti, sarà 10 picosiemens \times 500.

$$G_K = N_{open} \cdot \gamma_K$$

Magari potrebbe essere più utile ragionare in termini di **frazioni**. Cioè dire: “mi farebbe piacere poter sapere al massimo la conduttanza quanto può essere”. Quindi mi piacerebbe scrivere qual è la conduttanza massima... se me la fate scrivere così, \bar{g} . Questo qui è $\gamma \cdot N_{totale}$. Quindi questi sono canali aperti, vuol dire canali in questo stato. Qui sono tutti i canali e al massimo, quando sono tutti aperti, contribuiranno alla conduttanza con $\gamma \cdot N$. Vediamo come ve lo scrivo. Avendo moltiplicato questa quantità perché mi piaceva avere questo \bar{g} che è quindi $\gamma \cdot N_{totale}$. Adesso devo dividere perché qui è rimasto N_{open} , però per far tornare le cose (altrimenti non è un'equivalenza) devo ulteriormente dividere per N_{totale} , che ho moltiplicato qui, questo N_{totale} , il numero totale di canali.

$$G_K = (N_{totale} \cdot \gamma_K) \cdot \left(\frac{N_{open}}{N_{totale}} \right)$$

Questa quantità (N_{open}/N_{totale}) è esattamente una frazione. Quindi è 500/1000 canali totali, così che possa scrivere 0.5. Questo mi è molto comodo, anche dal punto di vista della descrizione sperimentale, perché mi astrae dal capire quanti canali sono. Allora, i canali, vi ho detto, sono entità discrete, e sono quantità che sono stocastiche (e poi vedremo perché), ma quando ne parlo a livello di popolazione, e particolarmente ai tempi di Hodgkin-Huxley in cui non si capiva se fosse una proprietà distribuita o concentrata della membrana, forse mi è più congeniale parlare di frazioni. E quindi io definisco questa quantità qua, $N_{grande,open}/N_{grande,totale}$, $n_{piccolo}$. Chiamo $n_{piccolo}$ una quantità che è fra 0 e 1. È una frazione, non può essere negativa perché i canali... è un numero, non può essere un numero negativo di canali aperti. I canali aperti sono da 0 a N_{totale} . Quindi al massimo questo rapporto può essere 100%, può essere 1.

Quindi notate, da qui ho moltiplicato e diviso per N_{totale} . E quindi mi piace scrivere $N_{totale} \cdot \gamma = \bar{g}$, g barra, barrato, per n .

$$G_K = \bar{g}_K \cdot n$$

E questa cosa qua in teoria la posso fare per tutte le conduttanze attive. Dove voglio andare a parare? La storia delle frazioni è uscita quando, poco fa, un'ora fa, stavamo parlando di schemi cinetici. Schemi cinetici come questo:

$$C \xrightleftharpoons[\beta]{\alpha} O$$

Permettetemi di chiamare questo α e questo β . Sono numeri, sono tassi di conversione, tassi di apertura o di chiusura. Se io voglio scrivere... se n è “numero di canali in questo stato (O) diviso il numero totale”... mi dite come devo scrivere $\frac{dn}{dt}$? Il solito giochino, solo che anziché k adesso sto usando α e β . Prima era A e B , adesso è O e C . E adesso sto pensando che qui è come se fosse n . E lì ovviamente lo dovete dirmi voi. Ricordate che nulla si crea, nulla si distrugge. Come scrivo $\frac{dn}{dt}$?

(Voce dal pubblico: Meno alfa n ...)

Non vi sento?

(Voce dal pubblico: Meno alfa n più beta...)

Perfetto. Ok? Quindi, ok, se volete sì. Possiamo fare un passaggio in più.

$$\frac{dO}{dt} = -\alpha \cdot O + \beta \cdot C$$

E poi... per C . Posso scriverla in modo... qui dovrei scrivere anche un'equazione per C . Mi consentite di scrivere che $C = W - O$ (una certa quantità meno gli aperti)? Quindi se è così, qui anziché C , sto usando W perché l'abbiamo utilizzato prima, $W - O$. Come scrivo... come passo a n , dove n_{piccolo} è “numero di canali che sono aperti rispetto al numero totale”? Quindi se volete, scusate, però è la stessa cosa, è O/W . Come diventa questa equazione? Diventa $\frac{dn}{dt}$. Resta praticamente uguale, ma vi stimolo a irrorare di sangue ossigenato il cervello.

$$\begin{aligned} \frac{d(O/W)}{dt} &= \frac{dn}{dt} = -\alpha \cdot \frac{O}{W} + \beta \cdot \frac{W - O}{W} \\ \frac{dn}{dt} &= -\alpha \cdot n + \beta \cdot (1 - n) \end{aligned}$$

(Voce dal pubblico: Meno alfa n ...)

Meno $\alpha \cdot n$, ok? E poi?

(Voce dal pubblico: Più beta per uno meno n)

Perfetto. E se volete posso fattorizzare, diventa $-(\alpha + \beta) \cdot n + \beta$. Ok?

$$\frac{dn}{dt} = -(\alpha + \beta) \cdot n + \beta$$

Ok, questa è la “storia” del valore del premio Nobel, perché α e β possono essere identificate sperimentalmente se voi riuscite a vedere per esempio lo *steady state* oppure il transitorio di questa equazione. E questa equazione, almeno in linea teorica, se α e β fossero costanti, io la so risolvere. Se α e β fossero delle funzioni che non so, che posso identificare sperimentalmente, fossero delle funzioni del

potenziale, ok, sarebbe un pelino più complicato, nel senso che non posso fare carta e penna, devo usare un computer per fare la simulazione.

Questa cosa qua, vi ricordo che qui è la stessa cosa che dire come cambia nel tempo la conduttanza totale (G_K), che è un valore massimo (\bar{g}_K) per la frazione di canali (n). È semplicemente scalata. Mentre n va da 0 a 1, questa quantità G_K va da 0 a 200 mS/cm². Non cambia nulla.

Sperimentalmente, Hodgkin e Huxley hanno potuto verificare (e adesso vi dico come), hanno potuto misurare le conduttanze. Nella realtà hanno misurato le correnti. Hanno misurato la corrente potassio (I_K), per esempio, che è $G_K \cdot (V - E_K)$. Ve lo rammento, V è il potenziale di membrana, ed E_K è -80 mV. Quindi E_K lo so perché magari sono stato io che ho messo le concentrazioni dentro e fuori il mio bagno e il mio assone gigante di calamaro. Quindi V magari lo so perché lo controllo io. Se misuro la corrente (I_K) posso ottenere la conduttanza (G_K). Ma se la conduttanza è $\bar{g}_K \cdot n$ (a parte questa quantità \bar{g}_K che sarà un numero, sarà quello che sarà), posso desumere il valore stazionario o di transitorio di n . E quindi se questo è il mio modello, posso fissare α e β . E se ci riesco, posso provare a rimettere tutto assieme in un modello matematico e vedere se quello che viene fuori è un potenziale d'azione. E la risposta è sì.

E il tipo di formalismo è così vincente che lo usiamo ancora oggi per una corrente che sia potassio con inattivazione, oppure una corrente che si chiama corrente muscarinica, oppure (lo vedremo) si usa per descrivere la corrente che scorre attraverso un recettore glutammatergico ionotropico, che dovreste... ho orecchiato che qualcuno di voi mi ha detto che evidentemente Zoli sta facendo i canali ionici, quindi i recettori post-sinaptici, dipendenti da ligando (o ligando, non so come si dica). Quindi non soltanto voltaggio-dipendenti, ma dipendenti dalla concentrazione di un neurotrasmettitore in un certo punto. Sono sempre canali, sono sempre pori. Vi farò vedere che esattamente lo stesso formalismo funziona.

Torniamo qui. Qui è un pochino complicato. Il potassio, se vi ricordate in quel cartone, si apre con un certo ritardo. Voi non l'avete mai vista, l'equazione scritta come $\tau \frac{dn}{dt} = -n + \dots$ (qualcosa, per esempio, fatemelo chiamare n_∞)? Non avete mai visto un'equazione differenziale scritta così? È semplicemente la stessa identica equazione in cui ho messo una quantità, un parametro che chiamo τ (tau). L'ho messo qui perché se divido ambo i membri per τ , qui mi viene $1/\tau$. E questo $1/\tau$ è esattamente quello che va nell'esponenziale che mi rende felice: $e^{-t/\tau}$ (grazie a Dio). Quindi τ mi dice (o lo mettete qui, o lo mettete qui sotto al denominatore) qual è la scala temporale.

$$\frac{dn}{dt} = -\frac{1}{\tau_n} \cdot n + \frac{n_\infty}{\tau_n} = -\frac{n - n_\infty}{\tau_n}$$

Questa cosa qua ($\alpha + \beta$), alla fine, è l'inverso di un τ , perché vedete è al numeratore. E mi torna, perché α e β erano tasso, quindi "per unità di tempo", oppure "transizioni per unità di tempo". Quindi questo è l'inverso di un tempo. Quindi $1/(\alpha + \beta)$ è un tempo. Quindi questa cosa qua ($\alpha + \beta$) mi dice quanto rapidamente... eventualmente non c'è più la parola *delayed*... eventualmente se un canale oppure un altro ha, semplicemente per questi coefficienti cinetici, ha una capacità di reazione più lenta.

Di nuovo, la solita stupida equazione differenziale del prim'ordine a coefficienti costanti che si fa in Analisi 1, comunque che è sempre quella, è sempre... E da qui io leggo qualcosa: che se un canale è più tardivo, è più ritardato, più lento ad attivarsi o inattivarsi, deve essere per via di questi due numeri. Ok, saranno delle funzioni, ma numericamente quelle funzioni saranno diverse, saranno (in particolare adesso che sono al numeratore) saranno numeri piccoli. Cioè il *rate* di transizione... 1 su una quantità piccola vuol dire che è una quantità grande, quindi una τ grande, quindi qualcosa di lento, che ha una scala temporale lenta di qualche millisecondo, anziché il sodio (che adesso ve lo faccio vedere, per il momento non ne stiamo parlando) che invece era velocissimo ad attivarsi, perlomeno ad attivarsi.

Quindi questo è il tipo di formalismo in cui n si richiama direttamente agli schemi cinetici.

Assunti Fondamentali del Modello Prima del sodio vi devo però dire quali sono gli assunti fondamentali di questo. Questo non vale sempre.

1. **Descrizione di Popolazione (Mesoscopica):** Io sto pensando che questi canali li sto descrivendo come una **popolazione**, tanto che li descrivo come “frazione di canali aperti”. Non sto descrivendo *quel* canale, potrebbero essere migliaia o milioni (poi lo facciamo), ma per il momento stiamo descrivendo un sistema deterministico, mesoscopico. Un coro fatto da così tante voci che anche se c'è uno stonato non si sente. Più il coro è grande (sarà esperienza comune), tanto meno le singole voci contano, perché è una sommazione, una media. La sommazione dei suoni (perché al mio orecchio arrivano onde di pressione che si sommano) oppure la sommazione di correnti o di conduttanze (Kirchhoff) è la stessa cosa. Dire “somma” o dire “media aritmetica” è la stessa cosa, la media aritmetica è solo ulteriormente normalizzata ma anche lì è una somma. Evito di citare qualche teorema di teorie delle probabilità, ma anche lì il comportamento irregolare, stocastico, diventa più simile al comportamento medio (in quel caso è la media di insieme) quando ho un numero elevato di oggetti o di tentativi. Quella che forse avete sentito descrivere come la **Legge dei Grandi Numeri**: se faccio testa o croce un miliardo di volte, grosso modo la frazione diventerà 50 – 50 se è una moneta buona.
2. **Indipendenza Statistica:** Siamo comunque in un contesto deterministico e quindi collettivamente questi canali, una popolazione, subiscono dei cambi di conformazione e l'unica variabile di controllo è il campo elettrico che entra qui ($\alpha(V), \beta(V)$) perché questi canali sono intercalati nella membrana. Questo è importante perché nel momento in cui scriviamo così stiamo dicendo che siano **statisticamente indipendenti**. Sono identici e statisticamente indipendenti, nel senso che se siamo tutti dei canali, se io mi apro non influenzerò direttamente voi ad aprirvi perché il mio stato è cambiato. Al massimo vi posso influenzare perché se è una struttura morfologicamente distribuita, io qui mi apro, cambia il potenziale localmente, magari questa perturbazione del potenziale elettrico è l'unica cosa che ci accomuna. Ma non c'è un fenomeno di **cooperatività**, cioè del fatto che se due o tre o cento o quello che è canali si aprono, allora gli altri si aprono ancora di più. È un'ipotesi che c'è in molti contesti della

biologia, non sembra esserci nel caso dei canali e funziona perché possiamo fare questa descrizione che è la somma, la media. Se non fossero statisticamente indipendenti ci sarebbero dei problemi, non potremmo descrivere la loro frazione...

3. **Stati Discreti e Proprietà Markoviana:** Ok, ci sono questi stati discreti in cui la popolazione trasloca, si muove. Questi sono i coefficienti voltaggio-dipendenti che vi ho anticipato. E questa alla fine è la legge di azione di massa: la reazione non dipende dal passato, dipende soltanto dalle concentrazioni dei reattanti, cioè dipende dallo stato attuale (se sono nello stato aperto o se sono nello stato chiuso). Questa è la **proprietà Markoviana**, non dipende dal passato. Ed è esattamente quello che capita con le reazioni chimiche, in cui non sto pensando che se due ioni, sodio e cloro, si legano, influenzano (perlomeno in quei termini semplici, se la soluzione è sufficientemente diluita) come altri due ioni vicini si combinano oppure si dissociano.

La Sfida Sperimentale: Il Voltage Clamp La complicazione che ha richiesto a Hodgkin e Huxley non solo di sporcarsi le mani dal punto di vista matematico, ma anche elettronico paradossalmente, è quella che accennavo l'ora precedente. Cioè il fatto che i cambiamenti di conduttanza (G) provocano (perché provocano delle correnti, I) dei cambiamenti di potenziale (V), perché c'è l'equazione di bilancio della carica che dice che $C \frac{dV}{dt}$ è uguale alla sommatoria di queste correnti.

$$C \frac{dV}{dt} = - \sum I_{ionici} = - \sum G_{ionici} \cdot (V - E_{ion})$$

...fatemelo scrivere con I , ok, per come l'ho scritto qui ci va un meno, per come ho scritto $V - E$, altrimenti sono... Quindi se io cambio G , cambio I . E cambiando I cambio V . Ma cambiando V cambio questi α e β ! E cambiando α e β cambia n e quindi cambia G .

E ovviamente, come molti fenomeni in biologia, è esattamente un **feedback** (positivo o negativo, non importa a questo momento), ma io vorrei disaccoppiare. Se devo misurare delle quantità è molto complicato vedere che cambia la corrente, quindi cambia la conduttanza e cambia il potenziale; cambiando il potenziale cambia la conduttanza. Mi servirebbe un modo per isolare le cose.

E Hodgkin e Huxley si sono inventati un **amplificatore elettronico a feedback**, capace (aiutati anche dalla particolare configurazione geometrica, per la verità, dell'assone gigante del calamaro) di misurare il potenziale istantaneo, di paragonarlo con un valore desiderato e di, a seconda se... quindi creare un segnale di errore. Se il potenziale è -65 mV, ma io ho come potenziale mio... voglio imporre... adesso voglio studiare se i canali sono chiusi o aperti a -70 mV, ma il potenziale sta cambiando a -65 mV, c'è una specie di differenza. E questo errore viene iniettato dentro sotto forma di corrente, una corrente negativa. Quindi se era -65 mV, se io inietto una corrente negativa, il potenziale tende a diminuire, magari diventa -72 mV. Adesso -70 mV (desiderato) -72 mV (attuale) è una quantità positiva o negativa... quello che è... positiva. Quindi adesso inietto... cambio questo feedback (che ovviamente deve agire su scale temporali

abbastanza veloci, non troppo altrimenti inizia ad avere delle oscillazioni, ma questo è un altro discorso), inietto una corrente positiva. Anziché -72 mV adesso diventa -70 mV.

Quindi sto facendo un sistema di controllo **P** (proporzionale). Avete forse orecchiato in ingegneria il sistema di controllo PID, per esempio. Sono sistemi di controllo più semplici possibili: Proporzionale, Integrativo, Derivativo. Qui è semplicemente sulla base di un errore, un amplificatore a feedback corregge e tende, si dice, a **clampare** (dall'inglese *clamp*, che vuol dire pinza, se non mi ricordo male), blocca il potenziale a un particolare valore.

Mi serve bloccare il potenziale a un particolare valore perché io ho quel dannato $C \frac{dV}{dt}$. Se V non cambia nel tempo (e non cambia nel tempo perché c'è un accrocchio elettronico attaccato a un preparato biologico che agisce elettronicamente molto più rapidamente del preparato biologico e tiene V costante), $\frac{dV}{dt}$ è 0. E quello che mi resta è $\sum I = 0$.

Quindi in teoria se io misuro la quantità... quindi se per caso il potenziale di membrana dovesse cambiare (e lo fa per motivi endogeni, perché queste dannate conduttanze si sono svegliate, si sono attivate, si stanno chiudendo, si stanno aprendo), il potenziale cambia e io devo iniettare una corrente artificialmente dall'esterno che compensi *esattamente* quella corrente che ha determinato il cambiamento di potenziale. Quindi esattamente riesco a misurare la somma delle correnti. E questo è un primo importantissimo punto. Quindi se io riesco ad annullare questo, guardando il segnale di feedback che devo usare per tenere V costante, riesco a vedere che cosa sta succedendo a livello di correnti.

Ecco la ventesima parte del testo, più estesa come richiesto.

L'Uso delle Tossine per Isolare le Correnti Quindi questo è un punto geniale di Hodgkin e Huxley. Non basta. Hanno dovuto utilizzare, perché altrimenti avreste avuto la somma delle correnti... visto che sia il sodio che il potassio ciascuna, supponete, cambia la propria conduttanza con equazioni simili (non identiche, non sono... avete visto prima, il sodio si attiva prima, poi c'è una specie di botola che lo chiude dall'interno del citoplasma, il potassio si attiva in ritardo, evidentemente questa quantità α e β sono in termini assoluti più piccoli, bla bla bla bla). Vorrei spezzare tutte le cose, se no li vedo sovrapposti e non ho risolto un granché.

La risposta è venuta fuori dalla disponibilità di **tossine** che alcuni animali velenosi (fra cui ragni, pesci e altre specie) producono proprio perché sono neuroattivi, proprio perché si legano specificamente ad alcuni canali.

C'è una tossina che è la mia favorita perché quando per motivi sperimentali la compriamo in laboratorio perché ci serve (adesso capirete perché), si chiama **tetrodotossina**. È una bella sigla che è **TTX**. Quando si compra il TTX, dato che è qualcosa che è abbastanza pesante, bisogna firmare una dichiarazione per cui uno dice "dichiaro di non essere un terrorista, di non voler usare la tetrodotossina per scopi di terrorismo". Quella tossina è un potentissimo bloccante, si dice antagonista, selettivo dei canali sodio. Mi mette a zero la conduttanza totale. È un tappo dall'esterno, tappa i canali, la bocca esterna dei canali (magari è un po' più complicato di così), però si lega a un sito di legame nella parte

extracellulare dei domini delle subunità del canale sodio e blocca la conduzione ionica attraverso quel canale.

Se così è, io potrei avere risolto e potrei con questo amplificatore che si chiama *voltage clamp* (perché clampa, tiene fissato il potenziale) potrei studiare la cinetica e potrei identificare i parametri della **sola corrente potassio**. Ripeto, lo so che la corrente che misuro (I_K) è $G_K \cdot (V - E_K)$, ma questo (E_K) lo so che è $-80, -90$ mV perché lo misuro, perché so le concentrazioni che ho messo. V_m lo sto tenendo fissato a un valore che dico io, grazie all'amplificatore. Questa quantità ($V - E_K$) è un valore costante. $G_K = \bar{g}_K \cdot n$. Alla fine se mi interessa soltanto il transitorio, posso prendere la corrente che misuro, dividere per questa quantità che so (perché è una quantità che posso calcolare), e avrò al massimo... avrò in termini scalati, n . Lo vedrò come... a meno di un fattore moltiplicativo. E lo posso fare perché non ho più interferenza da parte del sodio.

Esiste un'altra tossina in cui in questo momento non mi ricordo da che bestia viene. Se non mi ricordo male, questo [TTX] viene dal *puffer fish*. Quello che nei ristoranti giapponesi non potete mangiare se non è particolarmente... il cuoco... non è il sushi, ma se non lo tratta bene perché altrimenti ovviamente vi blocca i canali sodio, quindi voi non respirate più e quindi morite, non ci sono più potenziali d'azione.

C'è un'altra tossina che si chiama **TEA** (non mi ricordo per cosa sta... tetraetilammonio, [correzione: tetraetilammonio])... lo guardate su Wikipedia. Questa cosa qua è specificamente una tossina, un antagonista selettivo per le **correnti potassio** (per alcune correnti potassio). E questo è il dono della natura che ha creato degli animali pericolosissimi, ma visto che devono ammazzarti nel modo più efficace possibile, ti blocca esattamente quel canale oppure quest'altro per crearti dei deficit motori e paralizzarti alla fine delle fini. Quindi blocca, legandosi nella parte extracellulare della bocca del canale potassio voltaggio-dipendente, e blocca la conducibilità.

Quindi se io lo faccio mettendo solo TEA anziché TTX, posso studiare le **correnti sodio**. E di nuovo faccio la stessa cosa. Non entro tanto nel dettaglio, questo è solo perché il tipo di lavoro sperimentale di Hodgkin e Huxley non è banale, non è quello del "semplicemente mi sono svegliato e ho trovato le equazioni che funzionano". Le hanno validate e hanno identificato i parametri sperimentalmente.

Parametrizzazione: τ (Tau) e n_∞ (n-infinito) Quindi per il potassio questo è quello che abbiamo, vi ho già raccontato. E se mi permettete di dividere da ambo i membri per $(\alpha + \beta)$, questo non c'è più perché l'ho portato di qua. Però dividendo e moltiplicando devo comunque ricordarmi che lo devo dividere qui. Quindi è per questo che ho $1/(\alpha + \beta)$ qui, qui non ho più nulla (però il segno meno che mi ricorda che quasi sicuramente queste cose non esplodono, di nuovo è un sistema dissipativo) e poi ho una quantità $\alpha/(\alpha + \beta)$.

$$\frac{1}{\alpha_n + \beta_n} \frac{dn}{dt} = -n + \frac{\alpha_n}{\alpha_n + \beta_n}$$

Torna con il mio intuito? Perché $\frac{dn}{dt}$... n è una frazione quindi è adimensionale,

però $\frac{dn}{dt}$ ha unità di misura 1/tempo. 1/tempo moltiplicato... [correzione] τ (perché questi qui sono l'inverso di un tempo) si semplifica col tempo [correzione: τ ha unità di tempo, non 1/tempo]. Quindi a sinistra dell'uguale resta una quantità senza dimensioni. Qui è pure una quantità senza dimensioni e questo pure deve diventare una quantità senza dimensioni. Quindi visto che α e β hanno dimensioni dell'inverso di un tempo, $\alpha/(\alpha + \beta)$ di nuovo è adimensionale perché numeratore e denominatore hanno la stessa dimensione.

E posso pensare che questa quantità la chiamo τ (tau), perché ha il significato di un tempo, della costante di tempo di quella equazione.

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

E questa quantità qui la chiamo n_∞ (n-infinito), perché è quello... come "infinito" per me, è quello che se esiste lo *steady state* (potrebbe non esistere però), se esiste, cioè penso di far andare $t \rightarrow +\infty$, di fare il limite per $t \rightarrow +\infty$, se esiste uno stato *steady state*, allora n non cambia più nel tempo. Allora questa quantità, la derivata, è 0. Qui è 0, a sinistra è 0, ed n , per essere 0, deve prendere esattamente questo valore qui. Quindi io so che questo qui è il valore che prenderebbe n se esistesse lo *steady state*. Quindi lo chiamo n_∞ .

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

$$\tau_n \frac{dn}{dt} = -n + n_\infty$$

Perché lo fa? Perché faccio così? Perché sperimentalmente potrebbe essere più facile lavorare con τ e n_∞ piuttosto che con α e β . Entrambe sono funzioni del potenziale, ma potrebbe essere più semplice dire "ok, hai questo ambaradan, questo aggeggio elettronico che ti clampa il potenziale di membrana. Vabbè, fai che... diciamo, imposta tu un profilo del potenziale di membrana in cui lo cambi come un gradino". Ok, avrai una qualche... la corrente pure evidentemente si aprono, si chiudono, fanno qualcosa i canali, però a un certo punto vado a uno *steady state*. Con quegli esperimenti posso istantaneamente capire qual è la dipendenza dal potenziale, se faccio più valori di potenziale, di questo n_∞ . Se ho α e β , dato che α e β sono... è un po' più complicato, un po' meno facile. Posso sempre passare dalle τ e dalle τ_n e n_∞ , posso passare alle α_n , β_n . (Inizio a dire α_n e β_n perché per il sodio avrò delle altre quantità).

Analogia: Il Filtro Passa-Basso Un intermezzo che risuona con quanto uno di voi mi aveva chiesto all'intervallo. Di nuovo, non sono un matematico, quindi posso allentare la stretta del formalismo matematico rigoroso che però fin qui abbiamo mantenuto. Ma ogni volta che ho un'equazione di questo tipo ($\tau \frac{dx}{dt} = -x + x_\infty$), non so voi (probabilmente voi avete dei pensieri più sani), ma a me viene in mente un **filtro elettronico**. Mi viene in mente una scatola, una scatola nera in cui x è l'uscita e x_∞ è l'entrata. In particolare per come è scritto questa cosa qua mi viene in mente un RC, mi viene in mente un **filtro passa-basso**. Mi viene in mente qualcosa che quando anche io gli butto dentro

qualcosa che è molto rapido come un impulso, lui me lo attenua, mi smorza, è un po' pigro, ha un'inerzia, ha questi archi di esponenziale. Però dal punto di vista quantitativo del praticone ingegnere elettronico dice "ok, sì, mi stai smussando gli angoli". Questo fa un filtro passa-basso: se tu vai troppo veloce io ti taglio in frequenza e quindi passa solo quello che è più basso, passano le componenti in frequenza più basse.

Al di là del fatto che sì, matematicamente lo potete scrivere con l'integrale di convoluzione, nel caso generale in cui x_∞ non sia né costante né sinusoidale, potrebbe essere una funzione arbitraria. Quando è così è... se vi piace lavorare nel tempo, questa pizza dell'integrale di convoluzione... poi è una pizza... è ovviamente una pizza nel caso in cui x_∞ sia generico. Nel caso in cui sia una funzione nota, questo integrale di convoluzione potrebbe essere meno... potrebbe intimidire di meno. Nel caso invece siate più propensi a stare nel dominio delle frequenze (Laplace o Fourier che sia), sapete che l'integrale di convoluzione diventa un prodotto nel dominio delle frequenze, perché le equazioni differenziali nel tempo hanno come corrispondenza nel dominio delle frequenze, nel dominio trasformato, una forma algebrica molto più semplice. Qui è un'equazione differenziale, nel dominio trasformato diventa un'equazione algebrica. È per questo che si usa Fourier o Laplace in elettronica o in teoria dei sistemi. Noi non lo faremo.

È semplicemente per dirvi che questa cosa del filtraggio è universale. E il fatto che questo sia un filtraggio passa-basso spiega bene il perché. Se io come ingresso in un sistema tipo quello che abbiamo visto assieme del comportamento passivo di una membrana non eccitabile, sia soggetto a un ingresso esterno che cambia rapidamente come un gradino, è come se io socchiudo gli occhi, strizzo gli occhi... in realtà non vedo benissimo queste transizioni, vedo più sfocato. In effetti l'uscita è come se fosse l'ingresso sfocato. Questo per dire che ogni volta che vedete un'equazione del genere (quando è così, quando è scritta così del primo ordine, non importa se ha coefficienti costanti o no... anzi coefficienti costanti lo sappiamo fare analiticamente, se non sono costanti mi attacco al tram con questo tipo di convoluzione), di fatto posso pensare che sia un modo in cui l'uscita **insegue** l'ingresso, a parte un ritardo. Qui se vedete questo arco di esponenziale che prima sale e poi scende, in effetti l'uscita sta imitando l'input che era un input DC che saliva e scendeva, a parte un po' di pigrizia, *sloppiness*, un po' di trascuratezza. Vedete che non sale su di botto, ci impiega un po'.

Quindi, quale che sia la complessa forma di questo ingresso, l'uscita alla fine lo segue con un ritardo (è sbagliato questo che dico ovviamente, però a spanne non particolarmente). Quindi quando ho gli input tempo-invarianti lo posso fare analiticamente, ma quando non ce l'ho è come se posso dire (di nuovo) se l'ingresso varia molto molto lentamente, posso pensare che sia costante, quindi è banale dire "ok, x è istantaneamente... è sempre allo *steady state*", perché x_∞ cambia molto molto lentamente. Se x_∞ cambia un pochino più rapidamente, forse x continua a inseguirlo, ma non ci sta dietro, perché x si muove un po' più lentamente perché è un filtraggio passa-basso. Questa è un'informazione molto utile e ci torna utile per capire questa cosa che alcuni canali sono lenti nell'attivarsi. Che vuol dire "lenti"? È lenti in questo caso qui.

Le Curve di Attivazione e Inattivazione Ora vi faccio vedere come, prima del break, come Hodgkin e Huxley hanno sistematicamente analizzato

questi n_∞ . Adesso qui vi do sia α e β , sia n_∞ e τ . E vi suggerisco di guardare τ ed n_∞ perché τ vi dice quant'è l'inerzia, quanto è lento il sistema a reagire. n_∞ vi dice qual è lo *steady state*, qual è il punto in cui questa equazione dove va, cosa insegue. Mentre α e β sì, hanno un'interpretazione (“è facile che il canale da chiuso si apre”, e vi ho detto “i canali si aprono quando il potenziale è depolarizzato”), però funzionalmente non lo capisco con la storia del “ho bisogno che il sodio si apra, perché quando si apre ho la prima fase; se si aprisse anche il potassio non andrei su, resterei più o meno piatto, perché il potassio è forte, mi vuole tenere a [valori negativi]”. Quindi prima deve aprirsi il sodio, poi dopo un po' deve aprirsi il potassio, così che il potenziale ha tempo di salire e poi di scendere. Se non ho questo ritardo non mi funzionano le cose. E il ritardo mi deve venire fuori da qua, scusate, dalla τ , non da n_∞ . Dalla τ , perché è la τ che mi controlla questa dinamica.

Canale Potassio (Variabile n) Allora, vi devo far vedere solo questo perché gli altri sono dei canali sodio e ve ne parlo fra poco. Vedete che la τ_n (quindi questo grafico è stato ottenuto facendo un particolare esperimento, sistematicamente con questo amplificatore di *voltage clamp*, fissato a -100 mV, poi fissato a -98 mV, poi fissato a -90 mV, poi fissato a -80 mV... cercando di coprire tutto questo *range*). E vedete che la τ_n è una **funzione del potenziale**, quindi scordatevi che io riesca a fare le cose analiticamente d'ora in poi, perché non sono coefficienti costanti. Sì, è la solita equazione differenziale lineare del primo ordine, ma i coefficienti non sono costanti. Quindi devo farlo numericamente, magari invoco Eulero, oppure Runge-Kutta. Ho bisogno di un metodo numerico che nella parte di *refresh* matematica (se qualcuno di voi ne ha avuto bisogno) l'avete trovata. Se no, assumo che grossomodo voi tutti sappiate come implementare un metodo numerico scarso come quello di Eulero (però sputaci sopra, è una cosa utile).

Quindi cambia nel tempo, però grosso modo dal punto di vista delle unità di misura è dell'ordine di **qualche millisecondo**. Ha come picco a -70 mV 5 millisecondi. Quindi vuol dire che quando il canale è chiuso (se mi permettete questo *stretch*), il canale è chiuso, il potenziale di membrana è a -70 mV, poi il potenziale inizia a depolarizzarsi... però quindi sì, n tende a seguire n_∞ .

n_∞ ha questa forma qui, questa **sigmoide**. Il fatto che sia una sigmoide è profondo perché ha ispirato gran parte del *machine learning* odierno, dove tutto... le unità di una rete neurale artificiale... ha delle curve di attivazione che sono (adesso si usa solo *threshold linear*), in altri paradigmi, in altri contesti, i perceptron hanno una funzione di trasferimento che è sigmoidale, che è satura. Qui deve saturare perché la frazione di canali aperti o è 0 o è 1 o è in mezzo, non è che può diventare 1.5, non ha senso, al limite è fra 0 e il 100%.

E vedete che la cosa che vi ho detto, cioè “i canali [potassio] si aprono quando il potenziale è depolarizzato”, è tradotta da questa sigmoide perché per potenziali che sono iperpolarizzati (-100 mV, -70 mV), praticamente la frazione è zero (che non è esattamente zero, dovete leggere in quest'asse qui). Supponete a -70 mV sarà 0.2, 0.1, 0.15... 15% dei canali sono aperti a riposo. Ma quando il potenziale lo muovo sempre più (staticamente, ovviamente), lo muovo più verso potenziali depolarizzati, vedete che questo cresce e a un certo punto arrivati a... quindi il punto alla metà è attorno a -50 mV. Quindi se io supero

–50 mV, quello che avviene dopo è ulteriormente... satura e da 0 mV in poi potete aumentare ancora, quelli sono i canali, sono tutti aperti.

E la τ ... quindi n_∞ è quello che n insegue. Quindi G_K (la conduttanza del potassio) insegue questa curva qui, a seconda del potenziale come va. Chiaramente questo inseguimento è... [limitato] a meno di una separazione delle scale temporali, che è un'ipotesi semplificativa che ho fatto poco fa per questa cosa che " x insegue x_∞ ". L'uscita di un filtro insegue l'ingresso del filtro, a parte un ritardo. Quanto ritardo? Dell'ordine di qualche millisecondo. Sì, i millisecondi si riducono, diventano 1 – 2 millisecondi, però è sempre un oggetto che è lento a reagire, lento come 1 – 2 millisecondi. Per questo si chiama **delayed**, ritardato. Per questo si chiama "l'apertura è ritardata".

Canale Sodico (Variabili m e h) Nel caso del sodio, dei canali sodio, che finalmente prima dell'interruzione vi dico, vedete che la curva di attivazione m_∞ (lo chiamo m anziché n , però la forma dell'equazione è la stessa). Vedete che anche questo praticamente è quasi indistinguibile, è semplicemente un pochino più *steep*, un po' più ripido e forse è un pochino più traslato sulla sinistra, se mi ricordo bene. No, addirittura è traslato sulla destra, quindi paradossalmente a potenziali un pochino depolarizzati si aprirebbe prima il potassio e non il sodio, se non fosse che il potassio è molto lento.

Guardate la τ_m , quindi la dinamica temporale di quell'equazione per il sodio (m) a che valori è? È una **frazione di millisecondo**. Semplicemente leggo sull'asse. Ho capito che anche questa non è una costante ma è una funzione che cambia nel tempo, alla fine è una funzione che cambia non troppo drammaticamente, è una specie di gaussiana, di curva a campana. Qui è dell'ordine di frazione del 0.1 – 0.2 millisecondi. Quindi è per questo che il sodio parte subito e il potassio parte dopo, perché il potassio ha almeno uno o due ordini di grandezza di velocità più lenta per attivarsi.

Però questi grafici sono tre, perché viene fuori che per via di quella disgraziata (o non disgraziata, utilissima) botola intracellulare che crea il fatto che il canale possa essere anche aperto, ma è **inattivo**. E questo ve l'ho detto all'inizio della lezione di oggi dicendo che "è una cosa utile per rallentare e quindi rendere molto più *sharp*, molto più breve, più scolpito, più definito, più breve la durata del potenziale d'azione". Per farlo devo immaginare che ci sia una dinamica temporale di quel *gate*.

Attualmente sto pensando che un canale potassio, io me lo immagino così, e qui ha una specie di cancelletto. Questo cancelletto è un dispositivo che può saltare da due stati, aperto o chiuso. Questo è potassio, questo sarebbe selettivo al potassio e visto che il potassio (supponete che qui sia dentro e qui sia fuori), gli ioni potassio vanno da dentro a fuori. Per il sodio, anche qui mi immagino che ci sia un cancelletto, però c'è questa cosa che viene anche chiamata modello *ball and chain* (catena e pallina/sfera), o botola o quello che volete, in cui questa pallina a un certo punto blocca dalla parte intracellulare.

Potreste anche pensare che questo oggetto qua sia un ulteriore cancelletto che però funziona con una **logica inversa** (per usare un termine che magari è familiare a qualcuno in elettronica dei sistemi digitali). Cioè anziché aprirsi quando il potenziale si depolarizza (come fa l'altro), funziona al contrario, si chiude.

E infatti se voi guardate questo grafico di mezzo che ha una variabile di stato che non si chiama n (del potassio), non si chiama m (che è la variabile di attivazione del sodio), si chiama h (per motivi storici di Hodgkin e Huxley l'hanno chiamata così), e ha a che fare con questo *gate* di inattivazione. Vedete che questa sigmoide funziona con logica inversa: cioè quanto più voi siete iperpolarizzati, tanto più h è al 100%, cioè sono tutti questi *gate*... sono aperti. E torna, perché in quel cartone che vi ho fatto vedere, quando il potenziale era molto polarizzato, molto negativo, il canale era chiuso (questo è chiuso qui, m è chiuso qui), ma la botola di sotto era aperta, era spalancata. Perché? Perché qui h_∞ è al 100% o quasi. Quanto più il potenziale tende a depolarizzarsi, tanto più (e abbastanza rapidamente) questo tende a chiudersi.

Con che velocità il sodio tende a inseguire... allora, la variabile h tende a inseguire il suo *steady state*? Vedete che τ_h , che è questa curva tratteggiata, è addirittura **più lento del potassio**. Quindi grosso modo, diciamo è un fattore forse 2 più lento del potassio, comunque è dello stesso ordine di grandezza del potassio rispetto al sodio. Il sodio è una Ferrari, cioè a 0.1 – 0.2 millisecondi reagisce rapidamente con quella scala temporale, con quella costante di tempo. Ma il fatto che poi la botola piano piano si chiuda e poi anche i vicini canali potassio si aprano ha una latenza, e questa latenza è data da quest'ordine di grandezza. Qui dell'ordine di qualche millisecondo, qui di nuovo da 5 a 1 ms, qui da 8 a 1 ms.

Quindi ovviamente le cose interessanti avvengono fra -70 , -80 mV a $+20$ mV, per questo che questo grafico è stato fatto qui. E con questa descrizione vi faccio vedere dopo l'intervallo che riusciamo a fare una simulazione dettagliata di come funziona, di come emerge il potenziale d'azione. Mi fermo qui per dieci minuti.

Ecco la ventitreesima parte del testo, più estesa come richiesto.

Assemblare il Modello Completo

Ok, allora qui vedete la storia di nuovo della botola e del canale... della parte di attivazione e di inattivazione. Quindi in analogia con quanto detto per i canali potassio, per i canali sodio (perlomeno per la loro attivazione e inattivazione), avete di fatto una descrizione simile, qualitativamente ma quantitativamente, numericamente diversa. Ora queste curve qui, fra un po' ve le faccio vedere, sono delle funzioni brutte, numeriche, però non importa perché comunque stiamo entrando nella condizione in cui non facciamo più carta e penna nulla, bisogna usare un metodo numerico di simulazione di quattro equazioni differenziali (a questo punto, che vi faccio vedere) e quindi tanto vale buttare dentro quello che è brutto perché è stato identificato sperimentalmente. C'è una componente un po' più profonda dal punto di vista dell'interpretazione biofisica, ma non ve ne parlo, ve la accenno soltanto.

threshold C'è una Soglia di Eccitabilità? Quindi una prima domanda interessante che potreste porvi è se, arrivati fin qui, potreste concludere se c'è o meno una **soglia di eccitabilità**, una soglia discreta che fa... che dovrebbe motivare (se è una cosa motivata, e potrebbe non esserlo, non lo è) che descrive

un motto, una descrizione standard in letteratura o sui libri di testo, che dice che i neuroni sono dei dispositivi **tutto o nulla** e che hanno, superata una soglia di eccitabilità, emettono (quindi se l'input è sufficientemente grande) un potenziale d'azione.

Qui non è facile individuare, non ci sono interruttori, non ci sono funzioni che dipendono dal potenziale di membrana in modo binario. “Adesso la probabilità è zero, tu te ne stai nello stato chiuso e zitto”, oppure “adesso la probabilità è elevatissima... la probabilità per unità di tempo è elevata di fare la transizione chiuso-aperto”. C'è una sigmoide che sì, è parente del gradino, è parente di uno *switch*, di un interruttore. Alla fine il gradino corrisponde dal punto di vista del linguaggio di programmazione a quello *statement* che si chiama **IF-THEN-ELSE**. **IF-THEN**: “se c'è una condizione allora fai qualcos'altro”. In biologia non ci sono le leggi booleane o i transistori, i circuiti digitali, o perlomeno non sono come quelli fabbricati dall'uomo, quindi non è così sorprendente il fatto che non ci siano dei comportamenti binari. E vi faccio notare che anche in elettronica i transistori non hanno un comportamento binario, sono utilizzati in un regime in cui le transizioni sono binarie, ma in alcuni contesti di funzioni di trasferimento sono più simili a una sigmoide. Questa è una cosa abbastanza profonda.

Esiste un potenziale di membrana superato il quale tutti i canali sono aperti? No. Forse attorno a -50 mV, ma ci sono delle considerazioni che vi farò vedere dopo. Sì, attorno a -50 mV c'è il punto di mezzo dell'attivazione dei canali potassio allo *steady state* (quindi figuratevi il transitorio), comunque non è che i canali sono... n è già direttamente uguale a n_∞ , ci deve andare, lo deve inseguire. E non è solo lui in isolamento, c'è anche il sodio che collabora. Ma comunque, per il sodio vedete che forse è un pochino più... il punto di mezzo è maggiore di questo -50 mV. E per il *gate h* di inattivazione è ancora più iperpolarizzato. Quindi forse un valore... da qui, da questa analisi che è statica, di soglia di eccitabilità (che si sente sempre e che addirittura sperimentalmente si usa, ma in un altro contesto), qui non ce n'è traccia. È più un sistema analogico che ha una propensione a fare una transizione. Qui si parla di frazione di canali: “il 50% da questo punto in poi di canali potassio sarà aperto”, “qui il 10% di queste botole di inattivazione dei canali sodio voltaggio-dipendenti non sarà più disponibile, l' 80% o il 90% è già chiusa”, eccetera.

Le Equazioni Finali del Modello È esattamente la stessa cosa ripetuta e scritta in modo decente. Mi sono fatto prendere la mano e volevo raccontarvi subito questa corrispondenza fra scale temporali e valori di *steady state* che la variabile di stato insegue. E qui non solo trovate la n che abbiamo discusso, ma avete per analogia i casi di cui sperimentalmente avete di nuovo qui i grafici indicati prima del *gate m* e del *gate h*. Li chiamo *gate* perché, come li ho indicati qui, al di là del fatto che uno funziona con una logica diversa, equipaggiano lo stesso canale sodio, non sono canali distinti.

Come li metto assieme questi? Perché per il potassio l'abbiamo fatto qui, so come scrivere la conduttanza totale del potassio, perché la moltiplico per... ho un valore totale... [testo mancante]... un valore massimo \bar{g} per la frazione di canali aperti, quindi per questa n . Quindi all'equazione di bilanciamento della carica che era scritta qua, $C \frac{dV}{dt} = \sum I$, aggiungo altre tre equazioni differenziali che sono qui. Idealmente uno ne vorrebbe aggiungere almeno altre due, una per il

sodio e una per il potassio... una per i canali sodio e una per i canali potassio. Per il sodio ne servono due, perché ha questa caratteristica strana di avere anche l'inattivazione.

E non ne parliamo in questo corso (chi farà il curriculum di neuroingegneria mi rincontrerà l'anno prossimo), esiste una varietà enorme di canali voltaggio-dipendenti, la cui combinazione con equazioni simili (non esattamente identiche ma simili, della stessa forma, con una τ , la variabile – variabile_∞) permette di descrivere la conducibilità, la conduttanza ionica per tanti altri canali. Sono così tanti che alcuni studiosi li chiamano... lo definiscono lo **zoo dei canali ionici**. Quindi “se tu sei una cellula piramidale hai quel set di 20 canali ionici”, “se tu sei un interneurone inibitorio corticale, che viene chiamato *fast spiking* perché quando tu lo stimoli spara molto molto molto rapidamente rispetto a un neurone piramidale, ha un altro set di canali”. Come se la natura avesse fatto quello che anticamente nei videogame avevate la console e mettevate una cartuccia con un gioco diverso. Qui avete nel caso dell'assone gigante del calamaro avete solo sodio (voltaggio-dipendente) e potassio. Allora il nome corretto di questi canali è: 1. **Sodio**: *Fast Inactivating*, voltaggio-dipendente (si inattiva rapidamente). 2. **Potassio**: *Delayed Rectifier* (è un rettificatore ritardato).

Il fatto del “rettificatore” non ce ne frega niente, il fatto che sia “ritardato” ve l'ho detto adesso talmente tante volte che forse avete la nausea. Ci sono tanti altri canali e gli altri canali possono avere lo stesso tipo di complemento, quindi ogni volta che avete una corrente diversa avete una o due o tre equazioni differenziali in più. Capite perché non è banale eventualmente estrarre dei principi e viceversa anche fare delle simulazioni numeriche accurate.

Quindi, per il potassio l'abbiamo visto. Lasciate perdere un attimo questo esponente alla quarta. Per il sodio, il modo con cui sperimentalmente Hodgkin e Huxley hanno trovato che le cose funzionano (*fittavano*), è prendendo le due variabili di stato che descrivono un *gate* (quindi una popolazione di *gate m*) e una popolazione di altri *gate* di inattivazione (*h*), e **moltiplicarli assieme**.

$$G_K = \bar{g}_K \cdot n^4$$

$$G_{Na} = \bar{g}_{Na} \cdot m^3 \cdot h$$

Notate che non è così banale, non è così inatteso questo prodotto, perché quando la corrente e la conduttanza è attiva (è non zero)? Quando il canale è **sia aperto CHE non inattivato**. Visto che la *h* funziona in logica inversa, quando $h = 1$ vuol dire che il canale è *non* inattivato. Il canale si attiva quando $m \approx 1$. Quindi 1×1 [correzione: $m^3 \cdot h$]... sarà diverso da 0. Quindi il fatto che il prodotto sia un'operazione matematica che facilmente “ammazza” una delle due cose quando basta che una delle due sia piccolo, sia 0, rende ragione di un buon accordo con i dati sperimentali.

Qui vedete le singole correnti e vedete questi esponenti alla quarta (n^4) e alla terza (m^3) solamente su questo *gate*, su questa variabile di stato *m* e non su questa qua (*h*), perché sperimentalmente se voi non li mettete avete un accordo con l'esperimento più scarso. Se mettete 3.5 è un po' meglio, ma non va tanto bene. Se mettete 4 qui (n^4) e se mettete 3 qui (m^3) funziona perfettamente.

Esiste un commento, una motivazione più profonda del fatto che questo sia effettivamente... Allora, questo è come Hodgkin e Huxley l'hanno trovato. A posteriori, avendo negli anni '70-'80 e successivi i ricercatori capito la natura singola, discreta, dei canali ionici (prima non si sapeva che fossero canali ionici), si è capito che sia i canali potassio che i canali sodio non sono il risultato di una singola proteina, ma sono il risultato di **quattro subunità**. In prima approssimazione è come se ciascuna di queste subunità abbia un dominio voltaggio-dipendente e quando le mettete assieme... adesso vi faccio vedere un'immagine o forse no, forse la prossima volta... questa è una specie di sezione laterale. Io me lo immagino come una specie di oggetto che ha quattro di questi "salsicciotti" e quando questi quattro "salsicciotti" si mettono vicini, si combinano (sono le subunità... sicuramente Zoli per i recettori sinaptici ve lo starà dicendo in modo molto molto più accurato), ma dal punto di vista funzionale, soltanto quando i "salsicciotti" sono vicini, allora si forma il poro in mezzo a loro. E le loro proprietà voltaggio-dipendenti sono in prima approssimazione indipendenti statisticamente e ciascuna delle quali soddisfa un'equazione cinetica di questo tipo ($dx/dt = \dots$).

Il fatto che qui ci sia n^4 e non ci sia $n_1 \cdot n_2 \cdot n_3 \cdot n_4$ è perché queste variabili di stato sono indipendenti, visto che fanno tutti la stessa cosa, anziché scrivere $n \cdot n \cdot n \cdot n$ (sono 4), scrivo n^4 . Qui $[G_{Na}]$ c'è la stessa cosa delle quattro subunità: una è responsabile dell'inattivazione (h) e le altre tre della attivazione (m^3).

Esistono ovviamente motivi un pochino più profondi legati a un'altra descrizione che forse vediamo la settimana prossima, sicuramente vedremo la settimana prossima, di interpretazione discreta, stocastica, che vi ho anticipato essere comunque permessa dagli schemi cinetici. Per cui questo n^4 o m^3 , questo prodotto... il fatto che qui ci siano dei prodotti che non è scontato (adesso ve l'ho venduto semplicemente come una convenienza matematica dal fatto che se avete quattro oggetti diversi da zero, li moltiplicate assieme, basta che uno si spenga, avete spento il prodotto) è una cosa molto potente dal punto di vista computazionale, qualunque cosa voglia dire. Dal punto di vista della teoria delle probabilità il prodotto esce fuori perché si tratta di capire che il canale è aperto quando l'evento congiunto "tutte le subunità sono in uno stato aperto" (e sono quattro subunità per esempio del potassio). E la probabilità di un evento congiunto in cui i singoli eventi sono indipendenti statisticamente è il **prodotto delle probabilità**. Questo ha a che fare con l'insiemistica, non so se... dovrete avere... chi ha visto la teoria delle probabilità, avete visto che vi è stata propinata partendo di nuovo dall'insiemistica che avete forse visto in qualche corso iniziale universitario di matematica. Ha a che fare con l'operazione di unione... e in realtà di intersezione. Quindi la probabilità che "piova oggi" E "che io abbia... mi senta stanco" E "che suoni il telefono", visto che sono tre eventi indipendenti, è il prodotto delle probabilità. E per questo, per chi è interessato, perché ci sono questi prodotti.

Il Sistema Completo di Equazioni Quindi: **quattro equazioni differenziali**.

1. **Equazione del Bilancio della Carica (Potenziale V):** L'equazione del bilancio della carica, a cui abbiamo dedicato abbastanza tempo per capire da dove viene, e a cui oggi possiamo mettere... possiamo complementare

il fatto che le conduttanze sono tutt'altro (in alcuni casi, ovviamente per il sodio e per il potassio; per questo [Leak] non è voltaggio-dipendente, quindi ha una forma passiva, ohmica, innocua).

$$C \frac{dV}{dt} = -I_{ion} + I_{ext}$$

$$I_{ion} = I_{Na} + I_K + I_{Leak}$$

2. Equazioni delle Variabili di Stato (m, h, n): Ma per le altre due [Na, K] ho bisogno di altre tre equazioni differenziali, perché questa è la forma ohmica in cui la variabile di stato che dice quali sono i canali aperti e non inattivati per il sodio e per i canali potassio... [correzione] ...attivi... assume... [pausa, si riorganizza] ...quindi ho perso il filo...

Quindi le equazioni differenziali per ciascuna di queste variabili di stato:

$$I_{Na} = \bar{g}_{Na} \cdot m^3 \cdot h \cdot (V - E_{Na})$$

$$I_K = \bar{g}_K \cdot n^4 \cdot (V - E_K)$$

$$I_{Leak} = \bar{g}_L \cdot (V - E_L)$$

Mentre per il Leak è passivo e non dà problemi. Quindi a questa equazione differenziale (dV/dt) sostituisco queste correnti che adesso finalmente posso scrivere. E metto queste altre tre equazioni differenziali che sono di questo tipo (dx/dt), che sono alla fine, vengono da questo giochino degli schemi cinetici aperto-chiuso, [compreso] con la differenza che il sodio ha questa eccezione.

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

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

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

τ hanno questa forma $1/(\alpha + \beta)$, x_∞ (dove x può essere sia h che m che n) ha quest'altra forma $(\alpha/(\alpha + \beta))$ che abbiamo visto. È semplicemente un modo di riscrittura, però sono stato perverso perché vi avevo anticipato che sarebbe stato più semplice scrivere τ_x e x_∞ anziché α e β . Vabbè. Questa è per aderenza al modello di Hodgkin e Huxley.

Valori dei Parametri (Assone Gigante di Calamaro) Qui ci sono le funzioni che sono dipendenti dal potenziale trovate da Hodgkin e Huxley. Chi di voi ha un qualche background biochimico o biofisico potrebbe riconoscere qualcosa che ha a che fare formalmente, in alcuni casi, con una forma di energia libera di Gibbs, dove il potenziale elettrostatico è l'unico campo che descrive energia. Però al di là di questa similitudine che ha motivato Hodgkin e Huxley nella scelta delle particolari... Voi vedete un esperimento, che funzioni ci metto? Adesso ci si mettono per esempio... ci si può mettere una rete neurale *DEEP*, che è fondamentalmente un modello per fare un *fit* di una funzione non parametrica.

È come se fosse uno sviluppo in serie di Taylor o di sinusoidi... in realtà è uno sviluppo in serie di sigmoidi nel caso di un'architettura *deep* di *machine learning*. Loro avevano una formazione biofisica, quindi hanno detto “sai cos'è, i canali ionici oggi, o come pensavano loro, queste molecole, questi trasportatori, alla fine devono rispettare le leggi della biofisica e probabilmente si attivano o disattivano sulla base dell'energia libera di Gibbs”. E per questo hanno scritto questo tipo di formalismo. Ma potete scordarvi di questo che avevo appena detto e dire “il *fit* dei dati sperimentali era accurato quando erano queste le forme d'onda”.

Qui ci sono i valori invece degli altri parametri: * **Capacità** (C_m): 1 F/cm^2 (che vi si stampi nella corteccia frontale). * **Conduttanze Massime**: * $\bar{g}_{Na} = 120 \text{ mS}/\text{cm}^2$ * $\bar{g}_K = 36 \text{ mS}/\text{cm}^2$ * $\bar{g}_L = 0.3 \text{ mS}/\text{cm}^2$ * **Potenziali di Nernst**: * $E_{Na} = +50 \text{ mV}$ (o $+55$) * $E_K = -77 \text{ mV}$ * $E_L = -54.4 \text{ mV}$ (o -54)

Vedete sono tutte riferite all'unità di superficie perché stiamo descrivendo un *patch* di membrana. Se voi mi dite “no è un neurone che è sferico”, ok, uno mette i valori e vedrete che non cambia nulla, nel senso che in questa equazione moltiplicate ambo i membri per la superficie (S). Moltiplichereste qui $(C \cdot S)$, moltiplichereste qui $(\bar{g} \cdot S)$, qui e in effetti moltiplichereste anche qui $(I_{ext} \cdot S)$. Alla fine S è come se si cancella, non cambia. L'unica cosa che cambia è se questa I_{ext} è la vostra pipetta. La vostra pipetta non è più un meccanismo distribuito per unità di superficie, è concentrato. In quel punto state iniettando 100 pA di corrente oppure -100 pA di corrente. Comunque, questo non importa, è una considerazione soltanto ai fini delle simulazioni che vi faccio vedere.

Il potenziale Nernstiano uguale $+50$ per il sodio, -77 per il potassio e -54 per il leak. Questi sono i valori che uno deve usare per l'assone gigante del calamaro quando voglia catturare sia i comportamenti passivi che quelli attivi.

Questo lo vediamo la prossima volta e vi faccio vedere, anche perché siete cotti, siamo cotti, vi faccio vedere qualcosa di un pochino più leggero, spero.

Simulazione Interattiva (Google Colab)

Nel sito, se andate nella parte di “Risorse” e andate nella parte di “Notebook”, trovate in basso su GitHub (quindi qui trovate i file dei notebook, ma io assumo che voi i notebook non sappiate... probabilmente o ne sappiate poco). Qui trovate, come vi avevo raccomandato di fare la prima lezione, trovate addirittura dei bottoni che schiacciandoli apre direttamente quel notebook dentro **Google Colab**, che vi ricordo è una specie di piattaforma cloud per di fatto fare delle simulazioni con Python, di fatto eseguire degli script di Python.

Quindi quella che vi faccio vedere adesso è quella chiamata “Cell Excitability with Hodgkin and Huxley”. E immaginando che funzioni, quindi che a gratis io possa usare le risorse computazionali di Google, vi faccio prima vedere come gioco e poi provo a spaccettare il contenuto, vi faccio vedere il codice, sperando di invogliare qualcuno di voi a metterci le mani.

Voi siete fortunati oggi perché non dovete studiarvi un libro di Python, potete in qualche modo utilizzare *Large Language Model*, in quello che viene chiamato e molto di moda il *Vibe Coding*. Quindi anche se sapete zero di un particolare linguaggio di programmazione, però a spanne un pochino sapete la logica di quello,

potete mettere mano e potete scrivere del codice funzionante. L'esperienza di dattica ovviamente richiederebbe che il vostro cervello restasse attaccato. A me non interessa e all'esame non è un corso di programmazione, però Bioingegneria è un campo multidisciplinare e il tentativo è di dirvi: o siete già equipaggiati o io vi sto mettendo nelle condizioni di farlo. Dovreste masticare matematica, biologia e *coding*, perché la sovrapposizione di questo, al di là degli aspetti puramente di *data science*, caratterizza il bioingegnere.

Dato che sono secchione, nella prima parte di questo Google Colab ho scritto, perché mi piace scrivere le equazioni con LaTeX (che è questo formalismo), mi permette di riscrivere queste equazioni. E sono scritte in modo... sono rese graficamente in modo carino, diciamo, con l'esponente, come se con Word usaste l'Equation Editor, però in modo più semplice, soprattutto che non va in crash come invece va Word costantemente. Vi invito a scrivere la vostra tesi di master futura in Word e mi dite se o meno soffrirete oppure no.

Mando in esecuzione tutte le celle e la prima cosa che vi faccio vedere è questo comportamento **tutto-o-niente** sulla base del modello di Hodgkin e Huxley, in cui sono io che cambio la corrente esterna (I_{ext}) che è indicata da questo step di corrente che vedete qui.

Quindi nota: per graficarlo sullo stesso grafico ho bleffato, perché il valore della corrente (positivo o negativo) ha come unità di misura centinaia di picoampere o in realtà in questo caso credo che siano microampere per centimetro quadro. Lo leggo qua perché in questo cursore vedo -0.067 . Credo, se non mi ricordo male, che siano $\mu A/cm^2$, quindi sono $67 nA/cm^2$. Però per evitare di avere un altro grafico accanto, ho bleffato e ho plottato sullo stesso grafico moltiplicando o sottraendo per una certa quantità, così ce l'avete esattamente sotto. Ma non vuol dire che lo stimolo di corrente sia $-100 mV$, è semplicemente... sono io che l'ho forzatamente scritto che la corrente plottata non era la corrente I_{ext} (ho usato lo stesso nome delle equazioni), ma era $I_{ext} - 100$, così quando I_{ext} è 0 me la fai vedere a $-100 mV$, e moltiplica anche per 50 così me la espandi un po'.

Fatemi nascondere subito il codice, se no magari... ma spero che non vi spaventiate troppo. Se avete coraggio vedrete che non è una cosa particolarmente complicata. L'altro parametro di controllo non è soltanto l'ampiezza della "schicchera" dello step di corrente, ma è anche la sua **durata**. È indicata credo qui in millisecondi, quindi qui è circa $1 ms$ (da 5 ... sì ok potrebbe essere, se questi sono millisecondi, il 6 starà più o meno qui, quindi potrebbe essere). Lo posso allungare, ovviamente non funziona, però ogni volta che io tocco questo cursore dovrebbe rifare... ok, adesso lo rifà. E questo non volevo far vedere, è un'altra cosa, quindi, ok.

Quello che sto facendo qui è di dare uno stimolo negativo, **iperpolarizzante**, di cui l'ampiezza la posso cambiare. E vedete che il potenziale di membrana che è... scusatemi, devo andare nell'altra direzione... il potenziale di membrana... (annaggia a te il potenziale d'azione che emergi, adesso vi dico perché emerge ovviamente, dopo, quando io non stimolo più).

Quando io lo metto negativo o anche molto negativo, il potenziale di membrana (che è questa traccia in nero) di fatto fa quello che farebbe un compartimento passivo, un RC passivo. Ha una curva di carica negativa, se faccio la durata

maggiore è un arco di esponenziale esattamente come quello che abbiamo fatto carta e penna con le slide l'altra volta. Spengo lo stimolo, il condensatore si ricarica.

Il Fenomeno del “Rebound Spike” Allora, qui ho un potenziale d'azione perché iperpolarizzando... In questo grafico qua vedete che soprattutto è colpa della **inattivazione** (h). Quando io sono attorno a -70 mV (come probabilmente sono qui, che sono attorno a -60 , qui supponete attorno a -60 , -70 mV), l'inattivazione (h_∞), quindi siamo qua, non è completamente a 1. C'è un pochino di inattivazione. Quindi tutti gli altri canali che sono voltaggio-dipendenti si adattano a uno *steady state* in cui i canali sodio sono [parzialmente] inattivati.

Se io porto bruscamente il potenziale a -90 mV circa e poi lascio andare (quindi lo porto quasi qui a -100 mV), gli sto togliendo forzatamente tutta l'inattivazione. È come se fosse... mi viene da dire, una crisi d'astinenza, non so se è un buon paragone. Ho una inibizione costante (inibizione nel senso di inattivazione costante) e temporalmente per quel mio input che voleva avere il senso di dire “vedi è negativo, vado nella direzione di non eccitabilità”, il neurone non deve sparare durante il mio stimolo. Perché durante lo stimolo sia il sodio che il potassio si spengono ancora di più, è tutto *boring*, è tutto noioso.

Le cose sono un po' più complicate perché togliendo... iperpolarizzando il neurone, gli **rimuovo l'inattivazione** residua. E quando lascio andare ho un **rebound**, un'esplosione. È come quando... di nuovo, è simile a una crisi di astinenza in cui io prendo sempre un qualche farmaco, un qualcosa, quando non lo prendo più... [è un] paragone sbagliato. È più un meccanismo di inibizione costante e appena tolgo... è più simile al freno. Io viaggio in macchina con il freno a mano un po' tirato, se per caso lo stacco, chiaramente la macchina mi può accelerare un pochino di più. In questo caso l'accelerazione della macchina mi porta dopo diversi millisecondi ad avere un potenziale d'azione.

Questo è un comportamento eccitabile che si vede sperimentalmente e nel modello, guardando il modello avreste detto “no, coso, è solo quando tu metti una corrente positiva che al limite hai delle risposte passive in cui, ok, qui stai depolarizzando un po', ma non hai degli *spike*”. Se aumenti un pochino c'è quella specie di sigmoide, ancora non stai scatenando questo feedback positivo fra sodio, inattivazione del sodio e potassio. A un certo punto... nemmeno adesso... a un altro punto... niente, il comportamento è simile al comportamento passivo.

E a un certo punto se la corrente è sufficientemente grande, qui inizia a esserci una specie di... vedete che c'è una discrepanza fra la traccia nera e la traccia violetto (quindi potete pensare che la traccia violetto sia il comportamento passivo, c'è ancora qualcosa di diverso ma lo introduco dopo). Qui c'è chiaramente qualcosa di **non lineare**, che non è spiegabile da un RC, quindi qualcosa si è iniziato ad attivare, però non si è attivato abbastanza da reclutare altri canali sodio per innescare questa esplosione. Sicuramente il potassio non ha avuto modo di intervenire per portare giù il potenziale di membrana. Quindi questa è la cosa al limite classica che vi sareste aspettati. Quindi ok, c'è una curva di carica, a un certo punto comunque il potenziale è così depolarizzato che a cascata sta reclutando i canali sodio che si aprono, si inattivano e le conduttanze

potassio riportano giù il potenziale di membrana.

Una cosa che potreste fare potrebbe essere quella di “zampettare” (tecnicamente si dice) nel codice e anziché a un certo punto... non è qui che volevo farlo... così, ok qui... anziché plottare la variabile V ... alla fine è un sistema di quattro equazioni differenziali. Perché V ? Perché V è quello che misuro. M , N e H , posso misurarli indirettamente ma ho bisogno di un amplificatore con questo *voltage clamp* che si sono inventati Hodgkin e Huxley, che abbiamo in laboratorio e usiamo frequentemente per esperimenti di questo tipo. Però in una simulazione io potenzialmente ho il potere di fare qualunque cosa, perché mi basta anziché dire “plotta”... (non credo di salvarlo qui), quindi se qui dico... dovrei cambiare... anziché plottare il potenziale potrei plottare m o n o h (sono tre). E quindi simultaneamente farvi vedere come, anziché soltanto il potenziale, come cambia nel *range* $0 - 1$ la variabile h , la variabile m , la variabile n . Oppure potrei combinare la variabile m e h in quel $m^3 \cdot h$ per rappresentare come cambia la conduttanza sodio, se la conduttanza sodio si apre e poi si chiude, e la conduttanza potassio che si apre e si chiude con un certo ritardo.

Se volete vi invito e se avete problemi vi aiuto a farlo, potrebbe essere una cosa stimolante. Sono convinto che voi lo possiate fare per pura analogia guardando il codice. E adesso ve ne parlo del codice, non vi sto a fare una lezione di informatica ma vi racconto per pura analogia, se anche non sapete nulla di Python e di *coding*, come un pochino possa avere senso. L'unica cosa che avrebbe importanza da parte vostra sarebbe quella di ripassare il metodo di Eulero, di risoluzione numerica delle equazioni. Però fatemi per il momento ancora giocare con questo sistema.

Quindi la storia del potenziale *rebound* non c'era, non era facilmente... non si vedeva dal modello ed è in qualche modo una predizione in più.

Codifica in Frequenza e Attività Periodica Una cosa che il modello (e un vostro collega in un break mi ha menzionato) è: se lo stimolo fosse mantenuto? Ora in questa simulazione simulo soltanto 20 millisecondi, ma in quella dopo faccio di più. Se io continuo a mantenere lo stimolo, non do uno *step*, una schicchiera, ma continuo a mantenere la corrente sufficientemente intensa da poter fare sparare il neurone... Perché se la corrente è più bassa, ok, hai voglia che io tengo la corrente accesa, ma non succede niente. Sì, c'è evidentemente qui un transitorio non lineare dovuto alle conduttanze attive (sodio e potassio), ma poi si stabilizza a un nuovo *steady state*.

Se io cambio la corrente e la corrente non è solo un impulso, vedete che ho un'**attività periodica** di diversi potenziali d'azione. E cambiando la corrente (qui non si vede granché) cambia la frequenza. Una cosa che si vede qui è che cambiando la corrente l'ampiezza dei potenziali d'azione inizia a diventare... a soffrirne, inizia a diventare molto più piccola. Ed è quello che si vede sperimentalmente perché se io chiedo al neurone di continuare a sparare, lo ingaggio in un regime dinamico in cui una parte di quella benedetta inattivazione del sodio (h) non viene mai tolta. Nonostante il potassio ci provi, il potenziale di membrana non va mai a potenziali particolarmente polarizzati e questo disgraziato h , questo *gate* h , continua a persistere in questa regione [bassa]. Nota: h_∞ è una quantità istantanea. h evolve con questa equazione dinamica che ha un'inerzia,

quindi ha questa τ_h . Quindi è vero che h insegue h_∞ , però lo fa con un'inerzia e questa inerzia è anche di persistere e di non permettere al potassio... [correzione] ...continua a non essere presente... [correzione] ...continua a non permettere un reset delle condizioni pregresse.

Quello che vi faccio vedere qua è invece la stessa cosa, ma tengo (e probabilmente cambio la scala delle correnti) tengo la corrente per un tempo “infinito” (qui la simulazione la blocco dopo 300 millisecondi). Quando la corrente, l'ampiezza della corrente è in questo caso 120 A... ovviamente non funziona più, maledetto, maledetto, non funziona più il cursore, ecco. Se la corrente è iperpolarizzante nulla di interessante succede. Questa è una cosa banale ma è soltanto in una direzione si ha un'eccitazione. Quindi se immaginate il cervello o un circuito di neuroni come un sistema interagente, i neuroni parlano e (sapete da Zoli, e lo vedremo anche noi) scambiano informazioni soltanto quando sono eccitati. Sono eccitati in una direzione, cioè quando sono depolarizzati. Quando non sono depolarizzati (tranne un'eccezione notevole delle sinapsi elettriche o *gap junction*, che probabilmente Zoli non vi ha raccontato) non comunicano. È un sistema, è una rete di unità che sono isolate. Comunicano solo se i neuroni vanno “sopra soglia”.

Quando la corrente è aumentata, ha un valore sufficientemente grande (quindi non basta che sia positivo, deve essere sufficientemente grande)... per esempio adesso è... non so perché non vi... ok... il comportamento non è quello di avere un'attività *spiking* sostenuta, in questo caso la corrente è troppo bassa, si ha un singolo potenziale d'azione e basta. Questa cosa del potenziale d'azione è anche dovuta alla condizione... alla scelta delle condizioni iniziali. È un sistema di equazioni differenziali, richiede la scelta di una condizione iniziale per V , m , n e h . Questo ovviamente può cambiare le cose nel transitorio.

Se tuttavia la corrente continua ad aumentare, avete un esempio estremamente semplice di **codifica** di una quantità (in questo caso è l'ampiezza della corrente) in **frequenza**. Se io aumento la frequenza, al di là del fatto che l'ampiezza degli *spike* diminuirà un pochino (non so se riuscite a vederlo), gli *spike* diventano più fitti.

Eccitabilità di Tipo 1 vs. Tipo 2 Vi faccio vedere una cosa notevole che è una, di nuovo, è una predizione del modello che *fitta* con la realtà. Vedete che se io (e vi assicuro che questo avviene anche cambiando la corrente in passi arbitrariamente piccoli) passo da una condizione in cui la frequenza di uscita è zero, praticamente è zero... Io definisco frequenza, quindi un'attività periodica di oscillazione del potenziale di membrana che, per esempio, in un arco temporale di 300 millisecondi, mi permette di calcolare la frequenza come numero di spike/300 ms. (Un'alternativa sarebbe quella di, visto che questi *spike* sono regolari, di prendere l'intervallo fra due *spike* successivi e prendere l'inverso, ma semplicemente contiamoli).

Qui ancora la frequenza è zero. Se io provo ad aumentare un pochino, vedrete che non si passa da zero a... [attende la simulazione] ...vedete, fa poco... che si passa da 0 a una frequenza che, se non mi ricordo male, è di circa 30 spike al secondo... vediamolo. Fra 100 e 200 è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8. Sono 8 spike in 100 millisecondi, quindi sono 80 **Hz** (80 spike al secondo).

Se ve lo riuscite a immaginare, una specie di grafico in cui avete sull'asse delle X la corrente (lo stimolo) e nell'asse delle Y la frequenza (la famosa Stele di Rosetta che speravo di avere ma non ce l'ho alla prima lezione, alla prima o alla seconda settimana), ho un *mapping* fra quello che è lo stimolo e la frequenza. Ed è per esempio quello che alcune fibre sensoriali del mio midollo spinale mi stanno comunicando. Se avete un elettrodo e lo mettete nella parte dorsale del mio midollo spinale, sentireste che la frequenza codifica per il peso: aggiungo peso, la frequenza aumenta.

In particolare l'eccitabilità modellata così per l'assone gigante del calamaro sembra non avere una gradualità. Passa da 0 a 80 Hz. Poi se cambiate... (vi erano circa 8 spike in 100 millisecondi). Quindi, se li conto qui, si vede a occhio che sono di più, però è 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15... 15. Siamo arrivati a 150 spike al secondo.

Quindi esiste una dipendenza monotona crescente fra intensità dello stimolo e frequenza, però alla soglia di eccitabilità, alla cosiddetta **reobase** (che sta per... lo vedremo come termine successivamente: il valore della corrente minima per avere attività oscillatoria sostenuta), lì ho una **discontinuità** di primo ordine, cioè passa da nulla a 80 Hz. Non tutti i neuroni sono così, questi si chiamano **eccitabilità di tipo 2**. Ed è particolare perché dipende dai particolari valori, quindi dalla posizione di queste curve di attivazione e inattivazione.

Non lo faccio, ma sarebbe sufficiente per me cambiare leggermente la posizione di questa sigmoide, *shiftandola*, di circa 10 millivolt, che avreste un comportamento di **tipo 1** in cui la curva frequenza-corrente diventerebbe invece in grado di sparare a frequenze arbitrariamente basse (3 spike al secondo, 4 spike al secondo, 10, 50, 80, 120). Però non avrebbe più una discontinuità.

Di nuovo, se foste coraggiosi potreste provare a mettere le mani. E le mani dove penserei di metterli? Potrebbe essere nel valore... abbiamo detto, della attivazione. In queste curve, α e... purtroppo ve le ho date come α e β , potreste riscriverle come m_∞ , ma potreste semplicemente giocare con questi numeri qui. +40 potreste cambiarlo in +50. Adesso non mi ricordo se... dunque... devo traslare a sinistra, quindi devo... no, devo forse mettere +30 o +20. Lo dovrete fare sia al numeratore che al denominatore e forse decrescere, diminuire anche questo. Potreste scoprire che il comportamento resta eccitabile ma con caratteristiche diverse. Sono tutte cose di un livello più avanzato che dovrebbero o potrebbero (la speranza è che lo facciano) stimolare la vostra curiosità e provare a metterci le mani. Non ve lo chiedo all'esame, quindi è la vostra idea se vi state preparando per prendere 30 all'esame oppure vi state preparando per una vita professionale. Questo è *up to you*.

Il Periodo Refrattario: Assoluto e Relativo Vi faccio vedere invece una cosa più interessante, importante, che sicuramente vi chiederò all'esame, che ha come titolo il concetto di **refrattarietà**. Di nuovo è venuto fuori during il primo o secondo break delle ore di oggi, della lezione di oggi, in cui un vostro collega mi ha chiesto: "sì, ma non deve passare un pochino di tempo prima che il sistema sia pronto di nuovo per sparare un nuovo potenziale d'azione?". Alla fine qui il comportamento eccitabile... non è che due *spike* possono essere arbitrariamente vicini. Se io qui aumento arbitrariamente la corrente, a un

certo punto si spegne il comportamento eccitabile. E si spegne perché non sono più in grado di togliere tutta l'inattivazione del sodio, quindi il neurone rimane bloccato in una condizione in cui parte del sodio rimane inattivato, non viene mai resettato, il potassio non ci può fare nulla.

Lo faccio vedere in quest'altra simulazione che ha un paradigma più interessante da capire. Qui do **due stimoli** molto molto brevi e sono separati da... in questo caso è circa 30 millisecondi. Sono queste due schicchere in rosso e ciascuna delle quali è controllata da un diverso cursore. Il valore di queste correnti, per come le ho scelte, è tale per cui in entrambi i casi io do la schicchera, transitoriamente riesco a fare superare una specie di punto di non ritorno (che è attorno a -60 , -50 millivolt), per cui il potenziale d'azione si genera perché il sodio inizia ad aprirsi e si genera una reazione a cascata. E quindi io vedo che si genera uno *spike*.

Personalmente potrei guardare il profilo dei potenziali d'azione per ore perché è sorprendente che vengano fuori questi impulsi che sono più... linguaggio da ingegnere. Il concetto di impulso o di codifica con una componente binaria è più una roba da elettronica e sistemi digitali, non da biologia e da miliardi di anni di evoluzione, però questa è una considerazione personale.

Guardate cosa succede se restringo, se diminuisco l'intervallo fra questi due impulsi. A un certo punto... (non succede niente perché mi odia, Google Colab)... a un certo punto il secondo *spike*, questo, non ci sarà più perché il sistema non si sia ancora ripreso dall'emissione del primo *spike*.

Quindi ancora siamo a 20 millisecondi. Quindi il periodo di refrattarietà che sto cercando è inferiore adesso ai 18 millisecondi. È inferiore... ok, arrivati a 16 **millisecondi**, vedete che qui questo... e non ho cambiato nulla, è esattamente la stessa ampiezza di corrente. È una refrattarietà **assoluta** o **relativa**? Il che vuol dire: se io aumento qui la corrente del secondo impulso, non è che magari riesco a svegliare il neurone? Sì, lo sveglio. È **relativa**. Vuol dire che non tutti i canali sodio si sono de-inattivati (in alcuni c'è ancora l'inattivazione), ma se io spingo sufficientemente riesco a far sparare un'altra volta il neurone.

Allora, conscio di questa cosa, diminuisco ancora. Ok, qui sono arrivato a 16, supponete per motivi di tempo vado a 13. Provo a 13 ad aumentare la corrente. Adesso evidentemente la corrente deve aumentare parecchio. Potrebbe essere che non ci riesca più, che sia una refrattarietà **assoluta**. Vediamo se è il caso oppure no. C'è qualcosa che sembra si stia generando, quindi sono ottimista.

Anche qui una considerazione: qui la forma dello *spike* è altamente **stereotipata**. Ho innescato lo stesso meccanismo a cascata e la forma e la durata è praticamente sovrapponibile. Ve lo dico perché fra un momento, diminuendo moltissimo l'intervallo fra i due, potreste pensare che quando io aumento moltissimo la corrente (a questo punto prima era 3 A/cm^2 , adesso è 13 A/cm^2), potreste interpretare questo *blip* nero come un potenziale d'azione. In realtà non è un potenziale d'azione. Il potenziale d'azione ve l'ho fatto vedere prima, era simile a se stesso. Quindi probabilmente qui sono già in uno stato di refrattarietà assoluta. Non c'è niente da fare. Di solito la legge di Murphy vuole che adesso... niente, ok.

Anche al massimo di quello che posso, per 10 **millisecondi** il neurone è refrat-

tario. Se io faccio $1/10$ millisecondi e moltiplico per 1000, ottengo un valore che è simile a una frequenza. In altri termini, se un neurone non può emettere (perlomeno con queste schicchiere isolate) due *spike* più vicini di 10 millisecondi, vuol dire che la **frequenza massima** è inferiore a 100 spike al secondo, 100 **Hz**. 100 Hz vuol dire che il periodo è $1/100$, cioè vuol dire 10 millisecondi.

Le cose possono non essere così, ma la curva frequenza-corrente che vi ho fatto immaginare nella vostra testa, potrebbe non solo avere questa discontinuità (nel caso di questa eccitabilità di tipo 2), ma non essere una curva che cresce linearmente, potrebbe avere una **saturazione**. Questa cosa è la saturazione (eventualmente ne parliamo le prossime volte) è di nuovo alla base del *machine learning*, dell'analogia con le unità che funzionano come *threshold linear*: hanno una soglia prima della quale l'ingresso non fa sparare l'unità, non attiva l'unità, dopodiché il comportamento non è lineare ma è sigmoidale, piega.

Finisco qua, la settimana prossima continuiamo, suggerendovi di giocare con questo. Non credo che abbiate avuto tanti corsi finora (o che sicuramente a Modena li avrete) in cui vedrete la convergenza di queste cose: la parte computazionale, la parte di analisi dati, la parte biologica, la parte di elettronica di amplificazione (anche se non sono conscio di quanto... non mi ricordo più come si chiamano i miei colleghi G. Berton e G. Baldi vi facciano... di amplificatori di oggetti), in un caso che converge nel caso dei segnali biologici. Chiudo qui, grazie per la vostra attenzione. All right.

Annunci e programma della lezione Oggi l'idea è quella di concludere la parte sull'**eccitabilità neuronale**, continuando l'introduzione di alcuni concetti legati a fenomeni di ordine superiore rispetto all'eccitabilità descritta come al minimo, come vi ho fino a questo momento introdotto, e passando anche a una descrizione non deterministica, **stocastica**. Alla fine vi ho sottolineato che l'eccitabilità non è dovuta a delle proprietà distribuite continue di permeabilità ionica, voltaggio-dipendente da parte di una membrana, ma è legata alla caratteristica di alcuni pori che sono discreti e sono piccoli. E quando una cosa è piccola, soprattutto in un ambiente biologico, a temperatura fisiologica, è associata con fenomeni che non sono deterministici, sono quindi... in particolare sto pensando solo all'agitazione termica.

E credo nella seconda metà della lezione di oggi spostiamo il tiro sulla descrizione della **comunicazione sinattica**. È fondamentale per i passi successivi perché lo stesso formalismo con cui abbiamo descritto l'eccitabilità ionica ha a che fare con l'eccitabilità della membrana dovuta a conducibilità ionica, voltaggio-dipendente, ha a che fare con quello che è la conducibilità ionica legata a proprietà di permeabilità **ligando-dipendente**, non voltaggio-dipendente.

Ripasso: L'equazione differenziale del primo ordine e i filtri Questo è di nuovo il modello di quattro equazioni differenziali che **Hodgkin e Huxley** hanno descritto per la prima volta negli anni '50 in una serie di articoli. È uscito recentemente, qualche anno fa, un libro (non ho la versione elettronica ma la versione cartacea, se volete ve la posso prestare, non credo che la biblioteca dell'università ce l'abbia) in cui gli articoli sono stati raccolti e c'è un *commentary*, c'è una descrizione, un commento alle varie parti.

Volevo riprendere il concetto euristico che ho cercato di trasmettervi l'altra volta. Quando in altri termini avete una equazione differenziale del tipo dx/dt uguale, *whatever*, $-x/\tau + f(t)$. Sebbene a rigore la soluzione di questa equazione differenziale, dove $f(t)$ è un termine forzante noto, tempo-variante è noto, sia a rigore la somma di due termini: la soluzione dell'equazione omogenea associata (il che vuol dire dell'equazione che si ottiene togliendo questa parte) è un esponenziale decrescente, a parte la condizione iniziale, a parte le costanti da identificare; più l'integrale particolare che nel caso generico non si fa in nessun altro modo se non con l'integrale di convoluzione.

Convoluzione fra questa quantità... involuzione o filtraggio, è un'operazione di filtraggio fra la risposta all'impulso, che è un esponenziale decrescente (che è zero prima e un esponenziale decrescente dopo), e la funzione stessa.

Ma al di là di questo formalismo matematico, io vi ho in qualche modo indicato che se τ è piccolo, o viceversa, se la velocità con cui f , il termine forzante, cambia nel tempo è lenta (è una bassa velocità), è come se $x(t)$, grosso modo, stia seguendo f . Questo è a spanne, è un ragionamento approssimato, però è molto utile.

Chi di voi ha una preparazione ingegneristica e ha un minimo of sensibilità dal punto of vista della teoria dei sistemi, riconosce che questa descrizione è la stessa che gli ingegneri amano fino alla morte, in cui ci sono le scatole nere, in cui guai ad aprirle, guai ad aprire e a scrivere il meccanismo (sebbene con componenti fenomenologiche), in cui qui ho solo la risposta all'impulso, nel tempo o come in un qualche dominio trasformato delle frequenze, in cui l'ingresso $f(t)$ passa e viene convertito nell'uscita. Questo è un filtro e nel caso specifico è un **filtro passa-basso**.

Chi di voi ha una qualche esperienza in elettronica riconosce, al di là di tutte le cose che abbiamo discusso nelle ultime settimane, questa è l'equazione di un **RC**. E l'RC sapete, in questa configurazione, quando questa entrante in questo nodo è la corrente $F(t)$, si comporta come un filtro passa-basso, cioè la relazione fra questa corrente $F(t)$ e il potenziale ai capi of quel condensatore è una relazione di tipo che smorza i cambiamenti veloci.

L'approssimazione di quasi-stazionarietà (Steady-State) Quando ovviamente o la τ è molto grande o viceversa, quando f invece varia molto rapidamente, non è che ci sia un grosso inseguimento da parte... il segnale varia troppo veloce, quindi questa approssimazione di **quasi-stazionarietà**, in cui fondamentalmente dico che è come se l'equazione fosse sempre allo *steady state* (cioè che questo termine non cambi), anche se è sbagliato perché siamo in un regime dinamico... ma se questo è zero, x è proporzionale a f .

Questa cosa serve ed è molto utile per capire cosa succede durante un potenziale d'azione, ricordandosi che i singoli *gate* dei canali sodio, vi ricordate **M** e **H**, che sono appesi lì (perché due? perché c'è la botola che dal compartimento intracellulare si chiude inattivando il canale, mentre ci sono i *gate*, forse tre *gate*, visto che compariva come $m^3 \cdot h$, ci sono tre *gate* che rappresentano l'attivazione del canale), **N**, i quattro *gate* n dei canali potassio di nuovo, sono tutte variabili che soddisfano un'equazione differenziale che alla fine è questa.

Quindi n e n_∞ , m e m_∞ , h e h_∞ , alla fine, a parte diverse costanti (forse scritto così dimensionalmente sarebbe meglio), ma comunque a parte delle diverse scale temporali su cui le singole cinetiche di canale si comportano, grosso modo, presto o tardi, le singole variabili di stato vorrebbero andare al valore che ha m_∞ , h_∞ , n_∞ rispettivamente.

E queste m_∞ , h_∞ , n_∞ ve le ho vendute come identificate sperimentalmente, *fittate*, identificate su quelli che sono delle registrazioni sperimentali fatte, ok, con un setup complicato di **voltage clamp** utilizzando delle tossine per disambiguare, disaccoppiare le correnti. Ok, e hanno una dipendenza dal potenziale che è **sigmoidale**.

Le curve di attivazione e il comportamento a soglia Vi ricordate che ho cercato di mettervi la curiosità, quindi m_∞ , h_∞ e n_∞ , grosso modo, tranne H_∞ che fa qualcosa che fa al contrario (dove questo è **0** e questo è **1**, i canali tutti chiusi o tutti aperti), M e N grosso modo sono delle sigmoidi, più o meno della stessa lineata, che hanno il punto di mezzo intermedio allo stesso valore di potenziale che vi ricordo essere grossomodo attorno a **-50 millivolt**. Quindi può essere che all'esame vi chiederò di fare un grafico come questo e vi chiederò "potete mettere grossomodo l'ordine di grandezza?". E allora qui più o meno sarà **-100**, **-90**, grossomodo, non è **-2000 millivolt**, non è **+500 volt** e qui grosso modo sarà **20 millivolt**. Probabilmente mi sto ricordando male, ma grosso modo è solo per farvi capire che lo *span* con cui queste proteine si sono evolute per diventare sensibili al potenziale è esattamente nello *span* in cui il potenziale di membrana varia e viceversa potreste dire "no, è il potenziale di membrana che varia in questo *span*, in questo intervallo".

Quindi questa è la dipendenza, ok, per finire la frase... diverse frasi che ho lasciato appese un attimo fa... cercavo di stimolare il fatto che questa è come se fosse una specie di **comportamento a soglia**. Se fosse un gradino rigido sarebbe "se stai sotto un certo valore sei spento, se stai sopra un certo valore sei acceso". Ve lo dico perché gran parte dei modelli di *machine learning* basati su reti neurali artificiali hanno quel tipo di comportamento a soglia, non hanno necessariamente un comportamento *smooth*, liscio, "allisciato" (è brutto "allisciato"), sigmoidale. Però la natura fa sigmoidi, non fa necessariamente interruttori/gradini. Anche i transistori non sono effettivamente degli oggetti che sono rigorosamente degli interruttori, sono dispositivi analogici.

Allora, se io prendo anziché solamente plottare V in funzione del tempo, come vedete qua V_m (potenziale di membrana, questo è un grafico preso da un qualche libro $V_m(t)$, noi l'abbiamo chiamato V , di nuovo questo è il potenziale dentro rispetto a fuori, ma fuori abbiamo messo a zero perché convenzionalmente possiamo farlo), io non solo posso plottare V , posso plottare $m_\infty(V)$. Conosco quella che è la relazione istantanea, è una non linearità istantanea e quindi posso, se V cambia nel tempo, posso vedere come m_∞ cambia nel tempo, come h_∞ cambia nel tempo e così via.

Analisi grafica delle variabili di stato (m , h , n) E ce l'avete qui, le "infinite" (m_∞) sono quelle tratteggiate o *dashed* (non so come si dica), con le barrette, con le lineette. Per esempio vedete che la m e la n che sono quelle per me più interessanti (una è del sodio, l'attivazione del sodio, l'altra è l'attivazione del potassio). È vero che M e N hanno una scala temporale diversa, tanto che quello si chiama *delayed rectifier*, canali potassio, voltaggio-dipendenti, ritardati. Però quando rappresentate m_∞ , h_∞ e n_∞ non c'è il tempo, nel senso non c'è alcuna dinamica, non c'è alcun ritardo.

Ed è una rappresentazione utile per l'intuizione, per la nostra intuizione, perché vedete che se m_∞ fa questo comportamento, avrebbe questo comportamento, perché il potenziale d'azione sta cambiando da valori iperpolarizzati a valori depolarizzati e poi torna a valori ancora più iperpolarizzati. Quindi questa curva di colore giallino (quello che mi dimentico sempre è che questo bluetto chiaro si chiama magenta e non c'è modo per cui io me lo ricordi), questo giallino parte da **0.3**, **0.4** perché evidentemente quando il potenziale è a **-60**, **-65** non è **0** M_∞ e inizia a essere almeno attorno a **0.4**, quindi il grafico potrebbe non essere accurato, il mio *sketch* alla lavagna.

Vedete che quando il potenziale cambia, M_∞ cambia, lo copia. Stessa cosa succede per... scusate, M_∞ era quello magenta, è questo qui. Il grafico è ok, nel senso che quando il potenziale è più o meno al valore di riposo, questi canali sodio M_∞ sono più o meno chiusi. Per il potassio evidentemente la curva è *shiftata* più a sinistra, cioè a dire allo stesso valore di potenziale ho una attivazione maggiore per la n_∞ rispetto alla m_∞ e vedete che parte da qua, però più o meno temporalmente fa la stessa cosa perché il tempo non c'è, il tempo lo decide la traccia del potenziale. Mentre la H , vedete che il comportamento è esattamente opposto, questo in violetto, parte da valori più vicini all'unità, **0.6**, **0.7**, quindi anche a riposo esiste una porzione, una frazione di canali sodio e voltaggio-dipendenti che sono in uno stato inattivo. A queste depolarizzazioni già non è più **1**, è un po' più basso di **1** e fa la cosa opposta, quindi quando il potenziale aumenta si spegne, questo *gate H* si spegne e quando il potenziale si iperpolarizza torna a essere non inattivo, e poi per poi tornare a un valore più di equilibrio che probabilmente è attorno a **0.6**. Durante uno sparo, durante un regime in cui ci sia un avvicinarsi sostenuto di potenziale d'azione.

Questo ve lo faccio vedere perché se poi guardate, se confrontate la M_∞ con M (quindi questa traccia magenta e questa traccia blu), vedete che grossomodo fanno la stessa cosa. Perché? Perché l'attivazione del sodio è praticamente istantanea, è molto veloce, ve l'ho ragionato, che è uno degli oggetti biologici più rapidi che esistano. In una frazione di millisecondo questo si apre. Era dovuta a queste τ , che sì, sono d'accordo, sono voltaggio-dipendenti, però a spanne è una quantità, un numero piccolo, quella τ_m .

Viceversa, vedete che se paragonate il giallo al rosso (quindi n_∞ a n), vedete che n è pigro, non segue, cioè segue, ok, segue, quindi questo discorso è ok, però segue con un ritardo ancora maggiore. E stesso dicasi per h , h è comunque ritardato, se non lo fosse non ci sarebbe il potenziale d'azione. h dovete paragonare il verde al violetto. Vedete che grosso modo N (il rosso rispetto al giallo) e H (il verde rispetto al violetto), sembrano avere una dinamica temporale simile.

Questo potrebbe avere delle implicazioni che non affronteremo in questo corso

di **riduzione di dimensionalità**. È possibile scrivere un sistema di equazioni differenziali che ne ha due anziché quattro, in cui in altri termini il sodio m alla fine è sempre allo *steady state*, quindi io posso buttare dalla finestra l'equazione differenziale, posso direttamente considerare che sostanzialmente τ è così piccolo che è sempre allo *steady state*, quindi fuori dm/dt non c'è. E l'equazione per n e per h di fatto vedete, addirittura sembrano quasi uno lo specchio dell'altro se ci fosse un asse di simmetria attorno a **0.4**.

Quindi per chi di voi seguirà il curriculum su neuro ci sarà uno sforzo modellistico di riduzione della complessità e da questo grafico qui ulteriormente si capisce perché la questione delle costanti di tempo, particolarmente la H e la N , siano fondamentali per permettere al potenziale d'azione di andare su e giù.

La realtà biofisica: Schemi cinetici Markoviani Nella realtà, in particolare per riprendere quello che l'altra volta e poco fa ho menzionato, il fatto che dal punto di vista di una descrizione intuitiva, io mi immagino i canali sodio e potassio, visto che le correnti... faccio l'esempio della corrente sodio, che è una conduttanza massima per... come? $m^3 \cdot h \cdot (V - V_{Na})$. Io me l'immagino con questi cancelletti, che sono quattro, uno di questi è diverso, però... anzi ho il colorino blu.

Non è esattamente così, ve l'ho venduta dal punto di vista biochimico, molecolare, come la presenza di diverse subunità, per esempio visto dall'alto questo oggetto dal punto di vista molecolare è l'assembloide, l'assemblaggio di quattro oggetti che solo quando sono vicini creano un poro e ciascuno di questi ha una propria dipendenza, una propria dipendenza dal campo elettrico transmembrana, quindi dal potenziale di membrana dentro rispetto a fuori.

Nella realtà, facendo un esperimento, lo **schema cinetico** che rappresenta meglio la dinamica dell'attivazione del potassio, la conduttanza del potassio (quindi lo studio delle correnti e delle loro conduttanze), non ha un unico *gate* e poi la corrente ha questi esponenti **3** e **4**, ma in realtà ci sono molti stati: **1, 2, 3, 4...** ci sono **5** stati di cui soltanto uno stato è conduttivo, associato a una conducibilità. E stesso dicasi per il sodio, avete **otto stati** in cui di fatto è come se strutturalmente ci fosse una simmetria e dipende questo ramo di sopra, questo ramo di sotto, dallo stato... se volete, se io li scrivo così con dei stati (stato numero uno, stato numero due), non c'è alcuna simmetria. Se invece metto questi M_0H_1 , M_1H_1 , in qualche modo sto ragionando in questi termini, ma nello spazio la struttura è questa, in cui per ciascuna di queste configurazioni H può essere in due stati (o attivo o inattivo), e in ciascuno degli stati per cui ciascun *gate* (M_0, M_1, M_2, M_3) sono attivi, posso *flippare* da uno all'altro.

Non ve ne parlo e non ve lo dimostro, ma questo tipo di schema cinetico **markoviano** con questi specifici coefficienti si dimostra essere equivalente al prodotto dei singoli *gate*. Quindi il modello che vi ho raccontato (aperto, chiuso, magari ripetuto per ognuna di queste subunità, che sono identiche e statisticamente indipendenti) continua a funzionare, ma a rigore gli stati con cui la proteina complessiva si muove sono molteplici.

Quindi in teoria io dovrei scrivere un'equazione differenziale... probabilmente

scriverei un sistema di **5** equazioni differenziali o **8** equazioni differenziali. Ricordate che negli schemi cinetici sono tutte linearmente dipendenti, quindi una la posso togliere perché posso scrivere una relazione di conservazione della massa $n_0 + n_1 + n_2 \dots$ uguale al **100%**, che vuol dire la proteina è in uno di quegli N stati, non può essere in un altro stato. Ma a rigore potrei quindi mettere qui solamente un numero, una variabile di stato che è la frazione di canali in quello stato n_4 oppure nello stato m_3h_1 supponendo che quella sia lo stato conduttivo.

Ve lo sto raccontando perché fra un attimo passiamo alla **descrizione stocastica** e la descrizione stocastica richiede la descrizione più accurata possibile, più estesa possibile dello schema cinetico dei canali di cui parliamo. Quindi questo è semplicemente una slide per dire: quel tipo di schema cinetico viene ridotto perché per quella scelta di valori che sembrano essere quelli che *fittano* di più, si evince che le quattro subunità siano indipendenti e quindi è come se lo stato aperto fosse l'occupazione simultanea di quattro subunità dello stesso stato aperto. Per il sodio ce n'è uno che però fa eccezione ai *rate* che sono diversi.

Esplorare il modello: Esiste una soglia? Vi incoraggio (avete qualche figura, ma avete il codice, avete il Google Collab Notebook), anche se non volete sporcarvi le mani a scrivere metodi numerici, a cambiare i valori... avete un dannato *slider*, potete giocarci e potete rispondere a delle domande che forse l'altra volta ho già in parte stimolato.

Esiste una **soglia**? Esiste un valore di corrente esterna per esempio e se uno applica a un valore $-\epsilon$ (dove ϵ è una quantità infinitesima) il neurone non spara, e se uno applica quel valore $+\epsilon$ allora il neurone spara?

La considerazione è che non sembra che esistano degli *if-then-else* biologici, non esistono una specie di condizioni rigorose. O viceversa, la ripidità di queste sigmoidi non è così estrema da pensare che esista un valore di soglia per cui superato, per esempio un valore di soglia nel potenziale (non nella corrente, ma una influenza l'altro), automaticamente, *boom*, magari non di botto con una certa cinetica, tutti i canali passano da aperti o chiusi. No, è un processo più *smooth*.

Ed è un processo *smooth* probabilmente perché è l'effetto collettivo, in questa descrizione deterministica di popolazione, dell'effetto di tantissime unità, che di loro sono dei *gate* che sono o tutti aperti o chiusi. Se io ho una porta, adesso o è chiusa o è aperta (anche se è socchiusa è aperta). Invece una popolazione di... dovrete pensare delle finestre in un grande edificio con tantissime finestre. Probabilmente quando avete tante finestre il comportamento, per esempio dipendentemente dalla temperatura esterna (se fa molto freddo saranno tutte chiuse, se fa caldo tutte le persone di quel palazzo, di quegli appartamenti aprono le finestre), ci sarà una qualche gradualità. Però la domanda è: alla fine io vedo il comportamento elettrico di un neurone che è il risultato di questa collettività di canali voltaggio-dipendenti. C'è una soglia? Provate a giocare.

La cosa che forse incontrerete è che dovrete decidere quello che è lo stimolo. Se lo stimolo è un impulso DC, una corrente costante, che è costante (ora qui ho

fatto il transitorio ma solo per farvi capire che l'ho accesa, da zero è diventata a un qualche valore $I_{ext} = I_0$, qualcosa del genere). Questa è una scelta, ma non è l'unica scelta.

Nelle simulazioni che vi ho preparato affinché voi poteste giocare o metterci le mani, modificarle, scassarle, cambiare i parametri, esplorarle (cosa che non potreste fare con la stessa facilità in un esperimento biologico), avete anche altri casi in cui lo stimolo è un piccolo impulsino, un piccolo rettangolo di corrente, sempre costante, però per esempio questo è **10 millisecondi**.

Quindi vi accorgereste (accorgerete spero) che dipende dal protocollo di stimolazione. Se c'è o non c'è una soglia, quella che voi concludereste "sì esiste una soglia", dipende dal protocollo. In qualche modo dipende anche dall'**integrale sotteso**. E l'integrale sotteso non dovrebbe farvi venire in mente degli incubi matematici, ma se ricordate che in qualche modo la corrente vuol dire una carica nell'unità di tempo, quando fate l'integrale rispetto al tempo della corrente è come se voi steste ottenendo la carica trasferita.

Tutte queste cose sono banali per chi ha un'idea intuitiva o matematicamente accurata o esperienza sul campo di un condensatore. Quando iniettate correnti in un condensatore, questo si carica e ovviamente si carica tanto di più per quanto più a lungo state applicando una corrente. Stessa cosa.

Integrazione Temporale e Sommazione Questo concetto di **integrazione temporale**, quindi, in parte è legato alle proprietà capacitive della membrana. In parte ovviamente è legato anche alle proprietà attive, al fatto che avete canali e conduttanze che sono dipendenti dal potenziale e quindi potreste cercare di indagare cosa succede se avete una sequenza di questi rettangolini.

Adesso che vi ho detto la storia dell'integrazione voi direste: "ok, ho capito il gioco, qui fondamentalmente stai dicendo che se l'integrale, se l'area è sottesa da questi impulsini, magari sono impulsini molto piccoli, però sono ripetuti nel tempo, se sono ripetuti nel tempo e se ce n'è un numero sufficiente allora il neurone, quindi il potenziale di membrana, le proprietà capacitive della membrana si sommeranno e il neurone andrà a sparare".

Se ci giocate (cambiare lo stimolo in una di quelle simulazioni non è complicato e potreste tranquillamente ricorrere ai vari ChatGPT, Gemini, ecc.), potreste rendervi conto che dipende anche da quanto tempo passa fra uno stimolo e l'altro. Alla fine è un **condensatore con perdita**. Quindi se voi non fate niente, per mio sommo gaudio, il potenziale decresce esponenzialmente perché è un sistema dissipativo e non esplode. Quindi se voi aspettate troppo fra un impulso e l'altro, perdetevi memoria dinamica di quello che è stato il passato.

Quindi la storia dell'integrazione temporale è vista non soltanto dal punto di vista del trasferimento della carica per far sparare il neurone, ma in generale ha a relazione di quella che viene anche chiamata **sommazione degli impulsi**, sommazione degli stimoli. In qualche modo il potenziale di membrana si comporta come una variabile che memorizza, tiene a mente, poi si scorda. Ed è fondamentale scordarsi le cose, anche dal punto di vista cognitivo ad altissimo livello. Se voi vi ricordaste nel dettaglio esattamente cosa avete mangiato **12**

anni fa alle **8:30** dell'**11 novembre**, probabilmente... questo perlomeno è quello che accade in un sistema artificiale come una rete di Hopfield, potreste avere una catastrofe, cioè il fatto di non riuscire a immagazzinare più alcun altro stimolo. Questa cosa della catastrofe dell'apprendimento è un tema molto interessante chiarito dalla meccanica statistica, quindi da campi di ricerca completamente distanti o distinti apparentemente dalla biologia.

Quindi anche a livello cellulare, dinamico, il fatto che se io esco dalla stanza a un certo punto (un tempo spero che non sia così breve) voi mi dimentichereste, ha come effetto quello di dire: “se gli stimoli sono abbastanza frequenti, sparo; se sono troppo diradati, se la loro frequenza è troppo bassa, io non li sento più, me ne scordo”.

Questo potreste giocare sulla generazione del potenziale d'azione e la velocità dell'attivazione dei *gate* individuali. Alla fine avete i valori numerici. Potreste semplicemente moltiplicare per **10%**, o dividere per **10%**, i valori assoluti di quelle tau, τ_m , τ_h e τ_n , e vedere se la cosa continua a funzionare. In alcune direzioni vi accorgereste che i potenziali d'azione diventano molto spanciati, in altre vi accorgereste che forse diventano inizialmente molto molto stretti, ma poi può essere che quando le scale temporali diventano paragonabili non vedete più niente, perché si attiva per esempio tanto velocemente il sodio quanto il potassio e si cancellano via via camminando.

La curva Frequenza-Corrente (F-I) La cosa interessante che vi faccio vedere fra un attimo, e di nuovo questo potreste tranquillamente farlo, è quello di sistematicamente cambiare il valore del vostro stimolo (supponete per semplicità di farlo quando lo stimolo è costante). E come l'altra volta vi facevo vedere contavo **1, 2, 3**, credo averlo fatto qui per tirare fuori quale fosse la frequenza di sparo media e vi ho detto che per il modello di Hodgkin-Huxley [sic] è un modello di eccitabilità di **tipo 2**, passa direttamente da **0 spike/secondo** a un certo valore, mi pare che fosse attorno a **50, 60, 70, 80 spike/secondo**.

Quello in altri termini che sto suggerendo di fare è di cambiare sistematicamente l'ampiezza di zero. Ogni volta dovete fare una nuova simulazione, come ogni volta sperimentalmente noi dobbiamo far riposare il neurone, cambiare il settaggio nell'amplificatore elettronico o nel computer e dire “ok, adesso ti inietto un'altra corrente con un'ampiezza ancora maggiore e ancora maggiore”. Quindi sto pensando a un protocollo che ha... che cresce, scusate, queste dovrebbero essere tutte orizzontali, quindi sono tutti valori costanti, per esempio li posso raddoppiare, ogni volta aggiungo **10 picoampere** e ogni volta se lo faccio su un tempo sufficientemente lungo posso stimare quanti spike al secondo ci sono.

Questo lo vediamo insieme adesso perché vorrei darvi l'intuizione del perché quando io aumento lo stimolo, aumento il *firing rate*, forse l'ho detto qui o l'ho detto venerdì, non mi ricordo, forse in entrambi i casi. Ci sono alcuni neuroni nella parte dorsale del midollo spinale che codificano il peso di uno stimolo propriocettivo che è per esempio nella mia mano adesso. Se mi raddoppiate il peso, adesso ho un neurone nella parte dorsale del midollo spinale che sta sparando una certa frequenza, se aumentate il peso la frequenza aumenta. Non è detto che sia lineare (raddoppiando il peso raddoppia la frequenza), anche qui non è detto che aumentando di un certo numero di volte la corrente, allora la

frequenza di sparo aumenta proporzionalmente, ma aumenta, il comportamento è monotono crescente. Vorrei farvi capire perché, ed è relativamente banale, e si tratta di parlare del **tempo di primo passaggio**.

Refrattarietà e Concentrazione Ionica La **refrattarietà assoluta e relativa**, ne abbiamo parlato, ve l'ho fatta vedere (correggetemi se mi sto sbagliando) in uno of quegli esercizi di stimolazione in cui con gli *slider* vi dimostravo quando un neurone diventasse parzialmente o in modo totale insensibile agli stimoli.

Questo non l'abbiamo fatto, ve lo faccio vedere adesso. Che cosa succede se cambio la **concentrazione extracellulare di potassio**? Che vi ricorderete, il potassio è molto concentrato dentro, è poco concentrato fuori. Quindi se fuori ne metto tanto, cosa succede al **potenziale di Nernst**? Potenziale di inversione delle correnti potassio? In termini... in che termini? Il numero che viene come cambia? Normalmente è **-80 mV** perché se abbassa...

Perfetto, perfetto. Tende a diventare **0** perché il logaritmo del rapporto se fosse dentro uguale a fuori sarebbe logaritmo di **1** che è **0**. Quindi è **-80** perché c'è questo sbilanciamento. Se le concentrazioni diventano paragonabili perché aumenta fuori, che cosa pensate che possa succedere se il potenziale of inversione delle correnti potassio tende ad aumentare, dato che il ruolo delle correnti potassio è quello di tirare giù il potenziale d'azione? Qualche idea?

Spero che non capiti a nessuno, o che nessuno di voi soffra di questa condizione medica, e avreste una convulsione epilettica, uno dei tanti modi con cui si può innescare un'equazione [sic], perché in qualche modo il potenziale di riposo, anche lo stesso potenziale di riposo, tende a diventare più depolarizzato e quindi il sodio, a cui non frega nulla del potassio, inizia ad attivarsi. Sì è vero il potassio non è sufficientemente in grado di portare giù il potenziale molto a iperpolarizzarlo, però vi faccio vedere che è sufficiente senza stimolo a avere un'attività spontanea, sostenuta, tonica, come in una crisi epilettica, in una *seizure*.

Questo ne abbiamo parlato l'altra volta e vi faccio vedere che mettendo a zero un particolare valore vi faccio vedere il cambiamento, quello che succederebbe se avessi delle tossine che bloccano selettivamente o i canali sodio o i canali potassio.

Esempi dalla Simulazione: Soglia e Rebound Firing Qui vorrei stimolarvi a giocare voi con il Google Collab che vi ho fatto vedere l'altra volta e che qui avete semplicemente per riferimento. Avete delle figure che ho generato e ho fatto copia e incolla su queste slide.

Quindi per l'esistenza della soglia sembrerebbe un fenomeno **tutto o niente**, sembrerebbe esistere in questo caso per questa scelta del protocollo di stimolazione una corrente che se non è particolarmente intensa il neurone non spara, vedete questa alla fine è una risposta passiva. Mentre se la corrente è sufficientemente elevata, il potenziale è portato a certi valori da cui poi non può più scappare, è un punto di non ritorno, per cui qui anche se lo stimolo è spento,

alcuni canali sodio si sono attivati e automaticamente stanno continuando a depolarizzare la cellula e depolarizzando la cellula si attivano ancora altri più canali in un *loop* positivo, in un *feedback* positivo. E vedete che si genera un potenziale d'azione. Generato questo potenziale d'azione non succede più niente perché non c'è più nulla, non c'è più uno stimolo esterno.

Però la stessa identica ampiezza, o diciamo cambiando la durata, può... quindi mentre prima un impulsino debole di corrente (ripeto la traccia rossa come vi ho detto la settimana scorsa, la sovrainpongo a questo grafico artificialmente, in teoria dovrei fare un doppio grafico, ma per farvela avere nello stesso punto è chiaro che non è misurata in millivolt, però è come se io l'avessi traslata e scalata per poterla mettere per motivi puramente estetici sullo stesso grafico). E vedete che ho un'ampiezzina piccola, che prima non faceva sparare, qui addirittura era ancora più alta e qui il neurone non sparava. Qui ancora un'ampiezza più bassa, più estesa nel tempo (quindi la carica trasferita è maggiore probabilmente). Qui era un tempo infinitesimo, probably **1 millisecondo**, qui è **2.5 millisecondi**. Qui è in grado di depolarizzare la membrana in un tempo sufficiente, accumula, accumula, accumula, a un certo punto, di nuovo qui c'è un punto di non ritorno e il potenziale d'azione parte.

Questo è quello che vi ho fatto vedere come possibile predizione in attesa del fatto che se apparentemente uno dice "ok, ma questo succede solo se lo stimolo esterno mi porta, porta il potenziale di membrana in direzioni depolarizzate, perché è lì dove si inizia ad attivare sodio, potassio e eventualmente altre correnti attive". Invece se iperpolarizzate sufficientemente a lungo, quindi se date uno stimolo di corrente negativo, potete fare tranquillamente anche in questo protocollo frequenza-corrente che vi suggerisco di fare.

Vedete che, ok, se è troppo breve, sì c'è una specie di *rebound*, ma non c'è uno spike. Qui se lo date per più tempo (di nuovo la carica è quello che conta), avete che esiste in queste condizioni, pur avendo la corrente zero (è stata tenuta a un certo valore, non mi ricordo potrebbe essere **-50**, ok, in queste unità di misura per quello che avete potrebbe essere **50 nanoampere**, potrebbe essere dell'ordine of 50 nanoampere), appena lascio, appena rimuovo questa forte inibizione che mi sta resettando ulteriormente tutte le cinetiche, particularly della **H**, che a riposo o in condizioni subito prima di uno spike, vedete che la **H** era **0.6**, cioè praticamente il **40%** è già inattivato. Quindi se io per caso lo rimuovo perché spostato molto a sinistra, valori molto negativi, il potenziale di membrana e lo tengo per un tempo sufficiente affinché H_{∞} ci va subito per definizione, ma **H** insegue H_{∞} con un po' di ritardo. Appena lascio andare **H** parte da un valore di... non più **1**, non è più **0.6**, quindi quello che prima era il **40%** di canali inattivati adesso non c'è più e in quella condizione a questi valori i canali di sodio sono in grado, proprio perché non sono completamente spenti a questi valori (**-60, -70, -80 millivolt**), non sono spenti, di sparare un potenziale d'azione, quello che viene chiamato *rebound firing*.

Il Concetto di Sommazione Temporale Questo è il contesto della **integrazione temporale** che ho cercato di indicare qui. Qui ho fatto esattamente la stessa cosa e sono degli impulsini piccoli. Credo che forse alla fine di oggi vi

farò un esempio stupido, matematico, in cui fondamentalmente invoco un argomento molto, ahimè, molto sensibile che è quello, in analogia, della iniezione di soldi sul mio conto corrente bancario da parte dell'università, che ogni mese mi dà dei soldi, mi dà un impulsino, e questo in nero dovrebbe essere il mio conto bancario, che inizialmente il giorno dopo l'influsso di questa corrente si carica e poi decresce, e ovviamente io non riesco a risparmiare.

Se l'università, anziché pagarmi ogni mese, mi pagasse ogni giorno (dovrebbe farlo), allora si avrebbe una specie di, vedete, una **sommazione temporale**. Ci sono delle differenze, ovviamente a parte che il mio conto corrente non si sommerebbe, non esplode, non fa i potenziali d'azione. Vedete che la coda di ogni evento che tende a scordarsi la storia precedente... Qui la coda è troppo piccola e il nuovo impulso non si somma al residuo di prima. Quando la frequenza, quindi lo spazio, l'intervallo fra uno stimolo e l'altro è più ridotta o la frequenza è maggiore, a parità di numero di impulsi (qui sono **6**, anche sopra sono **6**), vedete che la coda del precedente non ha avuto tempo di esaurirsi e quindi su quella coda alla fine è un condensatore, è un capacitore, è un accumulatore, vedete che la nuova iniezione di corrente mi carica ulteriormente, poi decado, mi carica, decado, mi carica, decado, e a un certo punto **integro gli stimoli nel tempo**. Questa è una cosa fondamentale dell'operazione delle cellule del sistema nervoso centrale in generale, che integrano nel tempo gli stimoli.

E in qualche modo potreste immaginare (ma ve lo dico solamente per... non è così semplice comunque) che in questo caso c'è una specie di relazione fra il numero di input e il numero di spike in input e il numero di spike in output. Non c'è uno a uno. Se io sono un neurone presinaptico e contatto un neurone postsinaptico, praticamente mai, per la debolezza della mia connessione (quindi per la debolezza dell'ampiezza, ma lo vedremo che cosa vuol dire l'ampiezza). Se io sparo uno spike, non è che il neurone post-sinaptico lo recluta eppure lui spara uno spike. Questo nei libri di testo è molto frequentemente la situazione. "Io sparo e il neurone post-sinaptico si eccita". No, si eccita molto molto poco. Quindi c'è una specie di relazione **N a 1**, servono tot input per una specie di demoltiplicazione, una specie di algebra, una divisione, un effetto divisivo computazionalmente dal punto di vista del processamento dell'informazione. Qui è una specie di divisione, io ho ridotto la frequenza che era all'ingresso e supponete che io abbia continuato con questa stessa frequenza, il neurone post-sinaptico avrebbe sparato una volta ogni **6**. Ok, potrebbe o meno incuriosirvi.

Quantificare la Frequenza di Sparo Questo è il punto della storia della "più è grande la corrente, tanto più è frequente l'attività spiking". Di nuovo vi invito a giocare, avete uno *slider* e potete verificare voi le cose. Quindi in teoria uno potrebbe fare questo sistematicamente, adesso potete anche partire da stimoli DC costanti negativi, stiamo parlando di **nanoampere, -50, -40, -30**, vedreste *no spike*. Qualche volta potreste vedere... no, non vedete *rebound spike* perché continuate a tenere il neurone iperpolarizzato. A un certo punto, quando la corrente è sufficientemente elevata, da far raggiungere... quando per questo particolare protocollo è sufficientemente elevata, vedreste che la curva salta (adesso ve lo faccio vedere) e continuando ad aumentare ogni volta (quindi dovete fare, non lo so, **5 secondi** di iniezione di corrente, poi spegnere; nel caso di una simulazione dovete resettare, riavvolgere il tempo e rifare partire la sim-

ulazione. Dal punto di vista matematico dovete ripristinare le stesse condizioni iniziali che avevate prima per le variabili di stato che sono V, M, N e H).

E facendo andare ancora vedreste che il numero di spike anziché essere qua è più alto, è più alto, è più alto e cresce. E per quantificare la frequenza avete due modi. Quando avete un comportamento da manuale, diciamo da libro, perché è una simulazione, perché non è un neurone biologico che vi farà vedere a momenti, potreste prendere un singolo intervallo interspike (si chiamano *ISI*, **Inter-Spike Interval** in letteratura). Prendete un periodo e lo invertite. Potreste immaginare che per essere più fini, immaginando che il neurone spara regolarmente, ma non è detto che spari esattamente riproducendo lo stesso intervallo, potreste dire “vabbè ok, li prendo tutti, faccio la media, la media aritmetica e poi faccio uno diviso questa quantità”. Oppure (e si dimostra che le due strade convergono quando il numero di spike è molto grande, o che è la stessa cosa, la finestra di osservazione tende ad essere molto grande) potete semplicemente contare, come ho fatto l'altra volta, quanti spike ci sono in, supponete, **5 secondi** e dividete per **5**, avrete numero di spike al secondo.

Tipi di Eccitabilità Neuronale (Tipo 1 vs Tipo 2) E quello che vedete è che (qui l'ho preso da questo articolo semplicemente come riferimento) che nel caso di Hodgkin e Axley [sic] esiste un valore dopo il quale... questo valore di corrente si chiama **reobase**. L'aerobase [sic] è la corrente minima superata la quale esiste un comportamento periodico sostenuto quando il protocollo sia un protocollo di iniezione di corrente costante. Questo salta da **0 spike/secondo** a **10 spike/secondo**. Non è HH, il modello di Hodgkin e Axley [sic] parte da **60-70**, ma non è così importante.

Ci sono invece altri modelli, altre cellule, in cui hanno la chiave... sono i valori numerici e la posizione of queste sigmoidi. Se parlate penso che ce l'abbiate con me. In questo caso per i cambiamenti della posizione delle sigmoidi, della sensibilità dal potenziale di membrana, avete invece un comportamento di **tipo 1** in cui la frequenza di sparo può essere arbitrariamente bassa.

E questa è la faccia della curva corrente nell'asse delle X, frequenza nell'asse delle Y. Se volete ingresso nell'asse delle X, uscita. Un termine di paragone che faccio spesso, anche se ovviamente è una semplificazione, non è sbagliato. Questa è come se fosse la **stele di Rosetta**. Vi ricordo che la stele di Rosetta è questa lastra (non mi ricordo di che materiale è) in cui per la prima volta si è trovato geroglifici, domotico [sic] e greco dello stesso testo e ha permesso di fare il *mapping*, abbiamo avuto la traduzione, l'alfabeto in qualche modo per il caso, per decodificare i geroglifici. È come se qui (e ovviamente ve lo dico solo per darvi, per segnalare l'importanza del concetto, non perché sapendo questo io capisco il cervello), se io vedo un neurone che spara **40 spike/secondo**, se io so la sua curva di frequenza-corrente, potrei inferire, semplicemente guardando questa curva e dicendo, “ok, qui deve essere 0... deve ricevere degli input che sono attorno a **0.25**”, in questo caso milliampere, **250 nanoampere**.

Quindi in qualche modo questa è un'importantissima caratterizzazione del comportamento elettrico di un neurone, tanto che la prima cosa che uno fa quando studia un neurone vero (che sia un neurone dell'ippocampo, della spina dorsale,

della corteccia, che sia un neurone proveniente da un'operazione di chirurgia resettiva a Baggiovara, che ci danno i campioni e facciamo su neuroni), iniettiamo tante di queste correnti per vedere qual è la faccia di questa curva frequenza-corrente.

L'Intuizione: Perché la Frequenza Aumenta con la Corrente? Prima della pausa provo a chiedervi, e poi lo facciamo assieme, se avete un'intuizione, se potete dirmi, se vi frega qualcosa, del perché questa curva frequenza-corrente dovrebbe essere crescente, monotona crescente in particolare. Perché dovrebbe esserci questa caratteristica di, ok, la frequenza è legata a un regime periodico, ok, questo lo vedo, la frequenza è perché c'è una serie di oscillazioni e io posso caratterizzare il periodo o la frequenza, uno è l'inverso dell'altra. Ma perché cambiando la corrente cambia la frequenza? Questa è una cosa che dovrebbe essere alla vostra portata per tutte le cose che abbiamo discusso e in generale per il concetto di carica e scarica di un condensatore. Avete qualche idea?

Ok, però perché questo deve essere... Allora, non so se quello a cui sta pensando è giusto. Così come me l'ha detto, no, perché durante il periodo refrattario il neurone ignora l'input della corrente. Ok, quindi se lei non parla più del periodo refrattario, lei sta dicendo "al termine di uno spike che succede quando la corrente è ancora maggiore e perché dovrebbe avvenire prima o dopo?". Però il periodo refrattario relativo è definito come "il neurone non spara alla stessa ampiezza di corrente che stavo dando prima, però sparerebbe se io lo aumentassi", però in un protocollo del genere io non sono in quel caso ipotetico in cui dico "ah ok aumentiamo...".

L'intuizione forse ce l'ha perché esattamente... e poi facciamo una pausa per dieci minuti... quello a cui dovrete pensare (e se non vi viene in mente non muore nessuno, chi se ne frega, però spero che lo capiate dopo) è che questo comportamento ripetitivo dipende in qualche modo da quanto tempo passa e da che cosa, da quale effetto ha la corrente fra la fine di uno spike e l'inizio del successivo. Però la spiegazione è molto semplice e la vediamo assieme.

Dieci minuti di pausa, sapete dove trovarmi se avete domande.

Meccanismo della Frequenza: Il Modello Passivo (Integrate-and-Fire)

Ok. Quindi per tornare a questo modo di darvi un'intuizione, voglio ulteriormente ripetere che frequenza e periodo alla fine sono la stessa cosa. Sono in un regime periodico, ho un'oscillazione, quindi la quantificazione per me di una frequenza è la stessa cosa che la quantificazione del periodo. A rigore non lo dovrei fare perché a rigore potrebbe essere non un regime periodico a frequenza uniforme. Però se ho uno spike qui, uno spike qui, uno spike qui, in effetti per me, visto che c'è una caratteristica di regolarità, T è il periodo, io definisco la frequenza F , $1/T$.

E vorrei di nuovo approfittare, perché l'intuizione del vostro collega non è totalmente fuori strada e quello che io vedo è che dopo ogni spike c'è una specie di *reset*, giustamente c'è un periodo refrattario assoluto e relativo, a un certo punto è come se ripartissi (adesso lo sto esagerando), è come se ripartissi dallo stesso... scusate sarebbe qui... è come se ripartissi dalla stessa condizione. Se c'è

ancora lo stimolo, ok, io ripeto esattamente quello che avrei fatto prima e ho un altro spike. Quindi, visto che il comportamento è periodico, io potrei voler studiare soltanto uno di questi periodi e vorrei poter capire cosa succede se a una certa condizione iniziale come cambia questo pezzettino di traiettoria del potenziale di membrana quando gli vado a aumentare l'intensità della corrente.

E per farlo è molto utile (lo si vede anche qui intuitivamente, ma ve lo racconto su un equivalente circuitale passivo). Quindi per il momento tolgo le conduttanze sodio e potassio che sono voltaggio-dipendenti, cioè a dire, penso che questo fenomeno stereotipato dell'iniziazione, dell'avvio del potenziale d'azione sia ovviamente dovuto al sodio e al potassio, ma a me non interessa una volta che questo fenomeno è avviato, voglio capire come ci arrivo. E quindi mi viene più semplice studiare il potenziale di membrana (adesso riprendo il modello e l'equazione matematica del potenziale alla fine sotto-soglia), oppure l'equivalente di Thévenin per una membrana passiva, e cerco di estrapolare (e vedrete che in qualche misura si riesce) le considerazioni che faccio in un caso passivo al caso attivo.

L'Equazione della Membrana Passiva e lo Steady-State La prima cosa che faccio è, di nuovo, scrivo... vedete, non c'è il ramo del sodio e il ramo del potassio e se ci fossero altre conduttanze voltaggio-dipendenti (calcio, potassio che si inattiva, sodio persistente, c'è uno zoo di canali di membrana voltaggio-dipendenti)... dipendenti... ce ne sono alcuni che sono voltaggio-dipendenti, alcuni sono dipendenti dalla concentrazione ionica, altri sono dipendenti dalla presenza di neurotrasmettitori, c'è una diversità immensa. Ma io me ne frego e dico che per me questa conduttanza è l'unica che c'è e non è una brutta approssimazione. Torno fra un attimo alla simulazione perché nelle simulazioni che faccio, che vi ho dato, trovate in effetti tre colori, la curva nera, la curva non mi ricordo blu e una tratteggiata, adesso vi dico chi è chi.

Comunque, se io butto dalla finestra tutti i canali voltaggio-dipendenti, ho una roba che non è voltaggio-dipendente, è un termine ohmico, una corrente ohmica e questa è l'equazione associata. Vedete, io non ho più i termini sodio, potassio, posso pensare che questo sia soltanto G_{Leak} . E se guardo questa cosa qua, io questa conosco perfettamente perché di nuovo è la solita equazione differenziale noiosa che spero che a un certo punto, visto che più o meno ne parliamo due o tre volte alla settimana, vi entri nel cervello se non l'avete già vista. È a coefficienti costanti e del primo ordine, c'è un termine forzante come quello che ho discusso prima, che in generale è arbitrario, però io qui per semplicità sto cercando ancora di capire cosa succede quando il termine forzante è costante.

Facciamo finta che sia costante, che venga attivato e che resti costante per sempre. Non mi interessa tanto questo esempio che credo di avere... sto riprendendo questa figura da una discussione precedente in cui vi facevo vedere che in questo caso io so vita, morte e miracoli, so come scrivere la soluzione analitica, l'espressione che mi descrive questo arco di esponenziale che si carica e questo che si scarica. Qui la guardo in un modo senza toccarla per il momento, di nuovo uso questa euristica e dico: se esiste uno *steady state*, e alla fine lo so che esiste perché è un'equazione noiosissima, dissipativa, quindi se questo termine di corrente è costante ed esiste uno *steady state* vuol dire che V è costante e quindi la derivata di una costante è zero.

Quindi io automaticamente, quando guardo una roba del genere, metto questo termine a sinistra... a sinistra dell'uguale a 0 , quindi non ho più $C \cdot dV/dt$ uguale a qualcosa, ho $0 = G \cdot (E - V) + I_{\text{ext}}$ e quindi posso chiedere, ok, in questo caso qual è questo valore di *steady state*? Semplicemente algebra, porto dall'altro lato questo qui, cambio il segno, divido ambo i membri per G e di nuovo porto questo dall'altro lato. Ottengo un'espressione che intuitivamente ha senso ed è $E + \text{qualcosa}$. E era il valore che si sarebbe avuto allo *steady state*, all'equilibrio, quando la corrente fosse stata nulla. Se non avete quella corrente, non avete $C \cdot dV/dt$ perché V è costante, avete che $0 =$ questa quantità e la quantità a destra dell'uguale è 0 soltanto se $V = E$. Ma appunto E era il potenziale di riposo in questa visione semplificata.

Quindi se voi mettete una corrente (positiva o negativa, positiva è più semplice), è chiaro che a regime, quando i transitori si sono esauriti, è quello che avreste avuto prima più qualcosa. Infatti qui avete $E + \text{qualcosa}$ (comprendo se I_0 fosse negativo sarebbe sotto, però in questo caso assumiamo che sia positivo).

Assumo che sia positivo perché mi fa piacere che quando, dopo l'esaurimento dei transitori, il potenziale che potrebbe essere raggiunto allo *steady state* (qui è raggiunto, ma nel caso di questa figura in cui è un gradino di durata finita e dipende dalla durata, qui questo esponenziale è già arrivato allo *steady state*, è già arrivato al limite asintotico, però in teoria potrebbe non avere tempo per arrivare).

Il Tempo di Primo Passaggio (First Passage Time) E quindi mi chiedo, se $E + I_0/G$ è il valore di *steady state* teorico nuovo che potrebbe arrivare, se I_0 non è sufficientemente elevato, io qui... ok, lasciate perdere la concavità. L'anno scorso un vostro collega ha detto: "eh sì però ok, lì la concavità è verso il basso, qui ogni volta che ci fa vedere le simulazioni sembra che la concavità sia verso l'alto". Ovviamente ci sono delle conduttanze che sono voltaggio-dipendenti, quindi il discorso non è così semplice.

Però se mi lasciate utilizzare questa approssimazione, la cosa che posso estrarre è che se la corrente non è particolarmente intensa, il nuovo *steady state* mi porta a un potenziale di membrana che è basso, è quello che era prima, **-70 millivolt**, in qualcosina... e questo qualcosina probabilmente non è sufficiente per reclutare i canali sodio e innescare questo meccanismo, quindi questo valore, questo nuovo *steady state*, resta come uno *steady state*.

Cosa diversa è se questo I_0 è sufficientemente elevato affinché questo asintoto orizzontale sia sufficientemente depolarizzato per innescare i meccanismi. Io ho detto che non esiste una soglia fissa, io qui penso, ma supponete che ci sia una soglia fissa, che sia qui, attorno al punto di mezzo di quelle sigmoidi (era attorno a **-50 millivolt**). Non è che io posso capire qualcosa se cerco di trovare quanto tempo impiega a caricarsi questa membrana affinché questa traiettoria intersechi il valore **-50**?

Supponete che la soglia corrisponda a **-50**, in questo particolare grafico che vedete qui sulla slide, hai voglia se stiamo sopra. Addirittura non devo nemmeno aspettare lo *steady state*, un tempo teoricamente infinito (alla fine è qualche 2-3

τ , 2-3 costanti di tempo), io dopo qualche millisecondo sono già qui. E la cosa che vorrei farvi intuire è quanto più tirate su questo I_0 , tanto più tirate su questo asintoto, tanto più la carica del condensatore diventa più ripida perché deve coprire in un tempo che è sempre quello del più o meno τ , ma in termini relativi, in termini assoluti deve andare più in alto e quindi interseca, per esempio il valore di **-50**, prima.

Quindi la cosa che faccio è ottengo la soluzione analitica di questa equazione differenziale, che di nuovo è la somma di due termini, bla bla bla bla, ma alla fine è il potenziale di riposo più questo termine qua. Lo controllo dimensionalmente e dico: siamo sicuri? Sì, E è un potenziale elettrico perché a sinistra ho millivolt. I_0/G , sì, è un potenziale elettrico perché la legge di Ohm, $V = I/G$ (perché sarebbe $V = R \cdot I$, però non R , è l'inverso di R). E questa quantità qua è adimensionale, **1** è adimensionale e l'esponenziale pure non ha unità di misura, quindi sono contento. E per essere ulteriormente contento vedo che qui c'è il segno meno perché c'era il meno qua, quindi un pensiero della vita è andato e poi G/C ha le dimensioni di un tempo⁻¹ perché tutto deve essere adimensionale all'esponente di questo esponenziale, visto che moltiplica il tempo le unità di misura devono cancellarsi.

Effettivamente, dimensionalmente, G/C è un tempo [sic, intende $1/\text{tempo}$]. Me lo ricordo perché mi ricordo che $R \cdot C$ è un tempo, supponete millisecondi, nel caso di una membrana biologica è un valore attorno a **20-50 millisecondi**. Quindi la rapidità con cui questa curva si carica ha quell'ordine di grandezza, quella scala temporale, quella costante di tempo, **20-50 millisecondi**. Ora se $R \cdot C$ è un tempo, lì è scritto C/G ... ok lo vedo a occhio, questo non è un diviso, è un... ok, $R \cdot C$ oppure C/G (che è l'inverso di R) continua a essere un tempo. In quel caso è G/C , quindi è l'inverso e quindi sono contento perché si cancella col tempo dell'esponente. Un'altra cosa che posso fare, mi posso rendere conto che quando i transitori si esauriscono, cioè mandando $t \rightarrow +\infty$ questo termine esponenziale sparisce e io ottengo quello che ottengo euristicamente mettendo a zero il termine di derivata. Quindi ok funziona, che ci faccio con questo?

Calcolo del Tempo di Primo Passaggio (T*) Mi serve il transitorio perché io adesso vorrei capire se riesco a esprimere in funzione della corrente il **tempo di primo passaggio**, il tempo che impiego da questo punto qua (che lì è convenzionalmente messo a riposo, ma qui io sto pensando che questo punto qui è lo stesso punto del successivo alla refrattarietà relativa assoluta... alla fine la refrattarietà relativa dà un po' di fastidio, ma io posso pensare che esista un punto in cui il neurone è pronto per sparare un'altra volta e questo punto è la mia condizione iniziale di quell'equazione).

Quindi scrivo, riscrivo questa espressione e dico, qual è... ok, posso innanzitutto dire, anticipo che se I_0 è tale per cui questa soglia, $V_{\text{threshold}}$ (chiamatela come volete, qualche volta in letteratura è chiamata anche θ come soglia in greco, oppure V_{th} , threshold). Se I_0 non arriva alla soglia non c'è nessun attraversamento, quindi questo tempo di primo passaggio non sarà definito. Io ho bisogno che questo asintoto qua stia sopra, altrimenti non avrò mai che questa curva qui interseca la soglia.

E quindi posso fare la domanda: qual è il tempo t tale che $V(t)$ è uguale alla soglia? Cioè dire, se io qui sostituisco un valore numerico (supponete **-50**, **-30**, quello che volete, un numero), qual è il valore di tempo t che soddisfa questa equazione? Cioè quanto impiega la membrana a caricarsi per arrivare a quel punto?

Lo chiamo T^* , T stella, T asterisco e con uno sfoggio di sofisticatissima matematica (che sto scherzando, è semplicemente applicare il logaritmo da ambo i membri), mi tolgo dai piedi l'esponenziale e riesco a rendere esplicita... questa è un'equazione algebrica non lineare, non ho un termine esponenziale e per fortuna riesco a rendere esplicito t uguale... Come faccio? Mi tolgo l'esponenziale con la sua funzione inversa, applicando il logaritmo dopo aver portato al primo membro questa E e questo I_0/G , opportunamente dividendo e moltiplicando, e anche il $+1$ per cancellare l'esponenziale. Quindi a sinistra mi resta $T^*/(RC)$. Non so perché l'ho scritto così e non ho più usato G , forse perché veniva un pochino meglio, se no avevate I_0 , avevate delle frazioni sia al numeratore che al denominatore. Però è uguale, o R o G , alla fine se provate a farlo vi resterà $1/G$ e potete chiamarlo R .

Mi farebbe piacere, a parte RC che è un numero, è una costante, qui ho un'espressione matematica che passa per quello che è il logaritmo e voi sapete che il logaritmo, che era una delle uniche funzioni che vi ho chiesto di ricordarvi, in questo caso il logaritmo più o meno ha questa forma qua ma... e qui passa quindi attraversa, assume il valore di zero quando l'argomento è **1**. Ovviamente ha come dominio di definizione i reali positivi, quindi qui non è definito e non me ne frega niente del logaritmo di una quantità negativa che magari ha un significato in campo complesso. Io voglio capire quanto tempo devo aspettare affinché ci sia un attraversamento di soglia e quindi non mi interessa se sia un tempo complesso, non ha senso in questo contesto.

Vuol dire fondamentalmente che se qui l'argomento del logaritmo è negativo perché la corrente I_0 è troppo piccola (e lo vedo da qui sotto), se è troppo piccola, cioè se $E + R \cdot I_0 - V_{\text{threshold}}$, se questa è una quantità negativa, vuol dire che non ci arrivo mai, vuol dire che sono nel caso di questa descrizione. Non ci arrivo mai, quindi non esiste una soluzione e mi va bene, non esiste un attraversamento, non esiste uno spike successivo, non esiste una frequenza.

Quindi qui lo rimaneggio scrivendolo così e lo voglio plottare in funzione della corrente perché E è un parametro, R è un parametro, l'unica variabile indipendente che voglio considerare è I_0 . E se provate a fare lo studio di funzione di questa funzione qui, vi accorgete (per esempio potete portare $I_0 \rightarrow +\infty$), vedete che tende a diventare **1**. Oppure in modo più qualitativo, se I_0 è molto molto grande il termine al denominatore E e $-V_{\text{threshold}}$ possono essere trascurati perché sono molto più piccoli e resta $R \cdot I_0$ diviso $R \cdot I_0$ che si semplifica e diventa **1**. Non è una condizione indeterminata ∞/∞ , qui vanno con lo stesso ordine a infinito e lo posso provare con questa euristica in cui di fatto trascuro i termini che non variano con I_0 perché sono costanti e sono trascurabili.

Logaritmo di **1** è **0**, quindi quando I tende a ∞ [corretto: $I_0 \rightarrow \infty$], questo [corretto: T^*] ha come asintoto orizzontale il tempo uguale a **0**. E torna, perché se io sparassi una corrente molto molto potente, da qui andrei a soglia immediatamente, praticamente immediatamente. Con correnti meno intense, ok, il tempo

di attraversamento è, secondo una dipendenza logaritmica, sempre maggiore.

Relazione tra T^* e Frequenza (Curva F-I) Se il tempo è nullo vuol dire che la frequenza è infinita perché $1/\text{tempo}$, $1/\text{periodo}$... In realtà non è necessariamente infinita perché non sto considerando il periodo di refrattarietà oppure, se volete, in un caso ancora più semplice il fatto che qui ho il potenziale d'azione ha una certa durata, quindi due potenziali successivi comunque non risultano in due picchi che sono sovrapposti, che sono vicini a piacere, al di là della refrattarietà, o meglio, in virtù della refrattarietà assoluta. Quindi il secondo potenziale d'azione lo posso avere con questa curva, questa gobba più ripida e quindi il potenziale d'azione tende a generarsi sempre prima, ma non posso passare... in effetti questo sarebbe l'intervallo... non posso passare il tempo di refrattarietà [sic] oppure tra il picco e questo punto in cui sono pronto di nuovo.

E l'altra cosa che posso vedere è che praticamente esiste un valore della corrente $V_{\text{threshold}}/R$ (o $G \cdot V_{\text{threshold}}$) avvicinandomi al quale (quindi è quando la corrente è marginalmente superiore al valore minimo, alla **reobase**, e il valore di reobase è questo valore qui, è il valore minimo affinché si abbia un'attività autosostenuta, sostenuta nel tempo), vedete che il tempo tende a divergere, cioè impiega un tempo molto molto molto molto lungo, idealmente infinito, cioè non succede mai quando la corrente sia al di sotto di questa quantità. In realtà quando la corrente è al di sotto non è proprio definita la funzione, perché non c'è un attraversamento di soglie.

Quindi se io faccio $1/\text{questa quantità}$ qui, ottengo un grafico e potete provare che è molto simile a questo, è molto simile a questo qui. C'è una certa saturazione...

...la saturazione c'è perché non potete avere due picchi che sono arbitrariamente vicini e c'è un valore minimo perché al di sotto del quale il tempo diventa infinito e quindi la frequenza diventa zero e in effetti qui la frequenza è definita come zero, non ci sono degli spike.

Tempo refrattario è assoluto, ne abbiamo già parlato, vi ho fatto vedere il demo l'altra volta. Di nuovo qui è il fatto che la frequenza-corrente saturi è dovuta proprio al fatto che due spike non saranno mai arbitrariamente vicini. Ci sarà un qualche intervallo che sarà sempre invalicabile. Se ho questo intervallo invalicabile, che nella slide precedente ho chiamato T_0 , in realtà dovrei chiamarlo periodo di refrattarietà, lo potrei chiamare τ_{ARP} (Absolute Refractory Period), più c'era T^* . È chiaro che anche se T^* diventa piccolo quanto volete, diventa **0**, la frequenza al massimo diventa $1/\tau_{\text{ARP}}$. T [corretto: T^*] non può diventare negativo e quindi roscchiare questa quantità. Quindi quando T [corretto: I] aumenta F diminuisce [corretto: quando I aumenta, T^* diminuisce e F aumenta], perché è $1/\dots$ quindi al variare della corrente, voi avete che a un certo punto la curva di frequenza-corrente, in teoria, anche se non è detto che si possa osservare, tende a un asintoto orizzontale che è $1/\tau_{\text{Absolute Refractory Period}}$. Chiaramente la difficoltà di questa descrizione è che io non ho effettivamente un numero, non ho un valore fissato del tempo di refrattarietà, è più un fenomeno emergente sulla base di quei fenomeni legati all'inattivazione alla H .

Modulazione Farmacologica (Simulata): Concentrazione di Potassio

E ok, *absolute and refractory period*. Qui è il caso in cui (e di nuovo avete la simulazione, vi chiedo di provare a giocare) in cui senza iniettare alcuna corrente (qui vuol dire zero, ho comunque rappresentato la traccia con la stessa convenzione in cui la traccia è sovrainposta per puro motivo estetico nel grafico che in teoria ritrae millivolt in funzione del tempo, però lo faccio lo stesso per darvi una guida), semplicemente cambiando, aumentando la **concentrazione extracellulare del potassio**, il potenziale di Nernst tende a diventare più depolarizzato (come i vostri colleghi hanno, vostra collega ha correttamente intuito) e il potenziale di riposo, che avevo scritto da qualche parte prima (la famosa media pesata dei potenziali di inversione o di Nernst delle singole specie ioniche pesati dalle conduttanze), anche quella spontaneamente tende a essere più polarizzata [corretto: depolarizzata], scusate, più **depolarizzata**.

E se è più depolarizzata inizia ad attivare le correnti sodio. Quindi a meno che voi non eccediate con il potassio (cosa che paradossalmente si vede sperimentalmente), se mettete potassio avete un blocco della conduzione perché il potenziale di inversione delle correnti potassio, che normalmente è **-80 mV** e vi ho in qualche modo cercato di dire l'altra volta che mi serve che sia giù, perché andando giù mi toglie l'inattivazione del sodio. Se non è più così, a un certo punto si ha un unico spike, che sia... quello che viene chiamato **blocco di depolarizzazione**. Il potenziale resta bloccato in alto e l'attività non c'è più. Questo è pure una cosa che succede durante alcuni tipi di epilessia.

Qui è notevole che il modello di Hodgkin-Axley [sic] con le sole conduttanze sodio e potassio e voltaggio-dipendenti, uno gli cambia la concentrazione di potassio (per esempio quello che basta per fargli passare da **-80** a **-65**), e se volete potete ricavarvi da quella formula $RT/ZF \cdot \log(\dots)$ del rapporto delle concentrazioni, quanti millimolari è cambiato il potenziale extracellulare? È una roba algebrica, dovete scrivere la concentrazione fuori = valore vecchio + un Δ , e dovete provare a giocare con i logaritmi per capire quanto un cambiamento di circa **10 millivolt**, a quanti millimolari corrisponde.

Comunque, qui avete un'attività sostenuta a una certa frequenza che è **4...** sarebbero **8... 80 Hz**, e se iniettate una corrente negativa che tende a iperpolarizzare il potenziale di membrana, vedete che non c'è problema, il neurone anzi è ben felice di non sparare, quindi riuscite a spegnere una cosa del genere.

Optogenetica e Controllo Neuronale Lo menziono soltanto perché in letteratura e anche nel nostro laboratorio (ma non a scopo terapeutico ancora), la gente ha sviluppato, forse nel campo che avete sentito nominare, ve l'ho forse raccontato all'inizio, si chiama **optogenetica** (e prenderanno il Nobel nei prossimi anni sicuramente, sono due ricercatori, uno dell'MIT e uno di Harvard). Hanno messo delle proteine, dei canali di membrana o delle pompe ioniche che si trovano in altri organismi, nelle alghe principalmente (o perlomeno i principali con cui hanno iniziato erano nelle alghe), in cui le alghe devono fare, per esempio, fotosintesi, devono avere qualche tipo di informazione se c'è luce, un po' come alcuni fotorecettori, alcune cellule della nostra retina, che trasducono fenomeni luminosi con fenomeni elettrici, con fenomeni ionici.

E quindi nel nostro laboratorio abbiamo modo, con un vettore virale, di convincere dei neuroni veri a esprimere dei canali ionici che quando li illuminiamo con una luce arancione, rossiccia, questi canali si aprono, sono canali che fanno tipicamente scorrere... sono permeabili a potassio [corretto: cloro, come menzionato dopo], e quando questi in realtà cloro... e quando si attivano, quando io accendo la luce, l'attività spiking dei neuroni viene completamente abolita. Quindi se uno li mettesse nel cervello di una persona epilettica, poco prima dell'inizio di una convulsione, di un'attività sincrona, drammatica, uno potrebbe *flashare* la luce e resettare tutti i neuroni. E quindi impedirebbe questa iper-sincronizzazione, iper-attività.

Dal punto di vista controllistico, ingegneristico, abbiamo visto che quando teniamo il potenziale di membrana perché abbiamo la luce accesa, anche per poche decine di millisecondi, tutti i meccanismi di *feedback* negativo si rilassano e abbiamo una situazione così con quel famoso *rebound* che vi ho fatto vedere prima. Ok, abbiamo spento l'attività, immaginate che questo possa essere un pochino più lungo, e appena lasciamo andare, tutti i neuroni sono ben felici di riprendere, in effetti anzi sono più felici di riprendere la loro attività elettrica.

E la chiave sarebbe come faccio a, una volta che ho acceso la luce, a spegnerla in un modo graduale o viceversa? Come faccio come per il termostato di questa stanza, scusate troppo... Come faccio come per il termostato di questa stanza a avere una legge di controllo che mi impedisce delle oscillazioni, mi impedisce un comportamento instabile? Qui, con i vostri colleghi, abbiamo messo a **20 gradi**, non mi sembra che la temperatura sia drammaticamente scesa. Lui sta provando, il termostato sta provando in modo molto lento, per la dinamica del sistema da controllare, di azionare i termosifoni, probabilmente la reazione [sic] di aria calda, per tenere la temperatura costante. La stessa cosa dobbiamo fare, o si dovrebbe fare, per pensare a delle neuroprotesi basate sull'optogenetica per curare malattie dell'eccitabilità. Un altro esempio sarebbe la schizofrenia, però è un altro discorso, un'altra storia.

Farmacologia Simulata: Blocco dei Canali (TTX, TEA) Nell'ultima parte semplicemente vi racconto che è possibile simulare la **farmacologia**, questa è proprio una cosa molto semplice, in cui nel codice che vedete io ho delle variabili che si chiamano $G_{\text{barra_sodio}}$, $G_{\text{barra_potassio}}$. Mi ricordo che uno di queste nel modello di Hodgkin-Axley [sic] è più **120 millisiemens**, non mi ricordo questa quant'è, supponete che sia **60 millisiemens**. Mi pare che ci siano più canali sodio, assumendo che la conduttanza di singolo canale sia la stessa, ci sono più canali sodio di canali potassio oppure la conduttanza totale dei canali sodio è molto maggiore di quella potassio.

Se io voglio simulare la presenza di quella tossina **TTX** del *pufferfish* (non so come si chiami, il pesce tropicale che si gonfia e che può essere tossico perché la sua tossina si lega nel dominio extracellulare dei canali sodio e li blocca), quindi non solo non ho più potenziale d'azione, ma non ho neppure possibilità di controllare il mio sistema respiratorio e quindi cricco, muoio, tecnicamente muoio. Incredibile che la natura abbia evoluto delle molecole così selettive per dire "tu sei basato su *information processing*, sui canali sodio perché fai gli

spike, ti faccio un sabotaggio ai canali sodio". È quello che dicevo che uno per richiederlo deve dichiarare di non essere terrorista. Quando lo mettete in un esperimento in cui avete delle cellule, appena lo mettete, dopo qualche secondo, quando la sostanza diffonde e va in vicinanza dei neuroni, i potenziali d'azione impressionanti spariscono immediatamente. Praticamente si passa nel tempo da un secondo in cui la risposta del neurone ha un impulsino di corrente che evoca uno spike e lo evoca, a una condizione in cui non c'è più alcuna eccitabilità ed è notevole.

Ed è un utilissimo controllo sperimentale per capire che cosa dipende dall'attività elettrica delle cellule. Se io tolgo, dal punto di vista, se volete, chimico, spengo i canali sodio, se quello che ancora vedo, se quello che sto studiando ancora lo vedo, vuol dire che non dipende dall'attività elettrica delle singole cellule.

Quindi qui mi è così facile come mettere **0**, questa variabile uguale a **0**, anziché là dove nel codice c'era scritto questa variabile uguale a **120** la metto a **0**. Posso ripetere la simulazione. Idem per... ok, vi avrei dovuto chiedere qual è secondo voi la conduttanza che ho spento, qui l'ho spenta del tutto, non so perché ci sono due grafici qui, qui ho abbassato questa quantità, anziché **120**, ho ridotto quindi il numero di canali sodio disponibili e ho una specie di aborto, di potenziale d'azione.

In questo caso invece, è il caso duale ed è interessante da vedere perché penso che possa rispondere a quello che è l'intuizione. Qui avete una tossina, questa famosa **TEA** [corretto: TITEA nel testo, ma TEA è più comune per Tetraethylammonium], che blocca i canali potassio e quindi a un certo punto avete l'apertura dei canali sodio, la loro inattivazione, ma non avete più nulla che li riporti a **-70**, **-80 millivolt**, li iperpolarizzi, e quindi la traccia del potenziale di membrana resta bloccata in quella che viene chiamato *depolarization block*, quindi è un blocco della depolarizzazione, qui non fa più nulla il neurone perché non gli viene mai data l'occasione per ritornare a una condizione iniziale dove era pronto per sparare una nuova volta. Credo che la differenza fra questi casi sia che qui ne ho messo un pochino, quindi anziché mettere questo valore a zero l'ho ridotto, l'ho messo al **50%** e tant'è se non avete abbastanza sodio non tirate giù [corretto: su] il potenziale di membrana.

Di nuovo queste sono cose banali ma è molto interessante metterci le mani. Sperimentalmente dovete comprare delle tossine costose e usarle con estrema cautela, in una simulazione a calcolatore non dovete mettervi guanti, non dovete mettervi le mascherine, non dovete dichiarare di non essere terroristi, potreste essere pure dei terroristi.

Oltre il Modello di Hodgkin-Huxley: La Diversità dei Canali Ionici

Quello che ho detto prima, e non espando su questo argomento in questo corso, è che in realtà i neuroni non hanno solo conduttanze sodio, voltaggio-dipendenti e potassio, quindi non hanno i famosi *fast inactivating voltage-gated sodium channels* (quindi inattivazione rapida) e per il potassio *delayed rectifier* (rettificazione e ritardo e comportamento ritardato).

Esiste una quantità enorme di canali ionici, adesso non ho con me né il libro né la figura, ci sono dei libri solo per i canali ionici voltaggio-dipendenti, ci sono famiglie enormi, hanno un corrispettivo genetico, in specie diverse ci sono delle varianti e quindi non tutti i canali hanno lo stesso omologo in tutte le altre specie. Per il sodio e il potassio voltaggio-dipendenti del tipo di Hodgkin-Axley [sic] sì, ed è per questo che ancora ne parliamo.

Fenotipi Elettrofisiologici: Sparo Tónico, Fasico e *Bursting* È possibile che un neurone soggetto a un'iniezione di corrente possa o non sparare (quindi non avere attività), o avere un'attività **tonica**, o avere un'attività **fasica** (come si dice tecnicamente). In particolare questo ha un altro nome, ha anche un altro nome che si dice un'attività a ***burst***. *Burst*, non lo so tradurre in italiano, è una specie di scossa, di periodo, di pacchetti di potenziali d'azione che vengono sparati e poi c'è un intervallo di diversi centinaia di millisecondi in questo caso senza potenziale d'azione.

È chiaro che per quanto voi possiate provare, quando la corrente qui è costante oppure è un'attività spontanea, non avrete mai nelle simulazioni che vi ho dato o nel modello di Hodgkin-Axley [sic] o immaginando che ci sia solo sodio e potassio del tipo che vi ho raccontato, non avrete mai un cosiddetto **fenotipo elettrofisiologico** come questo. Perché? Perché è il risultato della presenza di altri tipi di canali e ci sono, come detto, diversi canali che a seconda della loro... (ho cancellato, qui c'erano le cinetiche di attivazione, scusate, le curve di attivazione, le $m_\infty, h_\infty, n_\infty$), ci sono dei canali che hanno quelle curve che sono *shiftate* in modo diverso, oppure hanno le τ che sono diverse.

Correnti Modulanti e Adattamento della Frequenza di Sparo (Spike-Frequency Adaptation) E per esempio in alcuni casi ci sono delle correnti che si chiamano, sono selettive al potassio, che si chiamano **muscariniche** (che hanno un effetto sempre di opporsi all'eccitabilità). Qualunque tipo di corrente che vedete che è selettiva al potassio per il suo potenziale di inversione o di Nernst, di equilibrio (**-80**), se si attiva tende a scoraggiare gli spike, quindi tende a rallentare la frequenza. Viceversa tutte le correnti che sono legate al sodio, al calcio, che hanno il potenziale di inversione a depolarizzato (**20, 30, 100 mV**), tendono a aumentare l'eccitabilità. Questo è un concetto molto importante che rivediamo nella descrizione dei recettori sinaptici.

Quindi di nuovo depolarizzato o iperpolarizzato, al di là di essere uno è negativo e uno positivo ma non è che il segno algebrico conti, conta se sono sopra o sotto il potenziale di riposo. Tutto quello che è sopra tende a favorire, a aumentare la frequenza, ad accelerare la frequenza, quello che è sotto tende a frenarla.

In questo caso vedete un fenomeno che si chiama **adattamento frequenza-dipendente**, in cui nonostante lo stimolo sia costante, il neurone inizia rapido e poi si rallenta, esattamente come le cellule gangliari e anche le cellule della corteccia visiva primaria che vi ho fatto vedere negli esperimenti di Hodgkin e Sudo [?] domani. Gli esperimenti di **Hubel & Wiesel** mostravano all'udito, si sentiva proprio un *trrrr*, il *pitch* del suono era rappresentativo della frequenza che diminuiva.

Qui in questo grafico vi ho semplicemente messo alcuni nomi di conduttanze, per

esempio di correnti. Ci sono alcune correnti che tendono a ritardare l'insorgenza di uno spike, sono importanti perché in alcuni casi si chiamano **conduttanze di tipo A**, tendono a essere conduttanze del potassio ma hanno una inattivazione. La botola famosa che sembrava essere solo prerogativa [?] del sodio, ce l'hanno anche alcuni canali potassio, un'altra famiglia, un altro gene, un'altra proteina. E ci sono delle altre correnti, correnti che si chiamano *after-hyperpolarization*, che vengono dopo la iperpolarizzazione dovuta al potassio, che pure contribuiscono a modificare quello che è la forma del potenziale d'azione o la dinamica del potenziale di membrana dopo il potenziale d'azione. Per esempio in questo caso vedete che c'è un progressivo aumento dell'*inter-spike interval*, inizia rapido e dopo poco inizia a rilassarsi. Questo è la possibile modellistica matematica e oggetto di altre considerazioni.

Un Esempio Sperimentale: Neuroni Umani da Cellule Staminali *in vivo* Per farvi vedere che è una cosa che quasi quotidianamente si vede in laboratorio, vi faccio vedere una traccia registrata anni fa da un ricercatore nel mio laboratorio quando eravamo in Belgio (adesso è professore associato al Politecnico di Milano, un bioingegnere). E il tipo di esperimento era molto interessante, però in questo caso ve lo sto semplicemente vendendo come fosse un neurone.

L'esperimento era interessante perché consisteva nel prendere delle cellule staminali, embrionali oppure indotte pluripotenti, differenziate da prelievi. Queste cellule venivano, in una piastra di Petri, differenziate in neuroni, quindi avevamo cellule staminali umane che venivano differenziate e trasformate in, riprogrammate in neuroni e venivano, come conclusione a una cosa già particolarmente complicata, venivano dapprima trasdotte con un vettore virale che faceva loro esprimere una proteina fluorescente, la famosa **GFP**, che forse avete sentito tutti (premio Nobel tanti anni fa a uno scienziato dell'MIT, Tonegawa), Green Fluorescent Protein, in modo tale che Daniele Linaro le vedeva al microscopio quando tentava di introdurre quella famosa pipetta che vi ho fatto vedere e vedeva le cellule come nella superficie della Luna con quella tecnica microscopica che vi ho raccontato essere chiamata **DIC**, *Differential Interference Contrast Microscopy*, microscopia a contrasto differenziale basata sull'infrarosso. Se cercava le cellule fluorescenti, cambiando la sorgente luminosa, vedeva quelle verdi e quelle verdi erano quelle umane.

E le vedeva nella corteccia di un topo in cui erano state impiantate, nel tentativo, nella speranza di capire cosa succede, nelle terapie cellulari in cui cellule staminali differenziate in... pensate al Parkinson, in cui una porzione delle cellule nervose muore, e le rimetto dentro quelle identiche al paziente, perché le prendo dalla pelle, le rendo pluripotenti, e poi le riprogrammo per essere neuroni.

L'esperimento era molto complicato perché fare un impianto di cellule umane in un altro tipo di organismo è un casino, perché c'è uno xenotrapianto in cui il sistema immunitario del ricevente non riconosce la cellula come sua e quindi la attacca, a meno che non sia un topo trasgenico che è immunodepresso, quindi non ha quasi un sistema immunitario. Solo che questi topini immunodepressi sono estremamente fragili, uno li guarda e muoiono purtroppo, quindi tenerli per nove mesi, tempo necessario per la maturazione, che ricapitolava lo stadio embrionale umano, nove mesi per raggiungere maturità elettrica in un animale

che poteva morire da un momento all'altro, è stato complicato.

Analisi della Traccia: Adattamento e Irregolarità E quando lui ha innestato una corrente per... credo che questi siano una decina di secondi, questo è una barra di calibrazione, si dice, ed è **mezzo secondo**, quindi qui è uno, due, sarà una quindicina di secondi o dieci secondi. Se strizzate gli occhi vedete che innanzitutto che nonostante la corrente sia costante, qui non è propriamente un metronomo. Quindi il discorso che vi dicevo prima, se volete stimare qui la frequenza... vedete addirittura qui ci sono alcuni casi, si vede a occhio che qui c'è un po' più di spazio, quindi l'attività è regolare, ma come tutto in biologia non è esattamente un metronomo.

Se strizzate l'occhio vedete che qui i primissimi potenziali d'azione mostrano esattamente quello *spike frequency adaptation*, quell'adattamento della frequenza degli spike, che viene anche chiamata **accomodazione** o accomodamento forse in italiano. E ve l'ho forse menzionato perché è una cosa molto tipica dei recettori sensoriali, cioè delle cellule nervose che sono legate alla sensazione visiva, auditiva, propriocettiva, tattile, nocicettiva del dolore, eccetera. E vi ho fatto l'esempio che se un vostro collega da dietro vi afferra le spalle, voi probably avete una reazione di riflesso che si chiama *startle reflex* (non so come si dica in italiano), di sobbalzo (non è elegante l'italiano per queste cose). Però il vestito che avete da stamattina presumibilmente non è che vi fa saltare, eppure ce l'avete sulle spalle, non lo sentite più.

Questo perché evolutivamente il mondo non è stazionario, è costantemente tempo-variante e io forse ho bisogno di avere neuroni di tutti i tipi, anche sensoriali, che perdano interesse per ciò che non cambia nel tempo. Qui la corrente è costante. Se invece adesso entrasse la famosa tigre, che invoco ora mai da anni a lezione (per il momento non è mai entrata), sarebbe un cambio, una non-stazionalità notevole e quindi i miei neuroni dovrebbero sentire il cambiamento e per esempio sparare molto di più durante il cambiamento, perché il cambiamento contiene la sorpresa, contiene informazione e probably quelli dei nostri predecessori antenati che non avevano l'accomodamento sono stati mangiati dalla tigre [testo originale: città]... o da bestie simili.

Adattamento come Filtro Passa-Alto La cosa interessante è che se voi zoomate qui, si vede meglio questo adattamento frequenza-corrente [sic: adattamento della frequenza], e potete capire la storia che vi dicevo di caratterizzare la frequenza come l'inverso degli *interspike interval*. Paradossalmente qui lo potreste fare plottando in funzione del tempo $1/(\text{Intervallo di Inter-spike})$ e vedreste che il concetto di adattamento della frequenza è rappresentato da una specie di dinamica della variabile frequenza, dell'osservabile frequenza nel tempo. Parte molto elevato, quasi **150 spike/secondo** (ne avete uno spike, due, sono i primi due *inter-spike interval*, sono questi due punti qui), poi le cose si rallentano moltissimo e nell'arco di **due secondi** (che non sono sicuro che sia questo, no, potrebbe essere qui). Nell'arco di **due secondi**, quindi più o meno qua, vedete che c'è una specie di stato di *steady state* della frequenza che è bassa, sarà dell'ordine dei **20 spike/secondo**.

Tutti i neuroni in particolare del sistema nervoso centrale hanno un'attività elettrica molto bassa perché metabolicamente sarebbe costosissimo sparare a **100-150 spike/secondo**. Vedete l'esercizietto della volta scorsa in cui vi ho fatto vedere quanto eventualmente un compartimento di un neurone potrebbe essere scombinato dal punto di vista della concentrazione ionica. Voi continuate a mangiare banane, potassio e zucchero eccetera per le pompe ioniche eccetera, però... quindi metabolicamente è costoso e questo adattamento sembra far funzionare sia dal punto di vista del metabolismo, sia dal punto di vista dell'informazione.

In termini ingegneristici di filtri, di filtraggio, quelle cose lì (passa-banda, passa-alto, passa-basso), quindi che prediligono un particolare contenuto spettrale oppure che privilegiano le transizioni lente, le transizioni veloci, che cos'è, che filtro è questo? Se questa fosse la risposta all'impulso del filtro... Ok, no, non potrebbe essere perché sarebbe... se fosse... dovete ragionare in termini di frequenza degli spike. Che filtro potrebbe essere? È uno dei tre che vi ho detto, quindi avete **33%** di probabilità di beccarci.

Visto che l'importante è detettare la sorpresa, il cambiamento, e se invece è una roba che è costante, voglio perdere interesse. O è **passa-banda**, o è **passa-alto**, o è **passa-basso**, uno dei tre. Cercate, spero, di farvi venire un... Passa? No. Perché ha detto passa-banda? No, è il passa-basso. Dipende cosa state considerando. Il passa-basso... allora dovete immaginare che qui la risposta, questa è la risposta a un gradino, quindi l'input è un gradino, che in teoria contiene tutte le frequenze perché ha una transizione ideale, ripida, e quindi in frequenza è tutto, diciamo, in Fourier c'è energia in tutte le frequenze. E l'uscita di un passa-banda vorrebbe dire che lui tiene solamente in uscita una certa oscillazione, un certo set di frequenze. Qui un gradino ha come risposta quello di andare su e poi di tornare giù. È un passa-basso? Poi un passa-alto? È un **derivatore** o un **integratore**? Che sono altri modi per chiamare alla fine la solita equazione differenziale che per carità divina ve la chiedo all'esame.

Se ho un gradino e la roba è quella che, se strizzate agli occhi, l'uscita segue l'ingresso, però più ritardato, questo è un passa-basso. Al di là del fatto che elettricamente è un passa-basso, lì ho che la risposta è qualcosa del genere. Quindi, come [?] che ci è andato vicino? È un passa-banda... le volevo rompere le scatole perché in effetti alla fine è un **passa-alto**, perché il passa-banda avrebbe dovuto dirmi dove tagliava, era il fatto di dove tagliava. È un passa-alto, un derivatore, quindi il passa-banda è un po' più complicato da vedere dal punto di vista se è un integratore o un derivatore.

Lo chiamo derivatore o integratore perché se voi fate matematicamente l'integrale, quindi sto pensando di fare l'integrale da **0** o da $-\infty$ a t , dove t è una variabile indipendente ed è uno estremo dell'integrazione. Di fatto sto cercando di, per ogni t , di esprimere, di calcolare l'area, quindi l'area sottesa qui è **0, 0, 0, 0, 0, 0**. A un certo punto qui l'area diventa... salta e diventa piccola, man mano che il tempo passa l'area diventa sempre più grande. Quindi questa curva qua è il risultato di un'integrazione temporale. Mentre questo grafico qua, idealmente se questo fosse un gradino ideale (quindi una funzione... dovrei chiamarle distribuzioni, adesso faccio la pausa, quindi uno *step* di Heaviside), la derivata dovrebbe essere una **delta di Dirac**. Però se voi pensate che questo sia magari una rampa, la derivata è non nulla solo dove l'argomento cambia

nel tempo, quindi qui è zero e qui è zero, qui è zero, qui è zero e solamente dove... quando cambia nel tempo è non nullo. Quindi questo meccanismo di adattamento della frequenza fa un passa-alto, fa una derivata e derivata vuol dire enfatizzare le transizioni temporali.

Mi fermo per dieci minuti. Grazie.

Meccanismi Biofisici dell'Adattamento: Correnti Potassio Calcio-Dipendenti Bene. Allora, la cosa interessante di questo fenomeno di adattamento o accomodamento che risulta dal punto di vista funzionale in un filtraggio passa-alto, in un derivatore, in qualcosa che predilige i cambiamenti (come in questo caso non c'era prima corrente e poi c'è corrente, qui la risposta è stata "oh che sorpresa" e poi "che noia" e vado allo *steady state*), dipende da delle conduttanze, quindi dei canali di membrana, che sono **conduttanze potassio** e fin qui probably ci sareste potuti arrivare, avreste potuto anticiparlo, perché se a questa particolare corrente la frequenza dei primi spike... Non sbaglio il congiuntivo. Quindi se a questa corrente, la corrente teorica senza adattamento sarebbe questa, attorno a **100-120 spike/secondo** e poi la frequenza diminuisce, vuol dire che c'è qualcosa che tende a buttare giù il potenziale di membrana o comunque a opporsi alla corrente che Daniele Linaro iniettava ed era una corrente positiva. Se lui avesse diminuito l'ampiezza della corrente la frequenza sarebbe diminuita, lui non l'ha diminuita, l'equazione di bilanciamento della carica dice che tutte queste correnti, pure la sua, si sommano assieme, quindi deve esserci qualcosa che tende a un segno negativo e l'unica cosa che vi ho raccontato, oltre al cloro, che ha un segno negativo sono le correnti potassio.

E in effetti questo potrebbe essere stato come meccanismo dovuto a un tipo particolare di corrente potassio, voltaggio-dipendente, che si chiama **corrente muscarinica**, viene anche chiamato I_M . In realtà in questo caso sappiamo che per questa particolare dinamica temporale e forse se buttate l'occhio potreste rendervi conto che qui è come se ci fossero due costanti di tempo, due esponenziali decrescenti. Ce n'è una molto rapida che va giù di botto, dell'arco di **10 millisecondi, 20 millisecondi**, e poi c'è qualcosa che ulteriormente fa scendere nell'arco di secondi. Quindi questo difficilmente è la corrente I_M ed è invece una corrente, non è voltaggio-dipendente ma è dipendente dalla concentrazione ionica e dipende dalla concentrazione ionica di **ioni calcio** intracellulari.

Quindi come me lo immagino io è un canale in cui è selettivo soltanto ai canali [sic], agli ioni potassio, che questo è fuori e questo è dentro, c'è tanto potassio dentro, quindi se questi si aprono, e questo *gate* si apre per seguire il gradiente elettrochimico, gli ioni potassio tendono a uscire. Sto sbagliando? C'è tanto potassio dentro? No, dovrebbe essere giusto. E questo *gate* non si apre perché questo canale sente il potenziale di membrana. Si apre perché ci sono qui dei siti in cui gli ioni calcio si legano e quanto più ci sono ioni calcio intracellulari, tanto più questo canale è attivo.

Ora perché mai gli ioni calcio dovrebbero accumularsi dentro la membrana [sic]

di un neurone? Vi ho raccontato che più o meno la dinamica delle correnti calcio è simile alle correnti sodio, quindi dal punto di vista voltaggio-dipendente. Ci sono in particolare due tipi di correnti calcio, una si chiama *low voltage activated* e un altro è *high voltage activated*. Comunque hanno una... quelle cinetiche di attivazione sono diverse. Comunque fa più o meno la stessa, gioca lo stesso ruolo che gioca il sodio. Quindi ogni volta che c'è un dannato potenziale d'azione, come entrano nella membrana degli ioni sodio, entrano anche degli ioni calcio. Voi sapete che il calcio dentro è praticamente zero, quindi appena ne entra qualcuno è un grosso fenomeno, tanto che il calcio agisce, ha un ruolo da cosiddetto **secondo messaggero** in una quantità immensa di reazioni biochimiche, di *pathway* biochimici intracellulari.

Ed è la chiave per legare il mondo chimico al mondo elettrico, perché ogni volta che c'è uno spike c'è un influsso, un *puff* di correnti calcio, al mondo chimico. In questo caso in effetti è una specie di *feedback* negativo, negativo perché questi canali calcio-dipendenti sono sensibili, selettivi al potassio e quindi l'effetto è quello di ridurre l'eccitabilità.

Analisi Dettagliata dello Spike: Cambiamenti di Forma nel Tempo

Ce ne si può accorgere... ok questo sarebbe stato, però avrei dovuto levare dal titolo, quindi mi devo ricordare che se faccio questa cosa qua, poi non può apparire questa cosa qua, per cui già è uno *spoiler*, o sono correnti potassio calcio-dipendenti o sodio-dipendenti (l'effetto sarebbe simile, ci sono di tutti e due i tipi, quindi potassio calcio-dipendenti o potassio sodio-dipendenti, non importa tantissimo), e quindi vi avrei chiesto "che cos'è che agisce come un freno dell'eccitabilità?", e mi avreste risposto, sono certo, "le conduttanze potassio". Anche il cloro poteva essere, ma il cloro è un po' particolare perché il suo potenziale di inversione è grosso modo simile al potenziale di riposo, e quindi se anche lui si apre, il potenziale lì sta [sic], e quindi la famosa *driving force* delle correnti, $V - E_{\text{Nernst}}$, praticamente è zero, perché V è più o meno attorno al suo potenziale. Ha un altro effetto, ma ne parliamo dopo, ne parliamo per la descrizione delle correnti sinaptiche. In questo caso quindi sono le conduttanze di potassio che hanno questo benedetto potenziale di inversione basso, a **-80, -90 millivolt**.

Gli *interspike interval* aumentano [corretto nel testo originale: diminuiscono] nel tempo, perché c'è qualcosa che agisce come un bilanciante, sottrae alla corrente che Daniele Linaro inietta. E un'altra cosa che succede, che si vede bene prendendo il primo spike (questo è uno spike vero, che somiglia moltissimo a uno spike finto, ed è interessante come cosa, dal punto di vista meccanicistico, che questo sia possibile). Se io paragono il primo spike all'ultimo spike, vedete che ci sono diverse cose interessanti. La prima è che la **durata** sembra spanciarsi col tempo. Sto facendo uno zoom di questo, sto guardando il primissimo spike qui, e l'ultimo spike, o uno degli ultimi. A occhio a questo zoom sembrano tutti uguali e in effetti sono più o meno tutti molto ripidi. Ma come anche nel modello di Hodgkin e Axley [sic], se lo simulate, la forma degli spike cambia leggerissimamente. Anche qua si spaccia. Il *reset*, se volete l'**iperpolarizzazione** sembra essere meno marcata, non arriva qui sotto. Qui l'asse delle Y è sempre lo stesso. E un'altra cosa che si vede è che la **slope**, la derivata del potenziale di

membrana, dV/dt , sembra essere meno ripida [corretto nel testo originale: più ripida], quindi c'è una depolarizzazione residua. La *slope* inoltre sembra essere più ripida all'inizio e si piega dopo.

E vi faccio notare che quando io parlo di *slope* del potenziale di membrana in effetti sto dicendo del potenziale d'azione, io sto chiedendo qual è la derivata. Lo so che la derivata è una funzione del tempo e che lì dovrei specificare la pendenza della retta tangente a un particolare... me ne frego, dico che sto di fatto considerando la derivata temporale del potenziale di membrana perché la guardo e perché non mi sorprende particolarmente che sia più o meno *steep*, quindi il coefficiente angolare di quella retta che per Taylor è la derivata prima.

Questa cosa qua per l'equazione di bilanciamento della carica è esattamente la somma delle correnti. Ora nella parte iniziale c'è solo il sodio aperto, quindi io posso pensare che la *slope upstroke*, quindi il colpo iniziale, la fase crescente del potenziale d'azione per quella durata temporale sia solo dovuta alle correnti sodio. Quindi io in effetti con la *slope*, con la derivata, sto leggendo... questo è un valore costante che sicuramente non dovrebbe cambiare (potrebbe cambiare ma su scale temporali molto lunghe se ci fosse espressione o sintesi, espressione genica... genica, questo esprime [sic], oppure quindi o rimuove o inserisce nuove copie dei canali sodio, però questo avviene nell'arco di minuti, ore, giorni), quello che vedo è la combinazione, questo per me è un'unica quantità, quindi mi parla di questo perché $E - V$ è quello che è ma non è così interessante, e questo è il coefficiente che cambia particolarmente.

Quindi guardando quello posso immaginare che dopo un po' l'**inattivazione del sodio** sia aumentata, quindi siano meno canali disponibili non inattivati. La famosa H è diventata più bassa, non è più a **0.6** all'inizio dello spike, inizia ad essere un valore per esempio **0.5, 0.4, 0.3**. E quindi tutte queste caratteristiche in cui si vedono in un esperimento della progressiva depolarizzazione che vuol dire che le correnti potassio, *delay rectifier*, non riescono a resettare più (quindi quelle pure si devono inattivare). Le correnti sodio per via della *slope* stanno manifestando una inattivazione residua che non riesco a tirar via e oltre a questa inattivazione dei canali sodio c'è anche questa ulteriore corrente potassio calcio-dipendente che fa in generale abbassare la frequenza.

Quindi questo è un neurone vero e per dissezionarlo senza mettere le tossine e identificare le correnti ci sono anche queste metodiche. Un'altra metodica molto interessante è provare a prendere un modello matematico più complicato che includa altre correnti, altri meccanismi e provare a *fittarlo* matematicamente. Esiste un set di parametri che mi fa avere la risposta del modello identica all'esperimento? Se sì, in prima approssimazione... ci sarebbe una discussione molto lunga da fare, ma non ve la faccio in questo corso. Forse avete familiarità con il *fit* di un modello matematico su dei dati, potreste avere dei minimi locali, nell'idea che avete per fare il *fit* state minimizzando una funzione costo. Questo è quotidiano nel contesto del *machine learning* in cui la funzione costo, o non si chiama più funzione costo, si chiama funzione perdita, si minimizza per un particolare set di parametri, ma questo set di parametri potrebbe non essere l'unico, potrebbe non essere univoco e potrebbe non essere il minimo globale. E quindi se avete un modello che fa esattamente la stessa cosa potrebbe anche non essere la spiegazione, potreste voi poi voler aprire il modello e dire "fammi vedere qual era il valore di G_{Na_barra} che ha scoperto la procedura di FIT", però

potrebbe non essere indicativo di quello che è la realtà. Quindi quello che la gente fa è con algoritmi di ottimizzazione genetica (che non ha a che fare con i geni, è semplicemente un nome matematico per alcuni stili di minimizzazione, di ottimizzazione di funzioni, funzionali), genera una famiglia di soluzioni, cosa che invece nel *machine learning* non si fa con la discesa del gradiente, ma è un'altra storia.

Le Pompe Ioniche: Trasporto Attivo Le **pompe ioniche**, ve le ho menzionate, sono dei meccanismi di trasporto attivo e noi non ne abbiamo parlato, non ne parliamo perché dal punto di vista elettrico non contribuiscono in modo drammatico. Potrebbero iniziare a contribuire in modo drammatico quando in contesti di questo tipo in cui ho la concentrazione ionica di alcune specie dentro la membrana, all'interno del neurone, per cui esistono anche delle pompe ioniche che estrudono, che buttano fuori ioni calcio (e adesso non mi ricordo che cosa tirano dentro per essere bilanciate), e quindi in teoria uno le dovrebbe mettere se volesse descrivere matematicamente anche questo rapporto.

Sono in generale... sono modellate, sono considerabili come dei generatori di corrente fissa. In particolare la cosiddetta **pompa elettrogenica** (elettrogenica vuol dire che crea a corrente), dipende dall'ATP, si chiama sodio-potassio, scambia **tre ioni sodio** che sono dentro il citoplasma, li butta fuori e si tira dentro **due cariche, due ioni potassio**, quindi non è perfettamente bilanciata e serve ovviamente energia perché c'è tanto sodio fuori, quindi io come faccio a prenderlo e buttarlo fuori? Devo usare ATP e mi pare che qui ci sia una... ho trovato questo tizio che utilizza un *game engine* per giochi tridimensionali che piacciono molto a voi (a me piacciono meno perché sono della generazione di Pac-Man) e li usa per fare visualizzazione, se volete molto ad alto livello, non è una simulazione molecolare, quindi non è esattamente la verità, ma è un *cartoon* che mi piace molto. Io ho chiesto il permesso di... credo su Twitter, gli ho chiesto il permesso, mi ha detto di sì, di poter dimostrare la lezione.

E ve ne faccio vedere adesso uno della pompa ionica sodio-potassio e poi ne ho, credo, alcuni altri due dei recettori sinaptici GABAergici, dove la quantità è cloro. Credo che ci sia la sua voce di *commentary* e se troppo forte abbasso.

[Video Commentary] This is the sodium-potassium pump. It's a protein complex with a crucial job, to restore and maintain the neuron's resting potential. The pump has an alpha subunit, here shown in pink, and a beta subunit, here shown in yellow. There is also a small gamma subunit, but you can't see it from this angle. To start, three sodium ions from the cytoplasm of the neuron bind to the pump. Using energy from ATP, the pump undergoes a shape change and releases the yellow sodium ions to the extracellular space. This conformation allows it to bind two green potassium ions from outside the cell. The protein then gets dephosphorylated and the pump switches its conformation back to the original state. It then releases the potassium ions inside the neuron and the cycle begins again.

La cosa che in particolare mi ispirava è potervi dare una specie di *depiction*, di rappresentazione grafica, intuitiva di quello che è per una modifica di una

conformazione tridimensionale dovuta anche a delle reazioni biochimiche come la fosforilazione e defosforilazione (ma non me ne frega niente), si potesse avere contro a gradiente chimico per una specie di motore molecolare, una eiezione, uno scambio di ioni che effettivamente passano attraverso questa struttura che permette il passaggio degli ioni in una struttura di membrana che come vi ho detto l'altra volta, le prime volte, è fortemente idrofobica, energeticamente impossibile, altrimenti per uno ione da penetrare in questo strato della membrana. Quindi uno strato lipofilo e idrofobico, fatto da grassi, da lipidi, ma dove le molecole di acqua non possono andare.

Mi ispira, ma non è chiaramente una simulazione di dinamica molecolare, che è una tecnica simulativa in cui vengono utilizzate le posizioni atomiche, a livello atomico, di tutte le molecole, e le cose si muovono però per femtosecondi, per picosecondi. Qui sarebbe già probabilmente a diverse centinaia di millisecondi. E per esempio non c'è alcuna descrizione delle interazioni elettrostatiche. In un altro dei video dice che se lui avesse messo le sue molecole verdi, che sono qui potassio, stanno per il potassio, se si fossero dovuti respingere in quanto cariche positivamente, non sarebbe riuscito a fare la simulazione. Perché ovviamente in [è] modo estremamente pesante dal punto di vista computazionale. Comunque, se vi piace, credo di aver messo su Teams qualche link a uno di questi video e spero che questo *cartoon* vi possa dare meccanicisticamente l'idea di come questi meccanismi, in questo caso un meccanismo attivo, permettano questo gioco, questa danza elettrica.

Dalla Permeabilità Distribuita ai Canali Discreti Adesso prima di fare la pausa fra mezz'ora... butto un occhio perché l'argomento è un pochino pesante... volevo tornare all'aspetto microscopico, un po' meno fenomenologico della permeabilità di membrana. All'epoca di Hodgkin-Axley [sic] vi ho detto si pensava che ci fosse un qualche tipo di trasportatore esattamente come la pompa di trasporto sodio-potassio, pompa elettrogenica sodio-potassio, qualcosa che avesse una carica elettrica, perché in qualche modo sembrava che fosse qualcosa che dipendesse dal campo elettrico, dal potenziale di membrana, però si pensava che fosse una proprietà distribuita uniforme della membrana.

Si dovette aspettare gli anni Ottanta, in cui questi due signori, **Erwin Neher** e **Bert Sackman**, due fisiologi tedeschi (sono ancora in vita, sono oramai emeriti, sono in pensione da diversi anni, Sackman, ma anche Neher, sono scienziati di altissimo livello, dopo il premio Nobel per aver scoperto l'esistenza dei canali ionici come entità discrete, hanno continuato a fare ricerca ad altissimo livello, particularly Sackman, su neuroscienze cellulari).

Comunque per farla breve, questa è una cosa molto interessante, come per l'eccitazione che vi ho dimostrato, la mia eccitazione che vi ho dimostrato per la storia di esumere la *thickness*, lo spessore della membrana su una base puramente elettrica (perché so la formula della capacità del condensatore, quindi non ho un microscopio potente per vedere quanto è spessa la membrana, faccio una misura elettrica e lo vedo), così anche in questo caso non li abbiamo visti i canali di membrana. E ricostruiti come vi ho fatto vedere adesso le pompe ioniche poco fa, non le abbiamo visti la prima volta, la prima volta ne abbi-

amo avuto una eco, un'immagine elettrica di una conseguenza del fatto che loro si aprissero e chiudessero e tutto è dovuto all'invenzione di una tecnica che si chiama tecnica del **patch clamp**, dove *patch* vuol dire toppa e *clamp* vuol dire bloccaggio, blocco.

La Tecnica del Patch Clamp e il Giga-Seal In cui anziché usare una pipetta di vetro facendola molto molto più appuntita in quello che viene chiamato normalmente *sharp electrodes* (sono capillari di vetro, borosilicato, che vengono scaldati al centro e si fanno diversi cicli di scaldo e tiro, scaldo e tiro, perché quando si scalda, come sapete dai mastri vetrai di Venezia, il vetro, particolarly il vetro borosilicato, si scioglie... oltre a ustionarvi le dita se lo toccate accidentalmente), se voi iniziate a scaldare molto e a tirare potete avere, come in alcuni casi della fecondazione artificiale, degli ovociti *in vitro* che vedete spesso o qualche volta si vedeva tempo fa alla televisione (poi per motivi politici credo che non si veda più), anziché avere una roba molto molto appuntita che penetra il doppio strato lipidico come se fosse un ago finissimo dentro un maglione di lana a maglie larghe (non lo scompone, entra dentro tranquillamente), loro hanno avuto l'idea di non fare una pipetta *sharp*, ma di farla abbastanza, non macroscopica, ma abbastanza larga.

Qui l'apertura è dell'ordine di un **micrometro**. Non si parla in realtà di apertura ma si parla dell'effetto elettrico di resistenza, quando io prendo questa pipetta la metto in un bagno con elettrolita, passo una corrente e vedo qual è la tensione che registro. Quanto più è larga la punta della pipetta, tanto più è bassa la resistenza.

Si chiama *patch clamp* perché loro hanno avuto l'intuizione che se io... se si fosse riuscito a piazzare sulla membrana **senza penetrare** (quindi in tutte le lezioni precedenti vi ho detto punzecchiare, impalare, penetrare, accoltellare un neurone, pensando e sperando di darvi l'idea che l'elettrodo venga messo dentro la pancia di neurone). Qui è diverso, lo lascio in superficie e questa toppa, questo pezzo di membrana viene bloccato meccanicamente, è un *clamp* meccanico, non ha a che fare con la tecnica del *voltage clamp* di Hodgkin e Axley [sic]. In questo caso *voltage clamp*, il *clamp* aveva pure il significato di bloccare, ma era bloccare un segnale elettrico, bloccare le proprietà elettriche, qui *patch clamp* vuol dire meccanicamente.

E facendolo, ci sono diverse configurazioni che hanno inventato, però nella configurazione che è rappresentata qui, hanno visto che semplicemente registrando, in prima approssimazione, hanno visto che la corrente che riuscivano a misurare erano correnti molto molto piccole rispetto alle correnti che uno misura quando penetra nella membrana, e lo può fare perché il rapporto segnale-rumore cambia e diventa molto favorevole, perché qui se io sono un portatore di carica, se sono uno ione, non riesco a sfuggire qui nell'intercapedine in mezzo. Si dice che esiste una **resistenza di sigillo**, cioè il contatto meccanico fra la pipetta e la membrana è così intenso che è una resistenza dentro qui per tornare fuori (dove ho l'elettrodo di riferimento) è una resistenza dell'ordine del **gigaohm**, quindi *miliardi* di ohm, enorme, per tutti gli effetti pratici infinita.

Le Correnti di Singolo Canale: Stocasticità e Quantizzazione Se è così vuol dire che se io qua ho degli oggetti che iniziano ad aprirsi spontaneamente, visto che c'è il potenziale elettrochimico dentro, sodio, fuori, potassio eccetera, se si apre io vedo l'eco elettrico, vedo una corrente che si apre. E la cosa sorprendente è che loro hanno visto due cose sorprendenti.

La prima è che queste correnti avvenivano in modo **casuale, stocastico, random**, non era una roba deterministica, non era una roba periodica, era “qui si è aperto, è stato un po' aperto, poi qui si parte da una *baseline* zero e le deflessioni in basso che vedete...”. Vuol dire che era una corrente uscente in qualche modo, ma non importa, entrante e uscente non importa. In alcuni casi la durata dell'apertura di questo meccanismo era un po' più elevata, poi era più bassa, un pochino più elevata. Qui quasi era un'apertura brevissima che al tempo di campolamento di questo amplificatore, di questa registrazione, non ha quasi dato esito. Qui è molto più lungo di qualche decina di millisecondi, eccetera, eccetera. Quindi stocasticità che fa pensare al fatto che siano molecole singole, che non sia un effetto di popolazione. Stanno, siedono a temperatura corporea, **37 gradi o 35 gradi**, credo che questi esperimenti siano comunque fatti a temperatura molto distante dalla temperatura ambiente.

E seconda cosa è che il valore del... quindi quando questi segnali avvengono, i valori di ampiezza sono **discreti**, o è **0** o è **7 picoampere**, non c'è **6.5, 3.1**, quindi al contrario di quello che voi vedreste... Vedreste se usando per esempio le tossine di Hodgkin e Huxley misuraste la corrente sodio residua, poi vedreste che a un certo punto questa corrente alla fine l'abbiamo plottata, quando plottavo M, H, N di fatto era quella. C'era qualcosa che variava con continuità, qui invece la traccia sperimentale dimostra che continuità non c'è, ci sono [valori] discreti. Alla fine è come in meccanica quantistica in cui l'energia è quantizzata, qui la conduttanza è quantizzata ed è stata una rivoluzione tale per cui questi due tizi hanno preso il premio Nobel.

Perché si è capito che questi eventi, il fatto che la distribuzione delle ampiezze fosse fortemente bimodale (vuol dire che l'istogramma delle ampiezze è o **0** o **7 picoampere**), voleva dire che c'erano stati discreti, o era tutto chiuso o era tutto aperto, ed era **uno**, un canale che stavano vedendo. Adesso, chiaramente, col senno di poi, “sì, che cos'altro potrebbe essere?”. Però ci sono voluti **30 anni** dagli anni '50 agli anni '80 affinché questi tizi, giocando con le pipette su un becco Bunsen, tirandole, avessero qualcosa che per legarsi alla membrana non è un grosso problema. Come sa chiunque deve lavare i piatti a mano, l'olio va tranquillamente sul vetro, non lo togliete più. Quindi quando mettete un pezzo di vetro vicino a una membrana, la membrana per ragioni anche elettrostatiche di cui si conosce poco, si attacca facilmente. Ma il fatto che ci fosse una condizione così accurata di *giga seal*, si dice di *seal*, sigillo, *gigaohm*, per i *gigaohm* qui, è stato rivoluzionario.

Le Configurazioni del Patch Clamp Ci sono in realtà diverse configurazioni di patch clamp che questi signori hanno proposto. Quello che vi ho fatto vedere si chiama **On Cell**, mi appoggio, se volete “origlio”, però “origlio” ci sono dei buchi, quindi qualcosa mi entra nell'orecchio, non sono solo le vibrazioni.

Però se arrivati in questa configurazione *on cell* attraverso la pipetta collegata a un piccolo tubicino (in tempo dopo covid probably non lo possiamo più fare, però normalmente lo sperimentatore ha il suo tubicino attaccato alla pipetta e succhia leggermente) da una specie di bacetto e questo bacetto porta all'applicazione di impulsi di pressione negativa molto intensi, molto intensi perché la sezione di passaggio qua è piccolissima, dove metto la bocca io è relativamente grande, potrebbe essere un paio di millimetri, poi ci sono supponete un metro di tubicino di silicone e qui è un micrometro. Quindi correttamente dovrei dire che la pressione è la stessa, ma la forza... la pressione è una forza nell'unità di superficie, quindi se la superficie è molto piccola, a parità di pressione è una forza enorme.

Si riesce di fatto a rompere la membrana, è come se voi toglieste il tappo di questa toppa, semplicemente si dissolve e si disperde in questa pipetta che vi faccio presente è enorme, come dire è il volume di un campo da tennis a paragone di una pallina. La pallina è la cellula e il contenuto di molecole, ioni eccetera è quella di una pallina da tennis. La pipetta contiene liquidi in un volume così enorme come quello che potrebbe essere rappresentato da un campo da tennis. Quindi ok, sì, ci sono dei pezzi di membrana e di schifezze del citoplasma che volano dentro, ma dopo qualche millisecondo non hanno più importanza.

E io elettricamente lo vedo, mi posso accorgere del fatto che sono arrivato in questa configurazione, perché mentre qui il potenziale che registravo poteva essere il potenziale del mezzo extracellulare, appena stappo questo sistema, qui dentro è **-70**, quindi sull'oscilloscopio, anziché vedere **0**, dopo che succhio vedo che *boom!* la forma d'onda del potenziale della pipetta che sto registrando va giù rapidissimamente e mi indica che sono entrato, che sono in **Whole Cell**. Tipicamente uno sperimentale, specie all'inizio, si *gasa* tantissimo quando riesce a fare questa procedura qui e la cellula non muore, perché la cosa che qualche volta succede è che il sigillo non è perfetto e quando uno applica una pressione negativa, semplicemente qui la membrana si rompe, ma la cellula non è adesa, quindi uno continua a vedere **0 millivolt**, che è il potenziale del mezzo extracellulare.

Ci sono altri modi in cui, senza succhiare, semplicemente ritraendo la pipetta (la pipetta è attaccata a tre motori piezoelettrici, che sono lungo gli assi XYZ, così che si possa muovere nello spazio), semplicemente uno lo ritrae e gli resta un pezzettino di membrana appiccicato alla pipetta. Se uno è fortunato potrebbe prendere questa pipetta e metterla in un altro contenitore dove la composizione del liquido che è ivi presente ha delle concentrazioni degli ioni o dei farmaci controllati di mia scelta. E in questo modo posso esporre la parte intracellulare alla concentrazione che dico io e quindi per esempio studiare questo tipo di canali, potassio-calcio dipendenti, che sentono gli ioni dentro, ma io dentro in una cellula non potrò mai cambiare le cose, io invece le voglio cambiare ad arbitrio. Lo posso fare se ho questa tecnica del **Inside Out**. L'*inside* della membrana è *out*. E c'è un'altra tecnica che è un po' più complicata che in altri termini, quindi dopo che si stabilisce il *whole cell* si può avere il patch di membrana che è stato tolto in una configurazione invertita in cui **Outside Out**. Il *fuori* della cellula resta *fuori* dalla pipetta.

Certamente. Ecco i prossimi cinque blocchi.

Dal Singolo Canale alla Corrente Macroscopica (di Popolazione)

Questa è semplicemente nomenclatura. La cosa interessante è che questi due ricercatori hanno iniziato a provare non solo canali ionici, ma hanno studiato la loro voltaggio-dipendenza e hanno visto che quella che normalmente è una caratteristica di popolazione, che vedete qui sotto. Qui questo è un esempio di un esperimento di *voltage clamp* che Hodgkin-Axley [sic] potrebbero aver fatto. Si dà un gradino, *voltage clamp* vuol dire che si impone il potenziale e si misura la corrente. Si misura la corrente che l'amplificatore deve costantemente erogare affinché il potenziale resti costante. Se il potenziale resta costante, $C \cdot dV/dt$ è 0 e la corrente che devo iniettare è rappresentativa della corrente ionica che il neurone in quel momento sta evocando.

E quindi vedete qui questo, anche senza saperlo, questo è... ok c'è scritto potassio, questa è una risposta della solita equazione differenziale noiosa, eccetera, che è l'equazione dinamica della N , c'è solo la N nei canali potassio, e gli do uno step, questi si aprono, hanno la solita curva di carica con la cinetica ritardata che caratterizza il potassio di qualche decina di millisecondi o di quello che è. Questo invece è il sodio, quindi io qui sto osservando in effetti $m^3 \cdot h$, li sto osservando assieme. Infatti vedo un'attivazione e una inattivazione cumulativa [sic], scusate, una inattivazione rapida immediata che segue. Infatti vedo che quando io gli faccio questo step, il sodio prima si attiva e poi si inattiva. Il potassio invece si attiva soltanto. Questa è la traccia dello step di potenziale che sto cambiando, prima la tengo a **-80 millivolt** simulando una condizione di riposo e poi gli do una "schicchera" [sic], diciamo uno step e lo tengo a **-30 millivolt**, per il potassio lo faccio a **0 millivolt** e verifico che questo è quello che Hodgkin-Axley [sic] hanno descritto.

Se lo faccio invece con questi elettrodi e questi esperimenti di Neher e Sackman, in cui riesco a isolare anche per la dimensione del *patch* un canale o due canali, un numero piccolissimo di canali, io riesco a misurare le cosiddette **correnti di singolo canale**. E quando le misuro vedo che il comportamento è stocastico e se lo faccio più e più volte vedo che statisticamente questo canale sodio, che è sempre lo stesso (potete però pensare che sia rappresentativo, questa è l'**ipotesi di ergodicità**, sia rappresentativo di una popolazione. Se io prendo un italiano singolo, anche se è un esempio fallato, posso pensare che se gli faccio una serie di domande la media temporale possa essere scambiata con la media di insieme su un insieme di persone italiane che potrei intervistare facendo loro solamente una domanda. Questo si chiama... questa proprietà che si ipotizza esserci, non è facile verificarla, si chiama **proprietà di ergodicità**: un sistema ergodico se puoi scambiare la media temporale con la media di insieme, tanto per intenderci l'integrale sul tempo con il valore atteso per chi di voi ricorda teorie delle probabilità).

Quindi qui è come se io stessi vedendo una popolazione di canali, perché è un canale singolo ripetuto nel tempo, ma è come se fossero N canali se sono indipendenti. Qui l'indipendenza ce l'ho gratis perché adesso faccio questa prova, poi faccio passare un po' di tempo, rifaccio la prova, non c'è una dipendenza, una memoria nel tempo, se aspetto a tempo sufficiente affinché i transitori, se ci sono, vengano dimenticati. E la stessa cosa è quindi rappresentativa di una indipendenza statistica.

E vedete che l'apertura del canale sodio avviene statisticamente soltanto in

prossimità di questo step, mentre quella del potassio avviene ripetutamente durante tutto l'esperimento in cui sto tenendo la cellula depolarizzata o un po' più depolarizzata. Viene fuori che se io **sommo algebricamente** queste curve, ottengo quella che è la media di insieme. Quindi se io faccio la somma algebrica, che vuol dire la media aritmetica, quindi faccio la media di popolazione, ottengo il comportamento macroscopico. E ha senso, perché io normalmente, da Hodgkin-Axley [sic] in poi, io misuro solamente l'effetto macroscopico di popolazione, io vedo sempre, *pecciando* [sic] un neurone, un coro di voci. Se però potessi isolarne una alla volta, sentirei che per esempio questo è particolarmente stonato, non è che ha lui una caratteristica che prima si apre, poi si inattiva con una specie di costante di tempo esponenziale. Questa costante di tempo esponenziale viene perché qualcuno di questi ogni tanto si apre ulteriormente dopo, ma principalmente si aprono qui e poi tendono a stare chiusi. Quando faccio la somma algebrica di tante ripetizioni vedo che la somma degli eventi tende ad essere sempre più piccola in modo graduale.

Il Rumore come Caratteristica Biologica Fondamentale Se ricordate vi ho menzionato che nella descrizione marcoviana delle conduttanze ioniche, voltaggio-dipendenti o non voltaggio-dipendenti, ci sono due interpretazioni. Una è l'interpretazione deterministica, la legge di azione di massa, l'altra... e vengono fuori delle equazioni differenziali che sono sempre le stesse, ma nell'altra interpretazione devo pensare che quelle frecce fra gli stati abbiano significato di **probabilità di transizione**, non tassi di conversione. E voglio vedere se per caso posso imparare qualcosa da questo.

È interessante imparare qualcosa da questo perché gratis vedo che ho una **sorgente di rumore**. Questo è un bel *paper* di diversi anni fa di *review*, di compilativo di un sacco di studi pregressi in cui gli autori hanno riassunto e elencato tutti i casi in cui il funzionamento del sistema nervoso ha in termini favorevoli o sfavorevoli un certo tipo di rumore: il rumore del sensore nel caso per esempio della fototrasduzione o della meccanotrasduzione; un rumore dovuto a questa apertura e chiusura dei canali ionici, che non sono dispositivi deterministici. *Flickerano*, come *flickera*, come sfarfallia uno schermo non sintonizzato, in modo imprevedibile. Adesso vi faccio vedere altri esempi.

Un altro esempio di rumore è quello del **rilascio di vescicole**. Probabilmente il professor Zoli vi ha raccontato la storiella in cui quando il bottone presinaptico viene invaso da una depolarizzazione, da un potenziale d'azione, le vescicole sinaptiche (si chiama *kiss and run*) si fondono dalla parte intracellulare della membrana, danno una diffusione di quello che era contenuto nelle molecole di neurotrasmettitore che erano contenute, eccetera eccetera. Questo è su scala microscopica, molecolare, non è che tutte le vescicole fanno il *kiss and run* (il *kiss and run* deve essere quello degli aeroporti anche, in cui si uno *kiss* e poi va via). Qui *kiss* la membrana e poi vanno via, non avviene deterministicamente, alle volte le cose non funzionano, alle volte si ha un *failure*, un fallimento del rilascio, alle volte il neurotrasmettitore non va a legarsi subito, diffonde nello spazio intersinaptico e viene dissipato.

Inoltre ci sono un sacco di condizioni in cui senza fare niente, senza potenziale

presinaptico, il bottone sinaptico è come se fosse incontinente e gli scappa un po' di perdita di molecole di neurotrasmettitore, quindi le vescicole si fondono per i cavoli loro spontaneamente perché ci sono delle fluttuazioni di concentrazione di potassio [sic], scusate, fluttuazioni di concentrazione di **calcio**, di ioni calcio nel bottone sinaptico. È così sensibile il meccanismo che serve che siano pochi ioni calcio a entrare per attivare il meccanismo, quindi è una cosa relativamente delicata, non è che servono segnali molto robusti. Quindi anche il rilascio sinaptico è soggetto a attività spontanea, rumore.

E tutto questo rumore, anche se fa pensare particolarly a un ingegnere che sia qualcosa di sfavorevole, è probably un ingrediente fondamentale del funzionamento stesso. Quindi i segnali che andate a registrare non soltanto sono rumorosi perché l'amplificatore che state utilizzando è rumoroso, c'è un rumore elettrico (si chiama per esempio **rumore di Johnson**, è legato alla temperatura, alla resistenza, ci sono dei rumori legati all'uso di amplificatori operazionali), ok, ma la biologia stessa verrebbe da dire "fa schifo", è *sloppy*, è imprecisa. Ma questa imprecisione probably è una *feature*, non è un *bug*, è una caratteristica, non è un baco.

Variabilità della Risposta Neuronale: L'Effetto dello Stimolo E vi faccio vedere un effetto che è stato descritto diversi anni fa e che è di una semplicità disarmante. Con una simulazione a calcolatore, tipo quella che vi ho dato del modello di Hodgkin-Axley [sic], questa cosa qua non la vedete.

Ogni volta che prendete un neurone (in questo caso è un neurone piramidale della corteccia somatosensoriale di ratto, è lo stesso tipo di quelli che utilizziamo nel nostro laboratorio per alcuni esperimenti di altro tipo), se date uno step di corrente (adesso lo sapete *ad nauseam*) che il neurone inizia a sparare in modo più o meno regolare... forse si intravede, forse no che c'è un adattamento in frequenza... qui ne vedete tante tracce incasinate appositamente *ad hoc* per creare un effetto, perché è l'effetto di una **ripetizione**.

Voi fate questa stimolazione che dura circa un secondo, circa **700-800 millisecondi**, poi aspettate qualche secondo in modo tale che il potenziale di membrana sia andato a riposo, la rifate di nuovo (sicuramente non aspettate un'ora, aspettate qualche frazione di secondo) e la ripetete per esempio **25 volte**. Ogni volta sovrapponetevi le tracce e vi accorgete che è come se... questo in un modello non lo vedrete mai perché il modello è deterministico, se voi ripetete la stessa simulazione sempre la stessa cosa vi viene fuori. Nel caso di un neurone no.

Sto in qualche modo provando a solleticarvi del fatto che al di là del fatto che da un momento all'altro voi avete altre cose a cui pensare, avete probably degli stimoli che si sono consolidati nella vostra memoria, vi è venuto dolore al piede, vi è venuto dolore al sedere perché i sedili sono scomodi, quindi il vostro stato non è stazionario. Ma se io vi ripetessi **25 volte** la stessa cosa, magari esattamente con le stesse parole, la stessa intonazione eccetera, nella vostra corteccia uditiva non vedrei lo stesso *spike train*, vedrei un treno di spike leggermente diverso, come vedo qua.

La cosa interessante è che i primi due o tre potenziali d'azione sono relatively

ok, riproducibili. Man mano che aspettate c'è un gran... nel senso che il tempo con cui, l'istante con cui vengono sparati (lo si vede bene qui, in questo che viene chiamato un *plot raster*. *Raster* non so da cosa venga, credo che venga da come i vecchi televisori funzionavano, che avevano il pennello elettronico che si muoveva in ordine lessicografico da destra a sinistra). Qui è ogni ripetizione, metto una barretta all'istante di picco del potenziale di membrana, quindi dove c'è lo spike metto una barretta. E vedete che il tempo con cui viene sparato il primo, il secondo, già il terzo, ok, sembra avere una riproducibilità notevole rispetto all'ultimo. Quanti sono qui? Uno, due, tre, quattro... quasi ho fatica a contarli. Supponete il decimo è completamente *scrambled*, sfasato, scombinato (mi viene in mente, quindi si usa la parola *scramble* perché ha a che fare con il gioco d'azzardo, tipo con un mazzo di carte che voi mischiate per randomizzarlo), quasi dello stesso ordine di grandezza del tempo fra uno spike e il successivo, dello stesso *inter-spike interval*.

Quindi è una cosa notevole e uno dice “ma che caspita, ma com'è possibile? Ho un cervello assolutamente avanzato eccetera e ho gli elementi che sono così *sloppy*, così poco riproducibili eppure a me sembra di avere una performance nel mondo notevole”.

Se anziché dare uno stimolo DC, quindi uno stimolo costante, date uno stimolo sempre lo stesso, che varia nel tempo (questo tecnicamente è una, si dice, realizzazione di un processo stocastico, o un qualche modo per generare dei numeri casuali, fisso il cosiddetto seme di generazione dei numeri casuali e genero la stessa cosa). Quindi ho una roba che fluttua, come potrebbe essere la realtà della tigre che entra, del fatto che il mondo è non stazionario, quindi è molto diverso dallo stimolo che io vi ho venduto finora come utile, perché io ho questo per un RC addirittura solo [con] soluzione analitica. Quando faccio così vedete che praticamente diventa una roba estremamente accurata.

Rumore e Creatività Quindi è una specie di generatore di rumore e la storia del generatore di rumore mi piace pensare che possa essere legato (nessuno lo sa ed è molto complicato da sapere) legato alla **creatività**. Come vi vengono in mente a voi le idee? Al di là di un aspetto cognitivo profondo, in parte legato al libero arbitrio, in parte legato all'inconscio, alla consapevolezza, per cui se uno vi dice “pensa a una città europea”, probably vi viene in mente qualcosa, sapete descrivere introspettivamente il meccanismo? No, vi è venuto su. Probably non c'è il libero arbitrio perché avete sorgenti di rumore (per esempio rilascio sinaptico ecc.) che fanno un input simile a questo e viene fuori un qualche pensiero random, una qualche... chiaramente sulla base, correlato con quello che è l'attività o la struttura o la memoria o le sinapsi eccetera eccetera.

Quindi questa caratteristica di sorprendere, di poter dare delle risposte imprevedibili può essere un *asset*, può essere una cosa utile dal punto di vista evolutivo della sopravvivenza. Se io ho qualcosa che risponde sempre allo stesso modo quando entra la tigre o quando io vedo una particolare mela e non la mangio mai, ok, magari mi estinguo. Quello di noi, degli *ancestors*, dei nostri antenati, che per puro caso a uno gli è venuto lo schizzo per prendere la mela e non è morto, ha iniziato a propagare questa caratteristica di rumore dei canali ionici. In realtà non penso che ci siano dei canali ionici senza rumore, penso che sia il sistema nervoso che si sia evoluto per utilizzare, per fare buon uso delle

caratteristiche rumorose.

Adesso facciamo una pausa di 10 minuti e nell'ultima parte della lezione vi dico come, riesumando quella descrizione stocastica, come spiegare o come descrivere questo tipo di segnali elettrofisiologici. Grazie.

Nota sui Transcript e Feedback Grazie. ...relatively facilmente il *transcript*, la trascrizione *speech-to-text*. Quando io lo faccio ovviamente è qualcosa che non è leggibile perché io faccio le pause e non è granché, ma ho visto che processandoli, dando in pasto a un *large language model*, minacciando che se lui riassume (io ho tolto adesso dal *prompt* però mi sarei arrabbiato moltissimo), il risultato è che addirittura lui mi scrive le equazioni con LaTeX, che è un modo di formattazione, e mi fa i paragrafetti.

Buttateci un occhio perché di primo acchito, ma non ho tempo di riguardare tutto, sembra che sia utile, sembra che il testo è rielaborato, non sia malaccio. Credo che non possa essere considerato una dispensa perché è a livello informale, non ci sono figure, eccetera. Se qualcuno di voi può buttarci un occhio, mi potete dire “guardi che dopo che legge le prime due tre pagine diventano completamente delle allucinazioni”. Io ci ho buttato un po' e mi sembra di no e sono rimasto particolarmente sorpreso dal fatto che quando io parlo e dico... lui mi scrive l'equazione matematica... sicuramente non è soltanto una riorganizzazione in paragrafi perché ho fatto *prompt engineering* dicendogli “tu sei un neuroscienziato hai esperienza di bioengineering” quindi gli ho dato parecchia roba. Però se potete darmi un *feedback* se funziona oppure no, perché è una cosa potentially interessante. Ho letto anche in letteratura che il *transcript* viene considerato molto utile dagli studenti, ma che quasi nessuno se lo guarda durante il corso. Questo è ok, ma...

Riproducibilità specifica del tipo cellulare: *Fast-Spiking* vs. Piramidali Ok, la cosa interessante è che non tutte le cellule fanno questo numero. Qui sembrerebbe che a sinistra per questo stimolo il generatore di rumore è acceso, mentre qui a destra il generatore di rumore è spento. Ci sono altri tipi di cellule, che sono cellule degli **interneuroni inibitori** che vengono chiamati ***fast-spiking*** perché a parità di corrente iniettata hanno un'attività di spiking, una frequenza di oscillazione molto maggiore di un neurone piramidale. Quindi questo è eccitatore e questo è inibitorio. Per la stessa corrente questo fa 4 spike, questo qui per la stessa corrente ne fa 3, 6, 9, ne fa una decina e questo quant'è? **25 millisecondi...** sarà **2 secondi e mezzo** [sic] ...quindi fa probably 4 volte tanto, 3, 4 volte tanto la stessa frequenza [sic]. Quindi a proposito la loro curva frequenza-corrente è molto più ripida perché poi magari satura anche lei, però rispetto ai piramidali a parità di corrente, a parità di punto nell'asse delle ascisse, il numero di spike al secondo è molto maggiore.

Qui vedete che è lo stesso esperimento fatto fra l'altro da un italiano molto molto in gamba, Alberto Bacci, che però adesso è a Parigi. Quindi in questo caso sono **15 ripetizioni**, a differenza del neurone piramidale, di una cellula glutammatergica eccitatoria, dove al secondo, terzo, quarto potenziale d'azione il *jitter*, lo sfarfallamento è drammatico. Qui al terzo, quarto, quinto, ennesimo

potenziale d'azione si inizia ad accumulare l'errore, come se ci fosse un errore che si accumula, ma è molto inferiore.

Perché avviene questo? C'è qualcosa che ha a che fare con la dinamica dei canali. Qui al paragone il quarto spike, questo è il *raster plot* del quarto spike, praticamente tutti i tempi su **15 ripetizioni** successive il neurone spara in modo preciso. Qui no, qui è completamente irregolare, *scrambled*, alterato, irripetibile, non riproduce se stesso.

Modelli Stocastici: Il Ruolo del Numero di Canali (N) Allora, il modo per descrivere queste cose, cercare di interpretarle e eventualmente costruire delle teorie o dei modelli che ci aiutano a interpretare dei segnali elettrofisiologici come questi, ci ricordiamo che i singoli canali, come quelli che vi ho fatto vedere, sono entità discrete e quando io le considero a livello di somma dell'effetto della membrana, che vi ricordate al di là del concetto delle leggi di Kirchhoff, del parallelo, delle conduttanze, alla fine sto facendo la somma delle correnti in questa equazione of bilancio di carica.

Ora questo grafico qua è leggermente difficile da guardarsi, di primo acchito tu dici "ok, qui è un canale solo, qui sono 10, qui sono 100". Ogni volta che io faccio uno di questi grafici sto riscalandò l'asse delle Y, cioè qui i singoli canali hanno una conduttanza piccola, la corrente che fanno passare quando si aprono è di pochi **picoampere**, mentre quando ne ho **10**, se si aprono tutti i **10**, probably qui sono aperti quasi la maggioranza, dovrei avere **10** volte per quel poco picoampere. Supponete **5 picoampere**, qui sarebbero **50**, quindi la distanza fra qui e qui non è la stessa distanza fra qui e qui. Sto riscalandò gli assi per farvi vedere che, è vero, le grandezze sono rumorose ma molto molto piccole, perché se ho una buona popolazione molto numerosa, il rumore è trascurabile, le fluttuazioni ci sono ma sono molto trascurabili.

L'importante era per me cercare di chiarire che quando il numero inizia a essere... non serve che sia infinito, basta che sia dell'ordine dei centinaia di canali, è come se le fluttuazioni possano essere trascurabili. In nero qui ho messo il caso N che tende all'infinito, che non ho disegnato per N infinito, ma per esempio ho invocato usando l'equazione che già so che posso usare, l'equazione deterministica. $N_\infty - N$. Ho usato questa che so valere nel caso deterministico, cioè nel caso in cui ci sia un numero enorme di canali, per cui addirittura io li descrivo con la legge di azione di massa, così come descrivo le reazioni di sodio cloruro che si lega, che si dissocia, eccetera, in un modo, non *bulk*, è sbagliato dire *bulk*, in un modo macroscopico, con un numero enorme di particelle, di molecole.

Channel Flickering e Numero Finito di Canali E questo *channel flickering* conviene da cercare di capire. Questa non è una traccia sperimentale, sono stato io che ho utilizzato lo schema cinetico marcoviano e ora vi faccio vedere come per descriverlo.

L'idea è, se io riesco a capire carta e penna più o meno da dove esce fuori questo rumore, potrei capire se per caso questo rumore, come mi sembrava che fosse qui, magari dipende dal fatto che qui la traccia del potenziale di membrana durante

questa attività periodica non è che viene particolarmente iperpolarizzata. Qui, per via di queste fluttuazioni nell'ingresso, sono frequenti i casi in cui ci sono questi *swing*, queste elongazioni, queste permanenze del potenziale di membrana a potenziali più iperpolarizzati, dove i canali di membrana sono prevalentemente chiusi. È come se, sto pensando, può essere che questo rumore è tanto maggiore quanto dipende dallo stato o dipende dal potenziale di membrana? È un generatore di rumore che dipende dal potenziale.

E se fosse così potrebbe essere interessante e intrigante capire perché i *fast spiking neuron* hanno un comportamento diverso dai neuroni piramidali. Ok, hanno un set di canali diversi. O ne hanno un numero molto elevato, oppure magari semplicemente nell'assone di questi neuroni, qui c'è un punto, per esempio, nel **axon initial segment**, che è il segmento iniziale dell'assone, dove il potenziale d'azione viene generato, dove magari qui non è che avete $N \rightarrow \infty$ di canali. Avete un numero magari piccolo, oppure avete un qualche tipo di... nell'assone o nei dendriti, avete una concentrazione di canali ionici in un numero ridotto.

Se sono ridotti iniziano a fluttuare, o meglio, fluttuano sempre, ma se sono ridotti come un coro di piccole dimensioni, voi sentite chiaramente le voci stonate. Se è un coro enorme no, ed è sempre la stessa cosa, anche nel coro le voci si sommano.

L'Approccio Stocastico Marcoviano per Singoli Canali Sommare algebricamente, quando io parlo di media, la media al mio paese è la sommatoria da 1 a N (venti?) di x_i e poi divido per N . Siete d'accordo che anche se io non divido per N , grosso modo l'operazione matematica è uguale, avrò almeno un fattore di scala. Se le fluttuazioni di un coro, di una popolazione di canali, in qualche modo diventano un po' meno trascurabili quando io faccio una media di un numero enorme, vuol dire che quando ho l'equazione di bilancio della carica (che non c'è più), che era una sommatoria di correnti, anche lì ho una somma di effetti. Se i canali sono pochi, è come se avessi una media ma di pochi elementi, quindi diventa rumoroso. Adesso forse avrà un pochino più senso.

Ci sono due modi per approcciare questo problema. Il primo è quello **marcoviano**, il secondo ve lo dico dopo, forse la volta prossima. E questo è il più semplice ed è: io già so che un canale ionico è un sistema che attraversa una serie di configurazioni morfologiche, funzionali, per cui esiste un numero di stati con un numero di transizioni e c'è probabilmente solo uno (nella realtà sperimentale tipicamente è così), c'è uno stato in cui il canale ionico è aperto, è conduttivo e poi gli elementi che sono su queste frecce di questo schema cinetico marcoviano sono o costanti oppure sono voltaggio-dipendenti o sono dipendenti dagli ioni, dalle concentrazioni ioniche o sono dipendenti dalla concentrazione di un neurotrasmettitore extracellulare in prossimità del recettore. Alla fine il recettore canale ionico sono la stessa bestia più o meno in prima approssimazione, non tutti i recettori sinaptici sono canali ionici, starei parlando dei cosiddetti recettori **ionotropici**, non metabotropici, ma lo vediamo la prossima volta.

Quindi io questo tipo di descrizione già la so, l'ho utilizzata e vi avevo detto "ok, qui per ogni stato scrivete un'equazione differenziale eccetera eccetera", però aspetta, io no. Io qui penso che adesso questa sia la descrizione di **un canale**, non di una popolazione di canali. Nel caso chimico non è uno schema cinetico

che mi dice come una soluzione in cui ci sono sodio e cloro... no, sto pensando a due molecole, una di sodio e una di cloro, si legano o si dissociano. Anche intuitivamente ve lo immaginate come qualcosa che *flickera*, che è soggetto a degli eventi probabilistici, non deterministici.

Quindi io posso pensare di associare (vi faccio vedere come si fa nel caso non deterministico, nel caso microscopico), associa a questo canale... a questo stato i -esimo del canale, penso di averne N di questi canali ionici, supponete che siano tutti uguali, ciascuno di questi viaggia fra questi stati, salta per quelle che sono le proprietà voltaggio-dipendenti o quelle che sono, e per ciascuno ho una variabile binaria che chiamo S , stato (oppure non so perché si chiama S , credo in accordo con una nomenclatura e una notazione della meccanica statistica, ma non importa). Questa è una variabile booleana [sic], è **1** con probabilità... quindi è una variabile aleatoria, ed è... prende i valori **1** con la probabilità di occupazione di questo stato, altrimenti (quindi con probabilità $1 -$ la probabilità precedente) **0**.

E fin qui dice “ok, alla fine immagino che io voglia scrivere la corrente attraverso questo canale e voglia metterci per un singolo canale, io non gli voglio mettere m^3h , voglio metterci questa S , quando S è **0** la corrente è **0**, quando S è diversa da **0** la corrente è ionica, per quel canale singolo è non nulla”.

La Frazione di Canali Aperti come Variabile Aleatoria Ma non ho solamente uno di questi canali, ne ho diversi. In questo modo grafico orribile è come se io me li stessi immaginando che sono dei sistemi che sono identici e funzionano in parallelo, non si parlano l'un l'altro, non c'è cosiddetta **cooperatività**, cioè il fatto che il canale ionico numero **22** su un miliardo sia nello stato aperto non cambia la probabilità di occupazione di un altro canale, anche se in prossimità. Tutti leggono la stessa variabile di controllo, sono tutti intercalati nella membrana e tutti si “sparano” [sic] allo stesso potenziale transmembrana, ma non c'è una interazione in più. Ve lo sto dicendo credo la seconda volta in questo corso perché il concetto di cooperatività è in generale in biologia molto importante e sembra che almeno la conduzione ionica nei vertebrati, nel sistema nervoso centrale dei vertebrati, dei roditori, dei primati, umani e non umani, sembra che non abbia queste caratteristiche di cooperatività.

Quindi quello che posso pensare è che non ci sia un'unica S , ce ne sono tante, S_1, S_2, S_{1000}, S_N . Ciascuno ha una probabilità di essere **1** o **0** secondo della probabilità di quel canale di essere aperto o chiuso, quindi non si parlano fra di loro.

Quindi quello che posso fare è che la famosa **frazione di canali** nello stato aperto, che ve l'ho venduta prima in questo modo, qualche lezione fa, adesso la scrivo secondo la definizione. Quanti hai detto che sono i canali? Sono N . Ok, quindi se io prendo queste variabili booleane, queste variabili binarie (scusate, non booleane, binarie), stocastiche, aleatorie, e le sommo assieme, ho qualcosa che al massimo mi diventa N . Però è una variabile aleatoria a sua volta, è una somma di variabili aleatorie e $1/N$ mi normalizza la somma e me la fa diventare una frazione. Ok, quindi in teoria se io avessi un qualche marchingegno, un qualche macchinario matematico che mi descrive queste variabili aleatorie e me le fa passare da **0** a **1** a seconda della cinetica marcoviana non deterministica

di questo schema cinetico, io la metto dentro, rimpiazzo dove avevo in Hodgkin-Axley [sic], rimpiazzo la N (N^4 se volete, ma tutto N), ci metto questo e in teoria dovrei poter simulare l'attività eccitatoria quando i canali sono stocastici.

Ed è in teoria la cosa più semplice del mondo, non avete equazioni differenziali, dovete solo generare al calcolatore un qualche tipo di meccanismo che diventa **1** con una certa probabilità e **0** altrimenti, ed è, diciamo, *flickera*, descrive quando questo canale sta qui, se al passo successivo resta qui oppure fa la transizione, se va qui, se ritorna indietro... dovete cioè implementare lo schema cinetico marcoviano in un modo diverso dall'equazione dell'azione di massa, della legge di azione di massa. Per il resto lo mettete dentro alle stesse correnti.

Simulare Transizioni Stocastiche: Probabilità e Numeri Casuali

Riprendo questo discorso sulle probabilità di transizione. Vedete che non è particolarmente difficile. Qui vi ho raccontato uno o due settimane fa (quando ci si diverte, il tempo vola, non mi riesco a ricordare se era la scorsa, qualche cosa fosse la scorsa settimana), in cui le frecce di quel dannato schema cinetico, anche quello di poco fa, sono da essere interpretate come **probabilità di transizione**.

Qui avete la probabilità di fare la transizione da A in B in un intervallo temporale $[T, T + \Delta t]$, dato che si era nello stato A al tempo precedente T . Probabilità condizionale in cui si parla di un intervallo perché le variabili aleatorie a valori continui non hanno probabilità non nulla su un intervallo di integrazione a misura nulla. Se voi mi dite “qual è la probabilità che il telefono suoni adesso?”, in questo istante a misura nulla, in questo intervallo temporale a misura nulla (perché non è un intervallo, è un punto), è zero.

Qui dico che è un intervallo, intervallo lo chiamo... lo prendo in Δt , supponete un secondo, mezzo secondo, cento millisecondi, quello che è, e dico che questo k_1 e k_2 sono le probabilità di transizione [per unità di tempo], così che la probabilità di passaggio è data da $k_1 \cdot \Delta t$ + infinitesimi di ordine superiore. Questa cosa che sembra un po' che può intimidire vuol dire semplicemente che io assumo che questa probabilità sia una funzione complessa a piacere, ma che sicuramente si annulla quando l'intervallo... [è] una funzione di Δt e quando l'intervallo è zero la funzione si annulla, perché la probabilità di $\Delta t = 0$ è 0 (il telefono non ha suonato e anche adesso non ha suonato).

E questo ne è lo sviluppo in serie di Taylor al primo ordine e io dico che quello che metto sugli archi di quello schema cinetico è il primo termine, il primo ordine. Il termine 0-esimo è 0 perché la probabilità di $\Delta t = 0$ è 0, quindi è una funzione che è calcolata nel punto in cui sto facendo lo sviluppo in serie di Taylor è 0. E fra un po' me ne frego degli infinitesimi di ordine superiore, però un'approssimazione... scritta così invece è un'espressione esatta.

Questo oggetto qua io lo posso simulare al calcolatore in un modo ultra semplice. Sapete o non sapete che, oramai da secoli... no, da decenni, i computer possono simulare... tutti i videogame su cui giocate funzionano con un **generatore di numeri casuali**. C'è ovviamente un campo di ricerca accademica attivo, in particolare anche legato alla crittografia, al fatto che voi in teoria dovete per

proteggere le comunicazioni dovrete cercare di poter generare qualcosa di veramente randomico. E questo è ovviamente molto complicato perché i computer sono deterministici, perché l'architettura di von Neumann, le macchine di Turing, sono degli oggetti descritti da leggi, non sono *wetware*, sono *hardware*, non è umido, è una roba di silicio che funziona, fra l'altro in un regime brutto in cui i transistori sono... però funziona e addirittura abbiamo i *large language model* e le reti *deep* che classificano i gattini o i carini... cani.

I generatori di numeri casuali quindi sono intrinsecamente degli oggetti deterministici che però hanno un comportamento quasi indistinguibile dal caso random. Una cosa che mi aveva illuminato anni fa è quando un professore a lezione mi ha fatto questo grafico in cui mi ha detto: “Se per caso avete un qualche modo per generare una funzione $f(x)$, che è fatta così, una funzione periodica (quindi queste sono delle rette), è parente del resto della divisione intera... R ... non lo so, un qualche x barrato che è questo intervallo”. Se avete qualcosa del genere, è una funzione deterministica, in cui cioè, ed è una funzione perché se io entro (quindi una funzione è un *mapping* univoco in cui a un elemento viene associato uno e un solo elemento, supponete che sia qua, uno e un solo elemento), quindi questo è l'output e questo è l'input. In questa direzione è deterministica, ma se io vi dico che ho tirato fuori questo valore qui, non potete risalire a quello che è stato il valore che ve lo ha generato. Quindi in particolare nel caso di una sequenza, una funzione simile a questa o concettualmente simile a questa. Mi pare che queste classi di generatori di numeri casuali si chiamano congruenziali, qualcosa del genere, c'è questa parola *congruential*, e non mi ricordo altro. Diventa a tutti gli effetti imprevedibile quello che era il valore della sequenza pregressa. E tipicamente questi metodi fanno sì che il valore di uscita viene ricircolato all'ingresso e viene generata una sequenza. E questa sequenza è quasi indistinguibile da un processo stocastico.

Implementazione Algoritmica: Generazione di Eventi Stocastici

Quello che avete in Python, Julia, Matlab, quello che è, avete sicuramente una qualche funzione, o di libreria o di quello che è, che vi genera un numero **pseudo-casuale**. Si chiama pseudo-casuale perché purtroppo la completa randomicità si ha con delle technique [sic] hardware di cui non vi parlo. Avete un qualcosa che lo invocate e vi genera un numero fra **0** e **1**.

Quando lo generate potreste chiedervi la cosa seguente: supponete che R sia uno di questi numeri casuali e sia generato fra **0** e **1** (supponete $[0, 1)$, non importa, possono essere aperti come intervalli). Potreste rispondere alla domanda, qual è la probabilità che R sia ≤ 1 ? Me lo dite qual è? **100%**, **1**, perfetto. Ok. E mi dite qual è la probabilità che R sia ≤ 0 ? È fra **0** e **1**, quindi **0**. Ok? Diciamo questo non dovrebbe bastare alla vostra intuizione per dire, per dire... “sì, non importa”. No, è aperto. Ha ragione, ma non è essenziale. Qui è...

Questo ingrediente vi dovrebbe far sospettare, se io ho bisogno di generare sinteticamente una probabilità che qualcosa si verifichi, quindi posso generare, fingere di simulare una moneta, il lancio di una moneta la cui probabilità è **0.5**. Posso simulare un evento al calcolatore che accade il **50%** delle volte che io chiamo quella funzione? Qui avete un indizio che se la roba che mettete qua,

quindi se utilizzate questo, se fate un paragone $R \leq$ qualcosa, sembrerebbe che quello che mettete qui è effettivamente il valore della probabilità dell'evento pseudo-casuale che state sinteticamente generando. Se io metto **0** è **0**.

Ora il passo successivo sarebbe stato di dirvi qual è la probabilità che R sia ≤ 0.5 ? Devo aggiungere, devo sottolineare una cosa, quella variabile aleatoria è **uniforme**, vuol dire che la densità di distribuzione di probabilità (qui ovviamente siete più timidi) è costante fra **0** e **1**. Non è la distribuzione di probabilità, è la densità di distribuzione, né [sic] la derivata, ma comunque non importa. Vuol dire che c'è più o meno la stessa probabilità che prenda qualunque valore fra **0** e **1**.

Ed è effettivamente vero, se io la faccio andare, prendo Python... no Python 3, mi frega adesso perché non mi ricordo a memoria... Ovviamente deve fare l'aggiornamento adesso. Interessante. `python3`. Vediamo la brutta figura che faccio. E faccio `import`, come si dice, come si fa... `from numpy`... no. `import`, come fa, `numpy`, grazie. `numpy as`, come si dice, `numpy` come, come si fa, `np, as np`, grazie. Così? Vai, *sorry* grazie. E `np`. non c'è il completamento... sì, c'è `random`. Ah ah. `random.uniform`, maledetti che cambiate la... odio questa, odio Python, odio Python. È troppo fastidioso, cioè `np.random.uniform` e probably gli devo dare `0, 1, low, high`.

Se io lo facessi un numero elevato di volte, accumulo queste cose in un vettore (se fossi figo lo farei, ma non lo faccio perché sicuramente non faccio brutta figura), e facessi l'istogramma di tutti questi termini, vedreste che grossomodo tutti i valori hanno la stessa probabilità di capitare. Infatti stanno spaziando fra **0.1**, **0.08** che era piccolo, **0.9**, **0.09**, **0.2**, **0.3**, eccetera, eccetera.

Quindi questo è l'ingrediente fondamentale. E in questo caso, quando io dico "qual è la probabilità che R sia minore di una certa quantità", in teoria graficamente dovrei dire, sto chiedendo qual è l'integrale tra **0** e **0.5**, quindi qual è l'area qui? E l'area qui sarebbe esattamente **0.5**, quindi di nuovo sembra funzionare, qualunque cosa metto qui è uguale alla probabilità dell'evento che voglio generare. Quindi se voglio generare un evento a probabilità $k_1 \cdot \Delta t$, mi faccio generare R e poi chiedo, `if R <= K1 * delta_t`, allora stampa "l'evento è successo", altrimenti "l'evento non è successo". Ricordatevi che è una probabilità di un evento, io voglio, come una moneta, voglio per esempio simulare se una moneta lanciata in aria dà luogo a testa o croce. Supponete che voglia testa, devo avere un qualche *if-then-else* che mi dica, io paragono R , l'algoritmo è semplice, prendo R , lo genero, lo paragono con una quantità che chiamo P_0 . Le volte che questa condizione logica è vera, capita con probabilità P_0 , capita P_0 volte per cento su cento volte. Se volete potete provarci.

Ed è legata alla proprietà, quindi la densità di distribuzione di probabilità è legata alla distribuzione di probabilità perché ne è la derivata e quindi per andare da uno all'altro c'è un'operazione di integrazione e qui si assume per convenzione che prima di **0** è **0** perché io non ho valori di R minori di **0** e quindi è quest'area. Quest'area si riempie in modo proporzionale, visto che è un rettangolo di ampiezza unitaria... ho dimenticato di dire che questo essendo una densità di distribuzione di probabilità vuol dire che l'area sottesa di tutto deve essere **1**, perché la probabilità è uno degli assiomi di Kolmogorov, deve essere **1** e quindi l'altezza di questo rettangolo deve essere tale che moltiplicata per la base,

che è **1**, deve dare **1** area e quindi l'ampiezza è **1**. Sapendo l'ampiezza posso fare questo gioco dell'integrale e una frazione e accade con una certa frazione, quindi **0.8**, **0.8** eccetera.

Simulazione di un Canale a Due Stati Quindi questo è l'algoritmo e con una meravigliosa simulazione al calcolatore di qualche anno fa, che devo rifare perché è penosa, posso simulare... Simulare esattamente la corrente, adesso ve lo faccio vedere, ma alla fine è: genero il numero casuale e a seconda dello stato dove sono, se mi trovo nello stato aperto posso fare solo una transizione nello stato chiuso e se sono altrimenti... non sono nello stato aperto... posso fare solo una transizione da chiuso ad aperto. Quindi α e β (vedete qui compare β e qui compare α) non sono tutti i casi possibili.

E quello che posso generare in questo bruttissimo, esteticamente bruttissimo, bruttissima rappresentazione è l'apertura e chiusura di un canale ionico, stocastico, che ha due stati, che ha uno stato unico, uno solo dei due che è aperto. E la cosa che ho fatto fra uno e l'altro, forse lo riuscite a vedere, forse no, una dei due valori di probabilità per l'unità di tempo, quindi $\beta \cdot \Delta t$, in questo caso è **0.01**, in questo caso è **0.1**, quindi mi chiudo molto più facilmente, molto più frequentemente, se mi apro mi chiudo subito. Infatti vedete che al di là del fatto che non importa chi ho definito aperto o chiuso, qui le aperture sono sporadiche, qui invece aperture e chiusure sono molto più frequenti.

Complessità Computazionale dei Modelli Stocastici Quindi in teoria io potrei mettere una roba del genere, a questo punto lo posso fare solo numericamente con un computer e fare una simulazione, e simulare... qui c'è lo svantaggio, devo simulare ogni singolo canale sodio, ogni singolo canale potassio. In ciascuno dei due casi avrò α e β che dipendono dal potenziale esattamente con le formule di Hodgkin e Huxley, su quelle cinetiche, α e β sono funzioni complicate del potenziale di membrana, però le devo tracciare tutte, cioè in memoria io devo tenere conto dello stato di tutti questi dannati... Non posso usare un'unica variabile per tutti, devo avere N variabili, N_{sodio} per il sodio, N_{potassio} per il potassio.

Quindi computazionalmente è più facile [sic, intende 'concettualmente?'], permette di modellare, di descrivere, di esplorare la componente stocastica, ma è estremamente complesso, estremamente pesante dal punto di vista computazionale perché se volete esplorare un caso tipico avete magari qualche decina, centinaia di migliaia di canali ionici sodio o canali ionici potassio. E dovete fare questo algoritmo centinaia di migliaia di volte nell'unità di tempo, perché questo dovete fare a ogni step temporale. Se lo step temporale fosse **0.01 millisecondi** o ancora meno, ecco lì, benvenuti in un mondo di complessità notevole.

Collegamento tra Modelli Stocastici e Deterministici Io non mi ricordo che cosa devo dirvi... qualcuno di voi l'abbia avuto, vuol dire che sono sufficientemente vecchio da avere colleghi che erano giovani, che anche loro non sono più giovani.

Volevo cercare di darvi un intuito, un'intuizione e una spiegazione del perché quando trattate il caso deterministico escono fuori gli esponenziali, escono fuori delle cose continue, ma in particolare escono fuori degli esponenziali ed escono fuori delle costanti di tempo. Quando invece nel caso... Io non ho nulla che mi dica che c'è un tempo, che c'è una dinamica temporale con una scala di tempo. Io ho N , **100.000**, **10.000**, oppure anche **10**, **20**, entità ciascuno delle quali *flickera* e fluttua fra, per esempio in questo caso semplice, stato aperto e stato chiuso.

Dalla Probabilità di Transizione alla Probabilità di Occupazione (Master Equation) Lo voglio fare in modo più semplice, in modo tale che qui, carta e penna, riusciamo a fare qualcosa. Quindi lo schema cinetico che ho in mente adesso, credo che vorrò usare A e B per poter scrivere dA e dB , per poter dire, pardon, per non scrivere dA e dB , perché non voglio trattarlo in modo deterministico, ma mi serve scrivere le probabilità di transizione. Ma voglio fare una cosa in più, voglio scrivere la **probabilità di occupazione**, che non è la stessa cosa della probabilità di transizione. La transizione è una probabilità condizionale o condizionata: sono in uno stato per esempio aperto e posso solo chiudermi, qual è la probabilità? Se la probabilità è **0.5** può essere che il **50%** delle volte io invece non mi chiuda, resto nello stato dove sono. Diverso è parlare di probabilità di occupazione che vuol dire “ma qual è la probabilità di trovare quel canale in quello stato al tempo t ?”.

Vi faccio vedere da dove escono gli esponenziali. Quindi qui l'ho scritto, questa $P_A(t)$ l'ho scritto come alludo a quello che è la probabilità di essere nello stato A a un tempo t . E, inoltre, una cosa che è molto reminiscente dalla conservazione della massa, nel caso dell'interpretazione deterministica, mesoscopica, non stocastica, è che o il canale sta nello stato A o sta nello stato B , quindi a un certo istante T o lo trovo aperto o lo trovo chiuso. Non è che sta in un altro terzo stato, quindi la somma delle probabilità di occupazione è unitaria, cioè se qui è **0.3** qui deve essere **0.7**, se qui è **0.7** l'altra probabilità $P_B(t)$ deve essere **0.3**.

E faccio questo ardito calcolo, mi chiedo: supponi che io sappia qual è la probabilità di occupazione adesso dello stato A nel tempo T , posso fare come esercizio di calcolare quella che è la probabilità di occupazione nello stesso stato al tempo $T + \Delta t$? Apparentemente è complicato, ma nella realtà è semplice, perché è la disgiunzione [testo originale: congiunzione logica] di due eventi, quindi o è uno o è l'altro. Dal punto di vista dell'insiemistica è una disgiunzione [testo originale: congiunzione], per questo si fa il più. La probabilità che piova e che squilli il telefono. Sono fenomeni indipendenti, ok, sarà la probabilità del... pardon, quello sarebbe il prodotto. Devo dire, la probabilità che piova *oppure* che squilli il telefono. Questa è la somma delle probabilità.

Quindi la probabilità di essere in A al tempo $t + \Delta t$ è la probabilità di essere stato in A al tempo $t + \Delta t$ E di essere stato pure in A al tempo precedente. *Oppure* la probabilità di essere in A a questo tempo E di essere stato in B al tempo precedente. Ovviamente questa è una probabilità congiunta di due eventi, chiaramente si può scrivere per la legge, per il teorema di Bayes, sulla base della probabilità di transizione. Anche questa si può scrivere nella probabilità di transizione, perché io non ho fatto una transizione.

Quindi la probabilità che io sono in A adesso e lo ero anche prima è diventata la probabilità che adesso io sono in $t + \Delta t$ e la probabilità allo stato precedente era pure di essere in A [sic]... scusate, [dato] che lo stato precedente fosse in A al tempo precedente. Moltiplicato per la probabilità di trovarmi nello stato A all'istante precedente, questo è Bayes. Più l'altro caso è la probabilità di essere nello stato A al tempo $t + \Delta t$, dato che io ero nello stato B , per la probabilità di essere nello stato B al tempo precedente.

Questa cosa qua è $1 -$ probabilità di transizione, perché io non ho fatto una transizione, mentre questo qua è esattamente la probabilità di transizione. Non mi ricordo che cos'era, se era $k_1 \cdot \Delta t$ o $k_2 \cdot \Delta t$. Questa quantità qui è $P_A(t + \Delta t)$, questa qui è $P_A(t)$ e questo qui è $1 - P_A(t)$. Ok, qui ho ancora scritto $P_B(t)$.

Dall'Equazione della Probabilità all'Equazione Differenziale Quindi state iniziando a vedere che iniziano a spuntare gli infinitesimi e quando spuntano gli infinitesimi, se per caso c'è la speranza di un rapporto incrementale, io faccio il limite, perché magari mi spuntano fuori delle derivate ed esce fuori la stessa identica equazione differenziale, questa volta però non è nella frazione di canali, è nella **probabilità** di trovare un canale in un certo stato.

Quindi quello che faccio è scrivere la probabilità di occupazione nello stato B come $1 - P_A$, visto che o è zuppa [sic] o... sei nello stato chiuso o sei nello stato aperto, quindi qualcosa che è simile alla conservazione della massa ma per le probabilità, è una probabilità di somma a **1**, che la probabilità dell'insieme dell'evento totale, dell'evento congiunto sia unitario, assioma di Kolmogorov. E quello che mi resta è... e qui io posso fattorizzare $P_A(t)$, perché appare qui, appare qui, qui c'è $k_1 \Delta t$, qui c'è $k_2 \Delta t$. Se lo faccio, mi viene fuori e faccio il limite per $\Delta t \rightarrow 0$, mi viene fuori esattamente la stessa equazione che scriverei se l'avessi fatto con lo schema cinetico interpretato in modo deterministico. Potete provare, qui era $A \leftrightarrow B$ con k_1 e k_2 , l'avevamo chiamato α e β , ma alla fine è sempre la stessa cosa. Qui era $\alpha + \beta$ e qui forse era β . E qui per esempio io potrei ridefinire, scrivere τ e P_∞ e sarei esattamente nello stesso contesto.

La soluzione analitica di quella roba lì è esattamente la stessa equazione analitica di questo. Se k_1 e k_2 dipendono dal potenziale di membrana, come k_1 e k_2 in questo formalismo lo dipendevano, io ho esattamente la stessa evoluzione temporale che avevo per N , ma ce l'ho della probabilità di trovare quel canale, un canale generico, nello stato aperto o chiuso. Quindi paradossalmente, per il momento non vi ho detto il perché io osservi gli esponenziali, ma l'esponenziale esce fuori anche qui, solo che siamo nel mondo delle probabilità, non nel mondo del determinismo. Questa è la probabilità che qualcosa accada, è tempo-variante. Adesso è bassa, adesso sta iniziando ad aumentare, adesso è diventata certezza e quindi se io sono un canale, magari faccio la transizione, so di trovarmi nello stato A . Per lo stato B non ha senso farlo perché vale che P_B a ogni istante è $1 - P_A$ in quello stesso istante.

Questo è il punto in cui, ma mi sa che lo faccio la prossima volta. Se avete delle reminiscenze di teorie delle probabilità potreste provare a calcolare il valore medio, il valore atteso di questa variabile stocastica. È **1** quando sono in uno stato, nello stato aperto, e **0** altrimenti.

NOTA: la prima parte di questo transcript “migliorato” non è stata registrata. E’ stata generata da Gemini, usando la parte finale della Lezione precedente e le (poche slide) usate durante la prima ora mancante. Usate con cautela. Non contiene ovviamente alcuna spiegazione della parte scritta alla lavagna.

Formulazione Markoviana Stocastica dell’Eccitabilità

Introduzione al Non-Determinismo Biofisico L’idea che voglio riprendere è quella di concludere la parte sull’**eccitabilità neuronale**, spingendoci oltre la descrizione minima e deterministica finora introdotta, per abbracciare una descrizione non deterministica, ovvero **stocastica**. Vi ho più volte sottolineato che l’eccitabilità non è una proprietà distribuita e continua di permeabilità ionica della membrana, ma è intrinsecamente legata alla natura discreta e microscopica dei **canali ionici**. Quando un sistema è piccolo, specialmente in un ambiente biologico a temperatura fisiologica, fenomeni come l’**agitazione termica** dominano, e il comportamento non è più puramente deterministico.

Lo Schema Cinetico Marcoviano per Canali Ionici Riprendiamo il concetto fondamentale che un **canale ionico** non è altro che un sistema che salta tra stati distinti, per esempio, uno stato **Chiuso** e uno stato **Aperto**. Queste transizioni sono governate da probabilità, dando luogo a uno **schema cinetico Markoviano**.

Immaginate un singolo canale, dove la variabile di stato s_i è binaria, $s_i \in \{0, 1\}$, dove 1 indica lo stato Aperto (A) e 0 lo stato Chiuso (B).

- $s_i = 1$, se lo stato è A .
- $s_i = 0$, se lo stato è B .

La probabilità $P_A(t)$ di trovare il canale nello stato aperto (conduttivo) al tempo t è correlata alla dinamica di transizione.

La transizione tra questi stati è governata dai tassi α (da chiuso ad aperto) e β (da aperto a chiuso). In un piccolo intervallo di tempo Δt , la probabilità di transizione è:

$$Pr\{A \rightarrow B \text{ in } (t; t + \Delta t] / \text{stato } A \text{ a } t\} = k_1 \Delta t + O(\Delta t)$$

$$Pr\{B \rightarrow A \text{ in } (t; t + \Delta t] / \text{stato } B \text{ a } t\} = k_2 \Delta t + O(\Delta t)$$

dove k_1 e k_2 sono i tassi di transizione, che nel caso voltaggio-dipendente sono $\alpha(V)$ e $\beta(V)$.

Simulazione Stocastica: Il Metodo dei Numeri Casuali Come possiamo simulare questa dinamica microscopica? Abbiamo bisogno di generare un evento casuale. Assumiamo di poter generare un numero **pseudo-casuale** r , uniformemente distribuito nell’intervallo $[0, 1]$.

Per simulare la transizione $A \rightarrow B$ in Δt , si pone la condizione che l’evento accada se il numero casuale r è inferiore alla probabilità di transizione in quel lasso di tempo:

- Se il canale è **Aperto** ($s_i = 1$): la transizione a Chiuso accade se $r \leq \beta \cdot \Delta t$.

- Se il canale è **Chiuso** ($s_i = 0$): la transizione ad Aperto accade se $r \leq \alpha \cdot \Delta t$.

Questo meccanismo produce il tipico segnale di “**flickering**” (sfarfallio) del canale singolo, che è la manifestazione diretta della stocasticità.

Dalla Probabilità del Singolo Canale all’Equazione di Popolazione

La Derivazione Markoviana (Master Equation) Concentriamoci sulla probabilità di occupazione $P_A(t)$ per un singolo canale. L’evento di trovarsi in A al tempo $t + \Delta t$ può verificarsi solo se: 1. Si era in A al tempo t **E** si è rimasti in A . 2. Si era in B al tempo t **E** si è passati ad A .

Utilizzando la definizione di probabilità condizionata e tenendo conto che $P_B(t) = 1 - P_A(t)$:

$$P_A(t + \Delta t) = Pr\{A \text{ a } t + \Delta t / A \text{ a } t\} P_A(t) + Pr\{A \text{ a } t + \Delta t / B \text{ a } t\} P_B(t)$$

Sostituendo le probabilità di transizione:

$$P_A(t + \Delta t) = (1 - k_1 \Delta t) P_A(t) + k_2 \Delta t (1 - P_A(t))$$

Riorganizzando e dividendo per Δt :

$$\frac{P_A(t + \Delta t) - P_A(t)}{\Delta t} = -k_1 P_A(t) + k_2 (1 - P_A(t))$$

E prendendo il limite per $\Delta t \rightarrow 0$, si ottiene l’equazione differenziale che governa l’evoluzione temporale della probabilità di occupazione, nota come **Master Equation** (o nell’elettrofisiologia, la forma dei tassi di transizione di Hodgkin-Huxley):

$$\frac{dP_A(t)}{dt} = -(k_1 + k_2) P_A(t) + k_2$$

Il Valore Atteso (Ensemble Average) Questo risultato è notevole perché dimostra che l’equazione che descrive la **probabilità** di trovare un singolo canale in un dato stato è **identica** all’equazione differenziale deterministica che descrive la **frazione** di canali aperti $n(t)$ in una grande popolazione!

Infatti, definiamo il **valore atteso** $\bar{x}(t) = E\{x(t)\}$ per la variabile binaria x :

$$\bar{x}(t) = 1 \cdot P(x = 1) + 0 \cdot P(x = 0) = P_A(t)$$

Quindi, il valore atteso della variabile di stato microscopica è esattamente la probabilità di occupazione, e poiché l’equazione per $P_A(t)$ è la stessa dell’equazione deterministica per $n(t)$:

$$\frac{d\bar{x}}{dt} = -(k_1 + k_2) \bar{x} + k_2$$

L’**Ensemble-average** (la media d’insieme) è uguale alla descrizione deterministica.

La Varianza: L'Essenza del Rumore di Canale

Quantificazione delle Fluttuazioni Se la descrizione deterministica cattura la media di popolazione, essa è **cieca** rispetto alle fluttuazioni e al **flickering**. Il rumore risiede nella **varianza** della variabile di stato.

La varianza di una variabile aleatoria x è definita come:

$$Var\{x(t)\} = E\{(x(t) - \bar{x}(t))^2\}$$

Poiché la variabile x è binaria ($x \in \{0, 1\}$), $x^2 = x$. La varianza si semplifica in:

$$Var\{x(t)\} = E\{x(t)^2\} - \bar{x}(t)^2 = E\{x(t)\} - \bar{x}(t)^2$$

Sostituendo $E\{x(t)\} = P_A(t) = \bar{x}(t)$, otteniamo la formula per la varianza di una variabile di Bernoulli:

$$Var\{x(t)\} = P_A(t) - P_A(t)^2 = P_A(t)(1 - P_A(t))$$

Se utilizziamo la notazione x per la probabilità di apertura, la varianza per il singolo canale è:

$$Var\{x(t)\} = \bar{x}(1 - \bar{x})$$

La Varianza della Frazione di Canali Aperti (n) Ricordiamo che la corrente macroscopica I dipende dalla frazione di canali aperti $n(t)$:

$$I = \bar{g}n(t)(V - E)$$

dove $n(t)$ è la media delle variabili di stato individuali, x_i :

$$n = \frac{1}{N_{\text{tot}}} \sum_{i=1}^{N_{\text{tot}}} x_i$$

Grazie alla proprietà di indipendenza statistica tra i canali, la varianza della somma è la somma delle varianze. Quindi la varianza della frazione n si ottiene dividendo la somma delle singole varianze per il quadrato del numero totale di canali:

$$Var\{n\} = Var\left\{\frac{1}{N_{\text{tot}}} \sum x_i\right\} = \frac{1}{N_{\text{tot}}^2} \sum Var\{x_i\}$$

Poiché tutti i canali sono **identici** e **indipendenti**, $Var\{x_i\}$ è lo stesso per tutti, e la somma è $N_{\text{tot}} \cdot Var\{x\}$:

$$Var\{n\} = \frac{N_{\text{tot}}}{N_{\text{tot}}^2} Var\{x\} = \frac{\bar{x}(1 - \bar{x})}{N_{\text{tot}}}$$

Questa è l'espressione cruciale che ci dice che **le fluttuazioni sono inversamente dipendenti dal numero totale di canali, N_{tot}** .

Conseguenze Biofisiche della Varianza di Canale

La Dipendenza Inversa dal Numero di Canali L'espressione $Var\{n\} = \frac{\bar{x}(1-\bar{x})}{N_{\text{tot}}}$ spiega l'intuizione che “più è grande il coro, meno si sentono le voci stonate”.

- $N_{\text{tot}} \rightarrow \infty$: Se il numero di canali è molto grande, $Var\{n\} \rightarrow 0$. La frazione di canali aperti n si avvicina al suo valore atteso $E\{n\} = \bar{x}$ (l'attivazione media) con altissima probabilità (questo è il **Teorema dei Grandi Numeri**). In questo regime, la descrizione deterministica è perfettamente adeguata.
- N_{tot} **piccolo**: Se il numero è ridotto (p.es., in **hotspot** dendritici o nel segmento iniziale dell'assone), la varianza è grande e le fluttuazioni sono significative. Queste fluttuazioni possono indurre **spiking spontaneo** o causare il **jitter** nel *timing* degli *spike*, come osservato da **Mainen e Sejnowski** [sic - *Sejnowski*].

La Dipendenza Funzionale dal Potenziale (\bar{x}) La varianza dipende anche dalla frazione media di canali aperti, $\bar{x} = P_A$. Questa funzione $\bar{x}(1-\bar{x})$ è una parabola con concavità verso il basso, che raggiunge il massimo a $\bar{x} = 0.5$ e si annulla a $\bar{x} = 0$ e $\bar{x} = 1$.

Poiché \bar{x} (il valore asintotico di n) dipende dal potenziale di membrana V_m tramite le curve di attivazione (α e β sono voltaggio-dipendenti), ne consegue che il **rumore intrinseco dei canali dipende dallo stato del potenziale di membrana**.

- **Iperpolarizzazione Estrema** ($V_m \rightarrow -100$ mV): Tutti i canali sono chiusi, $\bar{x} \rightarrow 0$. La varianza è prossima a zero: $Var\{n\} \approx 0$. La traccia è pulita, non rumorosa.
- **Depolarizzazione Moderata (vicino alla soglia)**: I canali sono in uno stato intermedio, $\bar{x} \approx 0.5$. La varianza è massima. Le fluttuazioni sono elevate, il che può spiegare perché il **jitter** e il **rumore** aumentano quando il neurone viene depolarizzato in regime costante.
- **Depolarizzazione Estrema (picco dello *spike*)**: Tutti i canali sono aperti, $\bar{x} \rightarrow 1$. La varianza è prossima a zero: $Var\{n\} \approx 0$. Questo giustifica perché il picco del potenziale d'azione stesso non è particolarmente rumoroso.

Questa dipendenza dallo stato V_m è la ragione per cui la creatività o l'imprecisione del *timing* degli *spike* è un fenomeno attivo e non un semplice rumore di fondo.

Il Metodo di Langevin come Approssimazione Mesoscopica

L'Alternativa Computazionale al Modello Markoviano Abbiamo stabilito che il modello **Markoviano** a singolo canale è biofisicamente accurato, ma la simulazione è **estremamente lenta** e **computazionalmente costosa** perché richiede di tracciare individualmente lo stato di centinaia di migliaia di canali.

Per superare questo ostacolo, si cerca un'approssimazione che sia **veloce** ma che al contempo mantenga la componente **stocastica** (la varianza). Questo

approccio è noto come **Equazione di Langevin** (o formulazione mesoscopica efficace).

Il metodo di Langevin consiste nel prendere l'equazione differenziale **deterministica** che descrive la frazione media di canali aperti $n(t)$ e **aggiungere** un termine di rumore stocastico $\xi(t)$, la cui ampiezza e colore (correlazione temporale) sono derivati rigorosamente dalla teoria Markoviana a singolo canale.

Per la dinamica della variabile di stato n (che è \bar{x}):

$$\frac{dn}{dt} = -(k_1(V) + k_2(V))n + k_2(V) + \xi(t)$$

Il termine di rumore $\xi(t)$ è scelto in modo che la sua varianza sia coerente con la varianza di popolazione derivata Markovianamente. In questo modo, l'equazione di Langevin incorpora la varianza:

$$Var\{\xi(t)\} \propto \frac{\bar{x}(1 - \bar{x})}{N_{tot}} \text{ (dipendente da } V \text{ e da } N_{tot})$$

Vantaggi dell'Approccio di Langevin

1. **Efficacia Computazionale:** Si devono risolvere solo quattro equazioni differenziali (per V, m, h, n), proprio come nel modello deterministico di **Hodgkin-Huxley**, ma ora con un termine di rumore che cattura le fluttuazioni. Non è necessario tracciare i singoli canali.
2. **Accuratezza:** Nonostante sia un'approssimazione, la formulazione di Langevin è in grado di replicare fedelmente non solo la media ma anche la **varianza** e la **funzione di autocorrelazione** (il “colore” del rumore) dei modelli Markoviani a forza bruta.
3. **Potere Predittivo:** Essendo un modello analiticamente trattabile, consente di inferire proprietà biofisiche (come il numero N_{tot} di canali) dalla misurazione sperimentale del rumore di membrana, come dimostrato da **Conti e Wanke** [sic - *Vanche*].

Questa doppia prospettiva (microscopica/Markoviana per la fondazione, mesoscopica/Langevin per la simulazione efficiente) ci fornisce gli strumenti essenziali per analizzare il comportamento attivo e rumoroso di un neurone reale.

Modelli Stocastici di Hodgkin-Huxley e Rumore Intrinseco

Volevo mostrarvi quello che succede quando uno prende il modello di Hodgkin e Huxley e lo trasforma, nel modo che vi ho descritto, in un modello stocastico. In questo modello, le due correnti, quella del sodio voltaggio-dipendente – che viene anche chiamata **fast inactivating** perché si inattiva rapidamente – e la corrente del potassio **delay rectifier** (rettificatore ritardato), sono trasformate e descritte in modo stocastico.

La prima cosa che faccio è, come ho fatto l'altra volta, dare uno stimolo di corrente costante. Quindi, lo accendo al tempo zero e lo lascio acceso per sempre. Se la corrente, come in questo caso, non è particolarmente intensa, non fa un granché. I più arguti fra di voi potrebbero notare che qui sembra esserci un pochino di fluttuazioni. La traccia non sembra essere esattamente quella che

ci si aspetterebbe; ci sarebbero delle fluttuazioni. Queste fluttuazioni, se io prendo una corrente e la rendo ancora più negativa (questo è -0.5 , che devono essere nA/cm²; conta l'unità, ma non la dimensione perché sto simulando per unità di superficie, quindi non sto dicendo che la cellula è di quella grandezza), potrebbero ricordare ad alcuni di voi un fenomeno che abbiamo discusso la volta scorsa: quello della riproducibilità del **pattern** di sparo.

Era questa figura qui, ed era un esperimento seminale di **Mainen e Sejnowski** [sic - *Sejnowski*], in cui, stimolando un neurone con una corrente costante, uno stimolo costante attivo per un secondo (per l'ordine di grandezza di 800 millisecondi o quello che è), facendo una pausa e poi ristimolandolo, poi facendo una pausa e ristimolandolo, si vedeva che solamente il primo **spike** della serie di 25 ripetizioni sembrava essere riproducibile in termini di **timing**. Gli altri sembravano avere una specie di sorgente di rumore, di **sloppiness**, di imprecisione che andava ad accumularsi, tanto che magari il numero totale degli **spike** forse era mantenuto, ma c'era quello che tecnicamente viene chiamato **jitter** (non so come si dica in italiano: uno sfarfallame, sfarfallio, non lo so se è la parola giusta). E vedete che questo sfarfallio tende a diventare sempre più grande quanto più passa il tempo.

Mentre, per lo stesso neurone, un attimo dopo, quando il tipo di stimolo non era così noioso, fisso, **DC**, costante, cioè, ma fluttuava (era sempre la stessa corrente, era sempre la stessa traiettoria, si era generato come un insieme di numeri casuali ma era sempre lo stesso, in qualche modo si faceva **rewind**, si riavvolgeva e si rimetteva sempre la stessa forma di stimolazione), vedete che continuava, invece, a mantenere, tranne pochissimi casi su 25 ripetizioni, una rigorosissima riproducibilità. Sembra, cioè, che ci sia una specie, come ho detto l'altra volta, di generatore di rumore che però cambia con l'attività elettrica del neurone.

In particolare, cosa che non ho enfatizzato l'altra volta, sembrerebbe da qua (ho disegnato questa barra rossa apposta): se il potenziale di membrana resta piuttosto depolarizzato, sembra che questo generatore di rumore ci sia, giochi un grande ruolo; è come se la varianza di questo generatore di rumore, la fluttuazione intrinseca del potenziale di membrana, fosse maggiore. Se invece le fluttuazioni portano il potenziale di membrana, l'input porta il potenziale di membrana periodicamente a tornare in questa barra un pochino meno depolarizzata, forse il generatore di rumore tende a resettarsi, tende ad abbassarsi.

Avevo menzionato che questa storia era ancora più interessante del solo fatto che forse la creatività, forse la possibilità di avere per un animale delle risposte che non sono identiche (non siamo robot; se fate un esperimento con un roditore o un primate non c'è una consistenza deterministica – a parte che anche il robot non avrebbe una consistenza deterministica perché sarebbe un sistema fisico, e nel sistema fisico ci sono un sacco di imprecisioni, di non idealità, lo vedete guidando un'auto, che rendono impossibile fare esattamente la stessa traiettoria due volte di fila). Questo è ancora più interessante perché sembra che sia dipendente dallo stato, dipendente dall'attività.

E quindi i più acuti, arguti, no, acuti fra voi, vedranno o vedrebbero che abbassando questa corrente, il valore della corrente, la traccia diventa più pulita. Mentre, depolarizzando il neurone, le fluttuazioni tendono a diventare consis-

tenti, addirittura tali da emettere dei potenziali di azione spontanei: la creatività. Mi è venuta in mente... ah, e dov'era? Boh. È una fluttuazione dovuta al rumore intrinseco dei canali di membrana che ha fatto sparare quel neurone che di suo, invece, codifica per il colore rosso di uno stimolo visivo, ma non c'era lo stimolo rosso nello stimolo visivo, perché stavo guardando un'altra cosa, eppure lo stesso neurone ha sparato. E tutta la biologia è così, tutta la biologia è rumorosa.

La cosa interessante è che, avendo messo il rumore di canale implicitamente dentro, non ho scritto qualcosa **più rumore**. Quindi, nella parte deterministica, che avevo scritto qua, in cui questa corrente I_K era $G \cdot n(t)$, la frazione di canali nello stato aperto, per il potenziale di inversione Nernstiano meno il potenziale di membrana, questa viene chiamata **driving force**. Non è che ho preso, come fanno gli ingegneri, che dicono: "Sai cos'è? Io questo scrivo che è $n(t)$ più un rumore Gaussiano bianco, δ -correlato, eccetera, eccetera." No, non ho fatto così: sono andato a prendere il significato biofisico e, **gratis**, mi viene un fenomeno che sembra prenderci, sembra essere esattamente quello che succede, ed è esattamente quello che succede.

Una cosa che si può fare è, qui, per esempio, cambiare il numero di canali. E se vi ricordate la conclusione di poco fa, era questa cosa in cui le fluttuazioni, la varianza, oppure la deviazione standard (ma comunque è la stessa cosa), sono **inversamente dipendenti dal numero di canali**. Se il numero di canali diventa altissimo, i membri di un coro diventano molto numerosi, non ci sono più fluttuazioni. Quindi, se aumento sodio e potassio moltissimo, il numero di canali, le fluttuazioni tendono a diminuire. In teoria, se li mettessi... infatti, per esempio, il comportamento di **spiking** spontaneo, di emissione di potenziale d'azione spontanea, è andato. Se invece questo numero di canali viene a essere molto piccolo, le fluttuazioni tendono a essere molto importanti, addirittura con tanti potenziali d'azione sparati.

Qui potresti obiettarci: "Aspetta, tu stai mettendo un numero di canali piccolo, quindi questo termine qua è piccolo, perché questa è la conduttanza massima e la conduttanza massima era numero totale di canali per la conduttanza del singolo canale." Vi sto imbrogliando perché, per spiegarvi questo concetto, io qua sto riscaldando le grandezze; quindi, quando io cambio il numero di canali, tengo fissato però il valore di conduttanza massima. Lo faccio perché biologicamente, nel caso di alcune condizioni, per esempio morfologiche, come il segmento iniziale del neurone oppure una parte dei dendriti prossimali (quindi vicino al soma), potrebbe essere che ci sia un numero molto piccolo (adesso scrivo $n < 1$ ma semplicemente perché per me vuol dire un numero molto piccolo, non che sia una frazione, ma un numero basso: non un milione di canali, ma 10, 15, 100, 500). Potrebbe essere che questo **hotspot** con pochi canali possa influenzare per prossimità elettrica.

Potete immaginare che la parte... e lo vedremo approfonditamente... i dendriti al **Soma** sono come se fossero collegati da un resistore dentro il citoplasma. Si comporta come un conduttore, magari non ideale (precedentemente, all'inizio della storia dell'eccitabilità e dei modelli circuitali equivalenti, ve l'ho venduta come un conduttore ideale in cui non c'è resistenza, perché vi ho detto: "Questa resistenza è trascurabile rispetto alla resistenza di membrana"). Strutture spazialmente estese può iniziare a contare e questo generatore di rumore distale o co-

unque prossimale (ma comunque non vicino a dove vengono generati i potenziali d'azione) può avere questo effetto.

Variabilità di Risposta e Meccanismi Stocastici

Un'altra cosa interessante è, per esempio, lo stesso tipo di protocollo in cui io tengo costante, tengo normalmente a zero la corrente. Il caso deterministico sarebbe questo: io tengo a zero la corrente, c'è un istante in cui do un piccolo impulsino, un piccolo gradino di corrente che qui è dato attorno a 50 **millisecondi** e dura probabilmente 5 **millisecondi** o 10 **millisecondi**.

Se io facessi lo stesso identico esperimento (qui, comunque, questo numero di canali sono tali, sono tanti, ma sono comunque non sono sufficienti a far andare via tutte le fluttuazioni, ok? Magari a questo livello è quasi deterministico), la risposta a questo gradino è più o meno... in questo caso magari non è eccitabile. Aumento un pochino più l'ampiezza. Perdonò. Il neurone è eccitabile, la risposta non è stata di generare uno **spike**, un potenziale d'azione. Aumento un pochino la corrente, l'ampiezza di questo gradino... niente. Aumento ancora un po'... **spike**. Però, vedete che (ed è quello che volevo farvi vedere) anche con un numero molto elevato di canali, un protocollo del genere rivela... lo sto ripetendo cinque volte (come sempre, avete il codice; potete dare un'occhiata al codice Python e vedere come ho fatto internamente a fare una roba del genere).

La cosa interessante è che dando lo stesso stimolo cinque volte, **tre su cinque** ho avuto un cosiddetto **failure**, un fallimento della conduzione, un fallimento dell'iniziazione, del **triggering** di un potenziale d'azione. Due volte, invece, su cinque, ho avuto uno **spike**. E un'altra cosa che notate è che l'istante in cui lo **spike** viene generato fluttua. Quindi, di nuovo, questa caratteristica di voltaggio-dipendenza del potenziale di membrana, perché dipende dal numero di canali aperti (vi rammento, stiamo parlando di queste fluttuazioni della variabile n), e questa variabile n ha la varianza che dipende dal numero di canali aperti, dalla frazione di canali aperti. Quindi, quando il potenziale è molto iperpolarizzato, i canali sono chiusi, questa varianza è bassa. Quando invece il numero di canali è tale per cui $x(1-x)$, che funzionalmente è una parabola, è una parabola con la concavità rivolta verso il basso (provate a disegnare $y = x - x^2$; il meno... poi non c'è il termine noto, quindi è centrata, non è centrata, come lo sapete dire voi), vuol dire che c'è un picco della varianza, un picco delle fluttuazioni. E torna che, biofisicamente, quando il potenziale è tutto iperpolarizzato, nessun canale è aperto, sono molto pochi, ed è per questo che voi vedevate, praticamente, quando la corrente era negativa, vedevate la traccia praticamente senza rumore.

Lasciamo perdere **Kolmogorov**. Qui, su queste due **slide**, avete quello che vi ho fatto vedere dal vivo con quella simulazione. Allora, questo tipo di descrizione matematica, benché sia molto accurata biofisicamente, è, come detto, parecchio complicata, è parecchio lenta. Voi dovete, per ogni santo e singolo canale ionico voltaggio-dipendente (sia del tipo di canale di sodio, sia del tipo potassio; se ci sono altri tipi di canali, dovete farlo per ogni tipo di canale), tenere in memoria una variabile di stato, ok, binaria, **0**, **1** (questo magari non costa niente).

Sì, prego.

Relazione tra Varianza, Numero di Canali e Potenziale di Membrana

Sì. Allora, se io guardo l'espressione della varianza, mi rendo conto che... quindi, se io provo a **plottare** quella quantità lì... quindi, che la varianza mi dia l'entità... la varianza, in altri termini, è la media dello scostamento quadratico, ok? E dovrebbe illuminarsi nella vostra mente il fatto che quando avete una variabile aleatoria che chiamo z , e questa variabile è Gaussiana, la densità di distribuzione di probabilità di questa variabile z , per esempio, è fatta... cioè, senza per esempio, è fatta con un andamento a Gaussiana, a campana, ha il centro in una roba che voi chiamate media, μ , per esempio, e qui (adesso non è importante dove cade esattamente, ma a spanne) la grandezza, la larghezza di questa Gaussiana è data da σ , la radice quadrata della varianza. La varianza spesso viene chiamata σ^2 , quindi σ è la deviazione standard. Faccio questa distinzione perché μ e σ devono avere la stessa unità di misura. La varianza è al quadrato, quindi se è l'altezza media, la varianza sarà metri². Quindi è per questo che la gente usa anche la deviazione standard.

Quindi, media e varianza: dovrete visualizzare il fatto che avete un qualche **offset** e quanto più c'è varianza tanto più avete questa grandezza. Io, nella mia mente, mi immagino che questo mi dica che è probabile che quando io tiro fuori o vedo delle persone di una certa altezza, o vedo quello che è istante per istante il valore della corrente generata da una popolazione di canali di membrana, eccetera, sono attorno alla media ma possono essere, molto raramente, dove ci sono le code, a valori dove sono le code, perché lì la probabilità è bassa, ma laddove non è bassa è facile che io abbia eventi a questi valori. Quindi, quanto più è grande la varianza, tanto più sono grandi le fluttuazioni.

Un altro modo nella mia testa che ho per immaginare queste cose è se voi generate al calcolatore un insieme di numeri Gaussiani, pseudo casuali (non uniformi, ma Gaussiani, quindi con questa distribuzione), li **plottate** nel tempo (quindi questo è l'inizio del mio generare e questo è il valore di questi numeri), più o meno fanno una roba del genere. E se io strizzo gli occhi, vedo che questo segnale che va nel tempo verso l'alto (ho invertito gli assi perché mi piaceva mettere in relazione questa panza o la pancia della Gaussiana con quanto a spanne era grossomodo la banda in cui era contenuta, almeno al 68% dovrei dire, una o almeno due deviazioni standard, ve lo dite voi se è il 99% o tre deviazioni standard è il 99%), quindi per me è quanto siano le escursioni di questo processo stocastico.

Lì ho che la varianza ha come dipendenza dalla media del numero di canali aperti, che è $x(1-x)$. Quando $x=0$ è 0 e quando $x=1$ è pure 0. Se volete possiamo fare lo studio di funzioni, però il massimo è per 0.5 ed è una roba che fa così. La varianza non è negativa perché è una quantità positiva e x non cambia se non fra 0 e 1. Quindi questo è il grafico.

Allora, se il potenziale di membrana, quindi \bar{x} , cambia cambiando V_m (oltre che cambiare per i fatti suoi in un transitorio), cambia a causa del potenziale di membrana attraverso quelle α e β , oppure k_1 e k_2 che le abbiamo chiamate prima, perché questi qui sono voltaggio-dipendenti. E sono voltaggio-dipendenti con quell'andamento, in realtà sarebbe $\frac{\alpha}{\alpha+\beta}$, che era la n_∞ , x_∞ qui sarebbe. In

qualche modo io so che quando il potenziale di membrana tende a diventare più depolarizzato, i canali sodio e potassio entrambi si iniziano ad attivare. Quindi da qui mi sto muovendo in questa direzione. Quindi la varianza tende a crescere e lo vedo perché quando tendevo ad aumentare la corrente ho tirato su il potenziale di membrana. Un sacco di canali si sono aperti.

Credo che voi non avreste fatto una piega nel caso deterministico: avreste detto “Vedo che a un certo punto il potenziale di membrana si discosta dal caso di un semplice **RC** passivo perché i canali sodio e potassio iniziano ad attivarsi.” Qui è la stessa cosa, ma anche nella dimensione delle fluttuazioni. Vero, il valore medio tenderebbe a integrare la corrente, tenderebbe a cambiare, la storia della concavità, vi ho detto un collega vostro del secondo anno l’anno scorso ce l’aveva con me, diceva “Sì, però la concavità è diversa da quella che è un **RC** passivo.” Sì. Qui oltre a quello avete anche le fluttuazioni e queste fluttuazioni iniziano a diventare sempre più grandi quanto più sono grandi i canali nello stato aperto.

L’obiezione corretta sarebbe: “Ok, ma dopo un po’ non dovrebbe diminuire?” Sì, infatti, durante uno **spike** (che è l’unico modo per cui al potenziale di membrana è permesso esplorare dei punti molto depolarizzati, a meno che non andiate voi con un’iniezione notevolissima di corrente, date veramente una schicchiera di corrente fortissima e il potenziale di membrana sta lì su perché state voi iniettando un sacco di corrente) ... credo che tecnicamente la pipetta, toccando la membrana, si scalderebbe un po’ e perdereste la connessione. Però se non dovesse succedere, voi vedreste che il rumore tenderebbe a diminuire. E infatti, durante gli **spike**, durante questo comportamento, non è che gli **spike** sono particolarmente brutti, sono brutti e rumorosi qui, ma qui non sono... infatti il canale di membrana lì non è particolarmente elevato.

Quello che posso fare al volo... veramente faccio danno... è al volo cambiare il tempo della simulazione. Non basta questo. Vorrei cambiare anche qui, quindi non soltanto il tempo ma anche il **range** di questa figura. Quindi so usare **Python** e **NumPy**, e quindi in teoria se io volevo avere uno **spike zoomato**, non è rumoroso qui. Prima sì. Quindi, quando il potenziale di membrana è depolarizzato, questo non è particolarmente diverso da un potenziale generato da un modello di **Hodgkin-Huxley** deterministico. Può essere una risposta? Ho risposto? Allora, quello a cui sto pensando è questo.

Dipendenza Stocastica dallo Stato e Implicazioni Sperimentali

Sto pensando, cioè, non so se c’era, forse due volte fa, non so se mi ha detto che ha perso la lezione. Allora, qui io sto pensando a queste curve di attivazione e, se volete, qui io le posso reinterpretare (perché la matematica è uguale) come non il valore asintotico che avrebbe, se ci fosse tempo, la variabile frazione, ma qui sarebbe nel nostro contesto la variabile probabilità. Però alla fine il concetto non cambia: è che nel caso del sodio e anche del potassio, quando io tendo a depolarizzare, il numero di canali nello stato aperto tende a passare da 0 a 1, al 100%. È vero, qui in effetti dovrei moltiplicare questa m_∞ per h_∞ e avrebbe una specie di andamento su e giù, però fingiamo che non ci sia l’inattivazione per il momento.

Quanto più io sono depolarizzato attorno a $-70, -80, -100$, questo è piatto, è zero. Se è piatto, allora è piatto il... allora intuitivamente i canali stanno tutti

nello stato chiuso e quindi hai voglia a **flickerare**. Sì, possono **flickerare** ma la probabilità di transizione è praticamente zero, quindi anche spontaneamente lo fanno una volta ogni morte di papa. Quando invece (perché questa curva qui, o la posso anche interpretare come una probabilità di occupazione, però in realtà mi piace di più pensare alle probabilità di transizione), quando la probabilità di transizione tende ad aumentare (quindi le α e le β , che pure avevate e che sono qua)... adesso dovrei ricordarmi chi è chi, credo. Scritto così, vuol dire che α è la probabilità di transizione fra chiuso e aperto. Lo è. Mannaggia a me, non mi ricordo le cose. Quindi se è aperto, chiuso e dico che questa è β , questa è α , cosa scrivo? $\frac{dO}{dt} = -\beta O + \alpha(1 - O)$. Sì, scritto così, α è quando è chiuso, da chiuso ad aperto. Quindi, inizio quando depolarizzo ad aumentare questa probabilità di transizione. Quindi vuol dire che se io ho un canale lì davanti a me di sodio (e il potassio più o meno fa la stessa cosa, anzi, addirittura è un pochino più... no, la scala non è la stessa, è più lento, infatti è ritardato), io lo vedrei che a potenziali molto iperpolarizzati praticamente sta sempre chiuso e raramente fa una transizione, fa una fluttuazione, **flickera**. Se invece inizio ad aumentare V , questo che è la probabilità di transizione all'unità di tempo, lo vedrei molto più spesso, ok, schiacciare la bottiglia vuol dire che sto pensando che si apre e poi si chiude. Quindi dovrei ragionare sia per le α che per le β . Ed è facile perché vedete che β praticamente, quando il potenziale è molto depolarizzato, praticamente diventa zero, cioè è molto facile che io faccia la transizione tra chiuso e aperto e che resti aperto. Le cose concettualmente tornano anche nel contesto stocastico.

Poi, se e a chi piace l'aspetto quantitativo e matematico, può essere utile non soltanto come esercizio, non per esercizio intellettuale, ma perché (ed è quello che non vi sto raccontando, ve lo accenno soltanto adesso) con l'espressione della varianza, io potrei in linea di principio prendere un neurone vero, piantarci una pipetta nello stomaco e sperimentalmente (ed è sempre così) vedere che il potenziale non sta a -70 fisso perfettamente dritto, avrebbe un pochino di fluttuazioni. Allora, gli sperimentali fra di voi direbbero: "Sì, hai detto la volta scorsa che le sinapsi (forse non eravate voi, no, erano i vostri colleghi del venerdì), le sinapsi di cui parleremo dopo, nella seconda metà di questa lezione probabilmente, sono incontinenti, perché anche loro sono sistemi stocastici. Anche se non c'è un potenziale d'azione, alla fine sono sempre canali ionici, quindi sono anche vescicole che si fondono, quindi sono incontinenti, perdono e ogni tanto hanno delle attivazioni spontanee, quello che vengono chiamati i **miniature synaptic potentials**, i potenziali sinaptici in miniatura."

Sperimentalmente io vedo anche una fluttuazione. Se blocco con un farmaco le sinapsi, quindi rendo i recettori sordi, quindi metto qualcosa che blocca i recettori sinaptici, il neurone non sente più, hai voglia se gli altri neuroni rilasciano il neurotrasmettitore. Io ho un antagonista selettivo che tappa dall'esterno i canali e quindi i canali non sentono più, non si legano più al neurotrasmettitore. Se inizio a depolarizzare, vedo sempre di più delle fluttuazioni e se ho questa formula, posso in una botta sola misurare le fluttuazioni e chiedere e rispondere alla domanda: "Ma quanti canali sono?"

Sono 225. Questo all'inizio degli anni Ottanta fu una qualche rivoluzione. C'è un bel articolo di **review**, tra l'altro di due italiani, **Franco Conti ed Enzo Wanke** [sic - *Vanche*], adesso tutte e due in pensione, che all'Istituto di Biofisica

e Cibernetica del CNR di Genova facevano questo esperimento, vedevano la fluttuazione, avevano derivato questo tipo di descrizione. È esattamente questo, se prendete il loro **paper** vedete che è questa roba qua che voi studiate adesso e da questa espressione loro possono inferire quello che è il numero totale di canali. Quindi come faccio a misurare, se non li vedo, questi canali ionici? Un modo è con anticorpi che si legano, io li vedo fluorescere con un qualche microscopio, ma se non ho un microscopio, con rumori di membrana.

Questo mi ricorda un aneddoto brevissimo, non della mia infanzia, ma è quando ero in Belgio. Mi avevano dato delle cellule che erano cellule staminali differenziate in neuroni e loro mi dicevano: “Guarda che questa cellula qui è una cellula umana indotta pluripotente, sono quasi sicuro che non fosse una cellula staminale embrionale, quindi non fosse presa da embrioni umani, era invece una cellula, per esempio della pelle, riprogrammata per diventare pluripotente e ridifferenziata per essere non una cellula della pelle, ma una cellula di un neurone.” I biologi molecolari normalmente dicono: “Per essere un neurone devi esprimere questi geni, queste proteine. Io ho un colorante specifico per tutti questi marker, per queste proteine o geni o quello che è, ti dico che questo è un neurone maturo.” Io sono un rompiscatole e dico: “No, per me è un neurone maturo, deve sparare degli **spike**.” E mettendo la pipetta dentro la pancia di questi neuroni (quindi con la tecnica del **patch clamp**, l’ho menzionato la volta scorsa perché **Neher e Sakmann** [sic - *Neher e Sakmann*] l’hanno utilizzata per questo aspetto), vedevamo in funzione del tempo... quindi l’esperimento era praticamente la stessa cosa che stiamo facendo assieme. Si dava uno **step** di corrente, un gradino di corrente, e questo gradino di corrente... supponete questo poteva essere 500 **millisecondi** e l’ampiezza veniva aumentata. Quindi una stimolazione, 500 **millisecondi**, 500 **millisecondi** il neurone si riposava, e poi riprendevo con un’ampiezza maggiore. Supponete che questi **step** potessero essere di 25 o 50 **picoampere**, per darvi dei numeri, in modo tale che sia l’esame vi chiedo: “Ma a naso, quanti sono pere, mele, sono mega ampere, che cosa sono?” Voi potete dire che sono decine di picoampere, centinaia di picoampere. Il potenziale di membrana, che disegno qua, supponete 70 **millivolt**. Quando la corrente era zero, era una roba piuttosto piatta, non c’erano sinapsi, quindi tutte le fluttuazioni che vedevo erano o il rumore di membrana o il rumore dell’amplificatore. E visto che l’amplificatore l’avevo pagato 10.000 **euro**, proprio che facesse schifo così tanto da fare il rumore... sono genovese, quindi sono sensibile a queste cose. Poi, aumentando la corrente, le fluttuazioni tendevano ad aumentare più o meno come vi ho fatto vedere e diventavano elevate.

Ora, queste cellule qui non sparavano mai. Quindi questo mi faceva pensare che avevo la prova che esistessero dei canali voltaggio-dipendenti senza aver fatto esperimenti complicati in cui prendevo la pipetta, la appoggiavo alla membrana e poi la ritraevo rapidamente così che mi restasse un pezzettino di membrana. No, una cavolata, mettevo l’elettrodo dentro la pancia del neurone e guardavo cosa faceva e vedevo che le fluttuazioni cambiavano al variare del potenziale. Quindi, da questa formula, in teoria, in effetti, solamente perché queste fluttuazioni cambiavano con la depolarizzazione, ho potuto affermare: “Ok, sì, ci sono canali voltaggio-dipendenti, quindi non è che proprio queste cellule che mi dai tu non siano eccitabili, ma per me non sono neuroni perché io devo vedere gli **spike**.” Ora, per essere onesti nei confronti di quel collega, c’erano degli schifezzi di **spike**, probabilmente perché non c’erano a sufficienza canali sodio e potassio

per creare un potenziale d'azione vero e proprio. Se volete e avete il **notebook** su **Google Colab**, in teoria potreste vedere cosa succede se prendete il modello di **Hodgkin-Huxley** e cambiate il valore di conduttanza massima per il sodio e per il potassio, e quindi state fondamentalmente giocando (anche solo nel caso deterministico) con il numero di canali sodio e potassio. Vedrete che se non sono sufficientemente numerosi non avete gli **spike** e se sono troppo numerosi potrebbe anche essere che non riuscite ad avere un **firing** ripetitivo perché il potenziale resta bloccato sotto uno stimolo. La resta bloccato, se ci sono tanti canali sodio, il sodio vince, le correnti sodio vincono sul potassio.

L'Approssimazione di Langevin: Efficacia Computazionale

Allora, e tuttavia, questa Markoviana, una descrizione complicata e vi ho ingannato perché la dimostrazione che vi ho fatto con **Google Colab** un attimo fa ha un altro approccio. Un altro approccio che abbiamo dimostrato essere molto, molto simile, è un'approssimazione che ha il nome di **Langevin**. Avete mai sentito parlare di questo tizio? Viene fuori nella cosiddetta **equazione di Langevin** e ne abbiamo accennato quando nel caso della mobilità di uno ione vi ho raccontato che per fare la derivazione o per farvi vedere quelle animazioni stupide in cui avevo le palline che si muovevano, avevo simulato le equazioni della dinamica $\mathbf{F} = m \cdot \mathbf{a}$, ok? $\mathbf{F} = m \cdot \mathbf{a}$ in due dimensioni, quindi la forza aveva due componenti, ok? Quindi l'accelerazione aveva due componenti, la velocità, che era l'integrale dell'accelerazione, la posizione, che era l'integrale della velocità, eccetera, avevano un attrito viscoso, però avevano anche un termine stocastico, perché io volevo farvi vedere l'effetto della diffusione.

L'effetto della diffusione microscopico sono gli urti, il **moto Browniano**, il fatto che i dipoli di acqua tendono ad agitarsi dal punto di vista termico e quindi a trasferire energia cinetica alle particelle, per esempio a quella di cui volevamo calcolare la mobilità o ad esumere la mobilità. In quel caso, o uno fa la simulazione numerica, come fa in questo caso la simulazione numerica Markoviana, oppure prova a scrivere un'equazione in cui tutti i termini non deterministici sono racchiusi in un unico termine che è un rumore. Esattamente quello che fanno gli ingegneri che dicono, in effetti lo fanno gli ingegneri per altri motivi, lo fanno per ignoranza e dicono: "Io su questo canale di comunicazione assumo che ci sia il segnale che voglio vedere più una quantità che non conosco, che è rumorosa, che spero che sia media nulla, spero che la varianza sia nota e vedo, mi chiedo se posso fare delle..."

Allora, la stessa cosa di scrivere una certa quantità più rumore è molto facile, però che rumore ci metto? Voglio metterci cioè una specie di processo stocastico che fluttua ed è un'approssimazione perché voi mi dite: "Ma no, hai detto poco fa, devi seguire ogni singolo canale ionico per capire se si apre o si chiude," che è questa novità che vuoi descrivere una specie di comportamento stocastico di popolazione. Sarebbe come dire: "Io in questa stanza ho tante molecole di gas, però rinuncio perché è troppo complicato tracciare l'energia cinetica della singola (sarebbe esattamente la stessa cosa), e voglio avere una formulazione che, sì, sia rispettosa della termodinamica, però mi dia anche..." (nel caso del gas in una stanza, no, nel caso di un volo facendo le curve domani, quindi la turbolenza) "...ho le singole particelle, ma l'aereo non è microscopico, è bello grosso, tant'è ci sono delle fluttuazioni, le fluttuazioni le sentite quando ci sono

i vuoti d'aria e le turbolenze. Come diamine le modello, come diamine le posso cogliere?”

Il modo per farlo è di mettere... quindi per un certo numero di anni, la gente ha preso l'equazione del bilancio della carica e poi ha detto: “Sai cos'è? Io il rumore lo metto qui.” E a priori te lo dico io, anzi di fatto te lo dico io in modo sbagliato, in modo arbitrario. A priori ti dico: “Guarda che qui metto un rumore la cui varianza cambia col potenziale.” Quindi, da un certo punto di vista, io posso dire: “Ok, sì, sei sulla strada giusta,” però d'altro canto, la persona che ha proposto questo potrebbe dire: “Ma qual è l'alternativa? Fare una simulazione con i modelli Markoviani, prima di tutto è estremamente **time consuming**, è estremamente lungo e computazionalmente non efficace.” Poi, forse se tu hai, magari metti rumore qui, qualche considerazione, non per il modello di **Hodgkin-Huxley**, per altre descrizioni dell'eccitabilità, potresti desumere qualcosa senza dover fare una simulazione, che è alla fine l'obiettivo dell'ingegneria, della fisica. Io non è che devo costruire 25 ponti o 25 valvole artificiali per capire quella che funziona nel cuore, spero di poter avere delle formule che mi dicano che siano delle **guideline**, una guida sulla progettazione. Qui sarebbe la stessa cosa, solo che mettere il rumore qui vorrebbe dire che io sto immaginando che quel termine con n non deterministico, non ha, prima di tutto non ha il prodotto fra la n e la V , perché questa cosa qua, sì ok, cambia con V , anche quello cambia con V , perché $n \cdot V$, quindi se V cambia cambia anche $n \cdot V$, ma è dentro n che la varianza cambia, lì è una dipendenza arbitraria.

Un altro modo è che nelle equazioni deterministiche si mette qui un rumore, e ve la faccio breve perché si può fare questa derivazione in modo rigoroso usando esattamente la tecnica che vi ho fatto vedere prima. Avete questa n , ora qui la sto chiamando x , avete questa n , ok, calcolo media, varianza, in realtà qui devo calcolare una cosa ancora diversa che forse non avete mai sentito parlare, ma alla fine è il colore, che si chiama **funzione di autocorrelazione**, ma fate finta di niente. Quindi è possibile fare una scorciatoia.

Confronto tra Modelli e Proprietà del Rumore

Quindi qui, per il caso di **Hodgkin e Huxley**, che è quello che vi ho simulato, io ho comunque quattro equazioni differenziali, non devo tracciare i singoli canali che sono magari centomila, qualche milione, per cui i singoli canali allora 0 o 1, no, no, è esattamente il modello deterministico complementato da un rumore e qui dentro ci metto la formula della varianza che ho tirato fuori, quindi che ho tirato fuori analiticamente che vi ho fatto vedere prima era $\bar{x}(1 - \bar{x})$ diviso il numero totale di canali. Quindi continuo ad avere una specie di manopola che mi permette di dire se il numero di canali è grande, questo termine tende a essere trascurabile e visto che quella varianza è stata calcolata con le formule, con la dinamica dei singoli canali, questa cosa qua in qualche modo eredita le stesse caratteristiche. Ci sono dei limiti e non ve ne parlo, non è che funziona sempre e perfettamente, però non ve ne parlo.

E la cosa che vi faccio vedere è il confronto fra il caso **Markoviano** e il caso di **Langevin**, che è questo caso efficace, mesoscopico, ancora rumoroso, ma approssimato. E alla fine questo è per 100 **millisecondi**. Sto **plottando** la frazione di canali aperti delle conduttanze potassio e queste delle conduttanze

sodio per un certo valore di potenziale. Sto tenendo il valore di potenziale di membrana fissato. E se io guardo la traccia nera e la traccia rossa, ok, posso dire: “Ok, sì, è un modello stocastico, sì, sembra che ci prenda sia per la media che per la grandezza delle fluttuazioni, sia per il potassio che per il sodio.” E faccio non soltanto a occhio a vedere una realizzazione temporale, ma faccio l’istogramma, cioè appiattisco tutti questi punti su uno stesso asse e conto quante volte, quanti punti ci sono qui, ce ne sono pochissimi, qui un pochino meno, qui dentro sono moltissimi. Faccio, cioè, l’istogramma ed è **tiltata** la figura proprio per dare l’impressione che se voi socchiudete gli occhi, se strizzate gli occhi, vedete che qui c’è una banda e questa banda è esattamente la banda in cui questa Gaussiana... voi dite: “Da dove viene questa Gaussiana?” La Gaussiana viene **gratis** perché avete un sacco di canali e avete sentito parlare del **teorema del limite centrale**. L’avete mai sentito parlare? È un teorema molto importante in teoria delle probabilità, che dice che quando avete un sacco di variabili stocastiche, variabili aleatorie e le sommate assieme, la somma è distribuita secondo una distribuzione Gaussiana. È incredibile. Ma come caspita è che se uno ha delle distribuzioni binomiali 0 – 1 con una certa probabilità, le sommi assieme e diventa una Gaussiana? Se voi avete un sacco di grandezze (non faccio di nuovo l’esempio dell’altezza: se prendete l’altezza, il peso, il sesso, quello che è), le sommate assieme in una qualche altra variabile (qui ha senso biofisicamente, qui è una corrente perché **Kirchhoff** le correnti si sommano, nell’esempio che ho fatto no), comunque quella somma di altezza eccetera eccetera è Gaussiana, che è stupefacente, perché la Gaussiana dovrebbe essere una specie di primitiva del mondo delle probabilità. E vedete che ci piglia, cioè l’approccio **Langevin**, che è quello rosso, prende perfettamente non solo la media ma la varianza, non potrei dire chi è chi. E prende anche questa che si chiama **funzione di autocorrelazione**, in cui non vi dico esattamente come si calcola che cos’è, ha a che fare con quanto rapidamente queste fluttuazioni cambiano, quanto rapidamente, qual è il loro colore, l’energia nel dominio trasformato delle frequenze.

Quindi la cosa che posso fare è: se posso fare almeno una volta faccio le simulazioni forza bruta con i singoli canali Markoviani, con le singole conduttanze Markoviane. Datemi un minuto e finisco. Posso fare esattamente l’esperimento di prima e paragonare le volte in cui c’è, per esempio, un **failure** oppure c’è un potenziale d’azione, o viceversa paragonare quello che è il **jitter** dei potenziali d’azione generati. E posso vedere il modello, quindi il neurone fatto con tutti i crismi, con centomila canali, ciascuno descritto da uno schema Markoviano, come va al confronto di un modello **Langevin** che è facilissimo e rapidissimo da simulare? Qui non vi dico chi è chi, se non vi dicessi che il rosso e il nero sono rispettivamente **Langevin** e **Markov**, direste più o meno la stessa cosa. Il blu è un tizio che ha proposto un altro metodo e che in questo articolo anni fa abbiamo detto: “No, l’altro metodo è proprio diverso, è proprio scarso. Com’è che questo tizio non ha fatto la stessa simulazione che abbiamo fatto noi del modello Markoviano? Voleva fare un’approssimazione? E com’è che non lo paragoni con il modello vero?” Quindi, semplicemente, uno può fare degli indicatori quantitativi e trasformare quella comparazione, quel paragone che ho accennato facendo vedere un impulso di corrente, quante volte sparo rispetto al totale. Quindi questo è il numero di volte che spara, fra 0 e 1 è una probabilità rispetto all’ampiezza dello stimolo, eccetera, eccetera, e le cose funzionicchiano.

Trasmissione Sinaptica: Elettrica vs. Chimica

Ok, e il culmine: se uno fa l'esperimento, se uno riproduce quell'esperimento di prima, vede che se lo stimolo è costante avete questo **jitter** dei potenziali d'azione. Non è fatto per essere esattamente identico a quello di prima. Io qui sto facendo vedere solo i primi quattro **spike**. Quando invece lo stimolo è con delle fluttuazioni, delle escursioni rapide, qui il **jitter** è piccolissimo. Paradossalmente c'è più **jitter** il primo del secondo del terzo. Quindi vuol dire che la descrizione di **Langevin** non è tanto male. Quindi molte delle cose che alla fine discendono da questa teoria di questi due tizi, **Franco Conti ed Enzo Wanke** [sic - *Vanche*], sono delle considerazioni di popolazione statistiche, quindi, pardon, legate alla teoria delle probabilità, ci prendono sia dal punto di vista sperimentale, sia dal punto di vista della descrizione equivalente, quando la simulazione diventi troppo pesante. Questo chiude la parte, questo non ve lo racconto, chiude la parte di eccitabilità. Facciamo una pausa di dieci minuti e riprendiamo sulle sinapsi, di cui voi un pochino sapete qualcosa. Grazie. Ok, inizia, giusto? No, continuo a fine stanotte. Ok. Sì, sì, ok, finiamo alle 18, meno qualcosa.

Quindi, ok. Quindi questa parte è relativamente leggera. Inizia con il raccontarvi, forse di nuovo, sulla base di quello che avete visto con il professor **Zoli**, ma con il linguaggio della bioingegneria e della biofisica, la trasmissione sinaptica, perché alla fine le sinapsi funzionano, perlomeno nella parte post-sinaptica, esattamente con la stessa logica dei canali voltaggio attivati. Non sono voltaggio attivati, sono **ligando attivati**. Vedrete che esattamente, vi tormenterò con aperto e chiuso, α e β fra un attimo ritornano.

Quindi però vi racconto che esistono due tipi di trasmissione sinaptica (forse **Zoli** ve ne ha parlato, vi ha parlato di entrambi). La prima è chiamata trasmissione sinaptica **elettrica**, per distinguerla dalla trasmissione **chimica**. Non tutti i neuroni comunicano o non necessariamente comunicano sempre e solo con un rilascio di neurotrasmettitore. Convenzionalmente, "il cervello è una macchina elettrica." In effetti, è sbagliato anche questo: i neuroni convertono, attraverso le sinapsi, stimoli elettrici in stimoli chimici, poi, **by the way**, fra parentesi, sono ulteriormente immediatamente convertiti in stimoli elettrici.

C'è un'eccezione che è quella delle sinapsi elettriche, e vi racconto il mio modo per cercare di darvi, al solito, non una nomenclatura mnemonica, ma sperando di potervi realmente... di farvi attivare, farvi apparire qualche sinapsi, la nomenclatura e le classi di questi recettori postsinaptici in un modo che spero possiate non dimenticarli, particolarmente anche nello spirito di dire: "Quando è che una sinapsi è eccitatoria o inibitoria?" Voi mi direste: "Eh, dipende dal neurotrasmettitore." Ni, sì, però dipende dall'effetto che ha quel neurotrasmettitore quando si lega al recettore postsinaptico. Adesso ovviamente non ha tanto senso, lo avrà fra un attimo.

Il primo tipo si chiamano anche **gap junction**, dove vuol dire **giunzione del gap**. **Gap** è uno spazio, un piccolo vuoto, e sono delle sinapsi che capirete in un attimo perché, o forse fra qualche minuto perché, le definisco come **bidirezionali, lente e senza segno** (dove per me il segno, a questo punto, vorrebbe dire che se una sinapsi è eccitatoria, in qualche modo, rispetto al neurone post-sinaptico tende a depolarizzarlo, tende a facilitare la probabilità che quel

neurone possa raggiungere soglia e sparare, mentre una sinapsi inibitoria tende invece a iperpolarizzare, tende a sfavorire il... non è universale ma è un'ottima approssimazione... tende a sfavorire il neurone post-sinaptico). Quindi io mi eccito e eccitandomi rilascio del neurotrasmettitore che può avere un effetto eccitatorio o inibitore a seconda dell'identità del neurotrasmettitore. In realtà la cosa che la fa da padrona è l'identità e il tipo di funzionamento del recettore post-sinaptico. Ma qui non c'è nulla che viene rilasciato, però volevo dirvi che cos'è per me il segno.

In questo caso esistono dei canali di membrana, cui mi sono appena scordato come si chiamano, **connessine**, **connexins**, che quando si giustappongono, e devono essere nella parte presinaptica, quindi nella membrana del neurone A e della membrana del neurone B, e la membrana del neurone A e del neurone B devono essere vicine, devono toccarsi quasi, o comunque essere quel tanto che vicine per avere un **gap**, uno spazietto, e queste **connessine** allineandosi per motivi di legami, credo elettrostatici (questo non lo so, sono ignorante), formano un poro che mette in comunicazione diretta il citoplasma di una cellula col citoplasma di un'altra.

Nel dibattito che non vi ho raccontato, forse l'ho solo menzionato, fra **Camillo Golgi e Ramón y Cajal** [sic - *Ramón y Cajal*], era interessante perché alla fine entrambi avevano ragione. **Camillo Golgi** era convinto, nonostante avesse inventato lui la storia dell'impregnazione d'argento che ha permesso a **Cajal** di fare non solo bellissimi disegni ma di inferire il fatto che i neuroni avessero una specie di polarizzazione, nel senso che una parte prende l'input e un'altra parte, l'assone, è l'output. **Cajal** diceva che non c'era una continuità tra l'interno di una cellula e l'interno di un'altra, invece **Camillo Golgi** diceva: "No, è come il cuore, è un **sincizio**, è un continuo di cellule eccitabili che si sono discrete, ma hanno una comunicazione fra il citoplasma di una cellula in diretto contatto con il citoplasma dell'altra." In realtà credo che **Golgi** pensasse che non ci fossero delle cellule individuali, credo, ma che fosse una specie di rete, una specie di grafo. Invece **Cajal** diceva: "No, esiste una giunzione, la vedo, c'è proprio spazio fra un neurone e l'altro."

Le **gap junction** in qualche modo danno ragione a **Golgi** e sono, perché, ripeto, mettono in comunicazione ionica l'interno delle due cellule. E la cosa interessante è che è un tipo di comunicazione sinaptica dal punto di vista **filogenetico** (che vuol dire dell'evoluzione delle diverse specie), relativamente antica e molto rappresentata soprattutto negli invertebrati, soprattutto negli insetti, che sono invertebrati. E anche **ontogeneticamente** (che vuol dire dal punto di vista dello sviluppo, non filosofico, costitutivo dell'essere, ma dello sviluppo del singolo, dall'embrione all'adulto), le **gap junction** appaiono prevalentemente durante le prime fasi dello sviluppo. Tuttavia, in anni recenti, le hanno trovate nella corteccia adulta fra tipi diversi di neuroni inibitori.

Sembra che, essendoci una diversità di tipi cellulari, "se tu sei un tipo di neuroni inibitori del tipo A, tu tocchi e hai le **gap junction** con altri neuroni dello stesso tuo tipo, ma non con quelli del tipo B." Sono tutti inibitori e in qualche modo, ci sono delle ragioni che magari commenteremo assieme nelle prossime volte, queste **gap junction** sono specifiche. Non è difficile immaginare il perché di questa specificità, è di fatto una conseguenza dell'espressione dei geni. Se io sono portato a stabilire, a esprimere queste **connessine** perché sono io neurone

inibitorio del tipo A, può essere che ci sia un motivo evolutivo per cui io sono sempre portato a esprimerle e a stabilire una sinapsi elettrica con un altro neurone.

Bidirezionale perché se io vi dico: “Chi è quello che parla, chi è quello che ascolta?”, semplicemente da questa figura, da questo **cartoon**, voi mi dite: “È simmetrico,” cioè uno ione potrebbe passare. Non vi ho detto se queste **connessioni** sono selettive o meno, supponiamo che non lo siano, non sono particolarmente selettive a dei tipi ionici. Tipicamente l'ione calcio riesce a passare da una cellula all'altra, potrebbe passare da qui a qua o da qua a qui, quindi è bidirezionale. Non c'è: “Io parlo, sputacchio il mio neurotrasmettitore, poi dall'altro lato c'è qualcuno con un recettore, quindi con un buco a cui lo sputo.” Ok, il neurotrasmettitore si lega e continua una cascata elettrica. Qui no, è **lento** per un motivo che vediamo (qui non c'è particolare, c'è solo un buco, un poro), e dal punto di vista elettrico di rock è lento perché questo è analogo a due **RC**, a due circuiti **RC** messi vicini, sono due cellule, sono due membrane. Ed è **senza segno** per un motivo che vedremo: non c'è che se questo di sopra è elettricamente attivo e inizia a sparare dei potenziali d'azione, necessariamente questo neurone di sotto tende a essere o eccitato o inibito. Magari entrambe le cose, oppure, correttamente, la risposta sarebbe: “Dipende.” Adesso vi dico da cosa dipende.

Proprietà e Segnale delle Gap Junction

Questo è un esempio di due... quindi non sono delle cellule di insetto, è un articolo relativamente recente, forse, ok, magari 10 – 15 **anni fa**, in cui due tipi di **interneuroni** della corteccia di roditore di tipo **low threshold spiking** sono neuroni inibitori che per i fatti loro hanno questa connessione, queste sinapsi elettriche. Da cosa se ne sono accorti gli investigatori, gli sperimentali? Dal fatto che iniettando, supponiamo, nel primo neurone, in questo qui (dovete avere pipette in entrambi i neuroni, cosa che sperimentalmente è molto complicata, perché quando avete magari la pipetta in un neurone, dovete innanzitutto avere fortuna a beccare l'altro neurone che sia connesso - non è che si vede, dice: “Ah, questi sono connessi” - e poi dovete fare in modo che quando stabilite il **patch** con l'altro neurone non perdiate il primo, perché basta un niente, basta un soffio). C'è gente che ha abbandonato la ricerca perché trovare neuroni connessi era una roba che richiedeva anni e dopo un anno questo tizio aveva un numero di... era riuscito ad abbassare gli elettrodi, di beccare due cellule collegate soltanto 10 volte su 12 mesi che provava. Una frustrazione notevole.

La cosa interessante è che questi sperimentatori hanno iniettato non soltanto una corrente depolarizzante, vedete questo gradinetto costante (qui la barra di calibrazione non dice quanti **picoampere** hanno iniettato). Quando la corrente di stimolo è positiva, è depolarizzante, questo neurone fa la cosa che ci aspettiamo, addirittura vedo un bellissimo adattamento frequenza-dipendente (vedete che gli **interspike interval** dei primi due o tre sono più piccoli degli altri, poi a un certo punto va allo **steady state**). E qui io vedo nell'altro neurone, per definizione di sinapsi, vedo dei... non dei potenziali d'azione, si chiamano **potenziali sinaptici**. Perché? Perché sono l'eco di questi potenziali

d'azione. Quando c'è questo potenziale d'azione io vedo questa gobetta, poi ne vedo un'altra, poi ne vedo un'altra, eccetera. E anche queste gobette hanno un'ampiezza che magari dipende da qual è, ma soprattutto vedo che il tempo, l'istante quando occorrono, riflette esattamente lo stesso **timing**, la stessa temporizzazione degli **spike** presinaptici.

La cosa strana è che quando io pure do uno stimolo iperpolarizzante, in cui il neurone non spara, questo neurone qui fa il comportamento di un **RC**, diventa una roba che è un lavandino pieno di un liquido con la pelle, diventa una roba estremamente noiosa. Tant'è, anche quando il neurone è iperpolarizzato, anche se questo non emette degli **spike**, vedete un'eco, un'eco nel potenziale di membrana dell'altro neurone. Questo potenziale di membrana si iperpolarizza un po'.

Qui è importante notare la scala temporale. Questa barra di calibrazione ha valore di 30 **millivolt** per la traccia di sopra, e infatti sono **spike**. Se voi prendete questo pezzettino e lo mettete qua, probabilmente vedete che ci sta 2–3 volte, quindi attorno a 90 **millivolt**, 100 **millivolt** dalla base alla sommità degli **spike**, che è il **mantra** che vi dico: 100 **millivolt**. Quindi mangiate le banane, il voltaggio di un cellulare non è così diverso, 0–1 volt, insomma. Invece la stessa lunghezza qui (per evitare di mettere le due... dal punto di vista grafico confonde un po', ma è un'abitudine notevole, un'abitudine frequente), questa barra di calibrazione vuol dire che nel secondo grafico sta per 4 **millivolt**, quindi questa roba qua è 10 volte più piccola. E per i potenziali sinaptici potevate dirmi: "Vabbè, ok, sì, posso immaginare che siano piccoli, non è che io sparo e il neurone post-sinaptico pure lui spara." Questo non avviene o non avviene molto di rado, particolarmente molto di rado nei vertebrati. Ma non solo, anche questa iperpolarizzazione è piccola, è dell'ordine di qualche **millivolt**. Il fatto è che però c'è, quindi è come se ci fosse un accoppiamento continuo, non impulsivo, cioè non è che solo quando io sparo allora c'è la comunicazione. Qualunque cosa questo potenziale di membrana fa, questo altro neurone segue.

Provate a capire quale potrebbe essere il modo per modellare matematicamente o per descrivere dal punto di vista funzionale, meccanico, meccanicistico, il modo con cui questi due potenziali di membrana, queste due cellule, sono accoppiate fra loro. C'è un filo di mezzo, c'è una resistenza di mezzo. Quindi prima vi ho detto che le **connessine** sono dei pori, quindi non ci vuole un grosso colpo di genio, e ve lo credo, faccio vedere fra poco.

L'altro modo con cui i neuroni si parlano è una connessione **chimica**, di cui probabilmente sapete bene, e in questo caso è **unidirezionale**, perché sono io che proietto a te, e questo è il mio assone, e l'assone, tranne rari casi, è lui che sputacchia il neurotrasmettitore. E lo sputacchia tipicamente non su un altro assone (in quel caso si tratterebbe di una sinapsi asso-assonica, che esiste, però adesso non voglio confondervi). Io ho una parte della mia morfologia che è specializzata per sputacchiare il neurotrasmettitore e posso proiettare a un neurone lì, ma quello lì per poter avere uno stesso impatto su di me deve allungare il suo assone, magari non lo allunga, lo allunga da un'altra parte.

Meccanismi della Sinapsi Chimica e Classificazione dei Recettori

Quindi questa struttura che è la terminazione, il terminale sinaptico, la terminazione di un assone, che può essere anche, che si biforca, ci sono diverse **branching** di ramazioni, si chiama **bottone sinaptico** ed è rispetto alle **connessioni** un mondo di complessità completamente, ordine di grandezza superiore. Credo che sia l'organo cellulare, dal punto di vista dell'anatomia e fisiologia cellulare, più complesso che c'è nel corpo umano e nel sistema nervoso e in biologia. È estremamente complesso, ci sono un sacco di attori che giocano.

Il risultato finale è che quando questo terminale viene invaso da una depolarizzazione che viaggia nell'assone, più o meno sempre uguale (per il momento non vi ho raccontato questi fenomeni di propagazione, li accenneremo, li vedremo più dal punto di vista dei dendriti, ma sarà nelle prossime volte), potete immaginare che se l'assone è eccitato e spara uno **spike**, questo **spike** può avere come i segnali in un cavo transoceanico, particolarmente i segnali digitali in un cavo transoceanico che sono periodicamente, periodicamente nello spazio, rigenerati. Per questo si usano le comunicazioni digitali, perché anticamente **Lord Kelvin** nell'Ottocento doveva, insieme a un altro tizio, **Heaviside**, dovevano far fronte e capire qual era la fisica del perché se io avevo un cavo di 10.000 o 100.000 chilometri (forse 100.000 è eccessivo), qualche decina di migliaia di chilometri, io parlavo al microfono da un lato con un segnale analogico e dall'altro lato il segnale era estremamente attenuato. Voi dice: "Ok, grazie, è come se fosse un filo lunghissimo di un resistore." Sì, ma anche delle proprietà capacitive e induttive e questo porta a una deformazione, quelle che vengono chiamate **linee di trasmissione**. Quindi a ricevitore, anche se erano solo segnali telegrafici. Se invece immaginate di dover trasmettere soltanto o un livello logico **0** o un livello logico **1**, se a un certo punto io metto una stazione che anziché sentire **5 volt**, standard **TTL** (che è una roba in elettronica molto ancora frequente), quindi anziché sentire **5 volt**, vede **4.5**, dice: "Ok, questo è molto diverso da **0**. Voleva dire **5**," lo rigenero a **5** e questo metodo di comunicare digitalmente è estremamente vantaggioso.

Qui potete immaginare che la propagazione di un potenziale di azione lungo un assone, visto che l'assone continua ad avere un sacco di canali voltaggio-dipendenti, continua ad autorigenerarsi. E alla fine è il miracolo del perché io dalla mia corteccia motoria riesco a muovere il dito del piede, nonostante sia un metro e mezzo, un metro e ottanta, quello che è.

Quando qui viene depolarizzato la membrana ci sono dei canali voltaggio-dipendenti particolarmente selettivi al calcio. Entra il calcio perché sono canali che si aprono quando il potenziale è depolarizzato e come vi ho detto di calcio dentro ce n'è praticamente zero, calcio libero ce n'è zero. Il calcio in realtà esiste nel reticolo endoplasmatico, in una specie di compartimento in un magazzino, ma libero di poter azionare delle cascate biochimiche, non c'è, ce n'è praticamente zero, ce n'è poco. Quindi quando entra, quello che può fare inizia a farlo e particolarmente quello che fa, questa è la storiellina, è che fa fondere le vescicole, delle vescicole che sono dei pezzi di membrana di doppio strato lipidico che all'interno hanno delle molecole di neurotrasmettitore. Un meccanismo incredibilmente complesso e affascinante di come un neurone possa avere, come la biologia e l'evoluzione possa avere compartimentalizzato un

quanto di molecole. Cosa che c'è stato un premio **Nobel** perché questo rilascio di neurotrasmettitore non è continuo, non è con valori arbitrari, è in **quanti**, è in unità discrete. Perché devono essere unità discrete? Forse i principi di funzionamento di questa roba qua hanno a che fare con una codifica digitale. Forse è un caso. Vallo a fare un sistema che fa degli sputacchi analogici, che può fare una modulazione della quantità di neurotrasmettitore. Potrebbe essere più complicato, nessuno credo lo sappia ancora.

E queste vescicole si fondono e in quello che viene chiamato anche qui, o forse solo qui, **Kiss and Ride** (no **Kiss and Go**, **Kiss and Ride** all'aeroporto), in cui nella parte del intracellulare del bottone presinaptico queste vescicole sono ancorate e quando c'è calcio libero, ci sono ovviamente delle proteine, **sinapsina** in particolare, che tiene ancorato la vescicola alla parte intracellulare della membrana del bottone sinaptico, si crea un poro e per **esocitosi** il contenuto di questa vescicola diffonde e a un certo punto questa un attimo dopo si risigilla, diventata vuota e ritorna all'interno, non è più ancorata, pronta per essere **replenished**, per essere ricaricata, rifornita di nuovo.

Quello che succede nel bottone post-sinaptico invece è relativamente più semplice. Notate che questo avviene in una frazione di millisecondo.

Prego.

Il calcio è fuori, c'è tanto calcio fuori e quando canali che sono voltaggio-dipendenti (quindi V qui di questa membrana deve aumentare, deve depolarizzarsi), quando aumenta qui c'è un gradiente elettrochimico, questo entra e questo segnale è sufficiente a fare, a innescare una cascata. Le cose sono un po' più complicate di così, la disposizione di questi canali calcio è molto vicina a questo arrangiamento spaziale, ci sono dei **microdomini** in cui ci sono. Quindi è come se... non è semplicemente "entra del calcio e io rilascio." Può essere che ci sia una specie di modulazione: "Adesso rilascio tanto, adesso rilascio poco," tanto che la gente (lo intravedremo) ha descritto questo comportamento anche in termini stocastici, dicendo: "Qual è la probabilità di rilascio?" Quindi la probabilità di rilascio non è o tutto o niente, potrebbe essere 0.8. Poi ci può essere anche una probabilità di rilascio spontanea in cui non c'è un potenziale d'azione ma qui si ha la fusione lo stesso e questa sinapsi rilascia del neurotrasmettitore. Quindi a tutti gli effetti, a chi riceve, dice: "Ah, ma c'è stato qualcosa." Magari ne ha rilasciato poco. Ok? Ho risposto?

Dal punto di vista post-sinaptico dico che è semplice perché è fondamentalmente la stessa cosa. Vi faccio vedere un paio di animazioni di quel tizio che ho visto su internet che fa delle animazioni grafiche. Ripeto, non sono delle simulazioni di dinamica molecolare, sono solo dei **cartoon**, però sono belli estetici da vedere. Se prima avevamo nella membrana del neurone **post...** ripeto, anche se è buffo, io ho la mia elongazione dell'assone che sputacchia il neurotrasmettitore, l'altro neurone non è detto che elonghi il suo assone verso di me, l'altro neurone ha un orecchio, ha una specie di recettore. Lo chiamo orecchio perché, come me lo immagino, vi farò vedere, è un canale di membrana, quindi è intercalato al doppio strato fosfolipidico e l'unica differenza con i canali che vi ho raccontato, che abbiamo discusso fino ad ora, anche dal punto di vista stocastico, non ha i famosi **gate** attivati. Quindi le α e le β , non sono funzioni del potenziale di membrana. Potrebbero anche esserlo, ma in generale

non lo sono. Sono funzione della presenza o meno, in un qualche dominio nella parte extracellulare, del **binding**, del legame chimico fra una molecola di neurotrasmettitore. Supponete che questo sia **Glutammato**. Quando la molecola di **Glutammato** si lega a questa parte, a questa bocca, a questo sito, il recettore si apre (non è sempre così e lo vedremo), e quando si apre, qui semplicemente per un gradiente elettrochimico, questo canale fa passare una corrente che è quella fatta da ioni per cui lui era selettivo. Non è necessariamente detto che il **Glutammato** vuol dire che tu sei selettivo per sodio, potassio. Dipende dal recettore e l'evoluzione ovviamente ha fatto sì che ci fosse un qualche allineamento, ma ci sono dei casi, soprattutto durante lo sviluppo, che un particolare neurotrasmettitore, che non è il **Glutammato** ma il **GABA** (sto pensando al **GABA**, acido gamma-aminobutirrico), non ha uno stesso effetto come nell'età adulta. Durante lo stato embrionale, e nell'uomo non mi ricordo quando, nel ratto è fino alle prime due settimane di vita, dopodiché il ratto apre gli occhi e le cose cambiano, quando il **GABA** si lega, qui la corrente non è inibitoria, quindi non è iperpolarizzante, ma è depolarizzante. Ma come? Questo è un neurotrasmettitore inibitorio. Sì, ok, ma dipende da questo qui. Se questo canale di membrana fa i fatti suoi e ha delle sue idiosincrasie, è questo che comanda se sei eccitatorio o no.

Quindi la parte postsinaptica in effetti l'abbiamo ampiamente commentata pensando al caso voltaggio-dipendente. Qui è ligando-dipendente. Ci sarà nelle α e nelle β , ci sarà una qualche dipendenza dal numero di queste molecole attorno, se volete, oppure se proprio volete sapere, **spoiler**, ci sarà una variabile che è funzione del tempo, la concentrazione di neurotrasmettitore nel cosiddetto **cleft** (non so come tradurre in italiano, nel... non lo so... nello spazietto fra una, nell'intercapedine fra, ecco, intercapedine fra il bottone sinaptico e la membrana postsinaptica). Qui, supponete, per pochi millisecondi ci può essere anche una concentrazione di **Glutammato** o di **GABA** grande quanto un **millimolare**, che è un sacco. Perché viene rilasciata qui lo spazio, il volume è molto piccolo, quindi concentrazione o densità sono delle grandezze che sono numero di particelle diviso il volume. Se il volume è molto piccolo la concentrazione può essere molto grande.

Quindi questo è **unidirezionale, veloce** (per il momento non ha senso, non vi ho spiegato il perché, veloce o lento). Alla fine dipende da questo. Vi ho detto che i canali voltaggio-dipendenti sodio sono fra le cose più rapide, le ho paragonate alle **Ferrari**, prendendomi la responsabilità di dire una roba del genere qui, e hanno il **segno**, nel senso che questo neurotrasmettitore crea sempre più o meno lo stesso effetto sui neuroni postsinaptici, a meno che di un qualche **shift-switch** durante la fase embrionale.

Questo è un esempio di un esperimento eroico fatto con la tecnica del **patch clamp**, ma non con una pipetta, con **quattro pipette**. Tenete conto che per ognuna di queste pipette ci sono circa 15.000 **euro** di amplificatore, altri 30 – 40.000 **euro** di micromanipolatore, e quindi se voi avete una pipetta, o ne avete 4, o ne avete 3, eccetera, vuol dire che avete molti più soldi per la ricerca. Il **record** del mondo era in un laboratorio dove ho lavorato, ne avevano 10, però credo che fosse pagato per metà, ma questa è una leggenda, non so se è la verità oppure no.

Questa è un'immagine in cui quattro neuroni, in realtà sono un po' di più,

sono sei, sette, otto neuroni piramidali, sono visualizzati con una tecnica microscopica che vi ho già raccontato, quella che sembra di vedere i crateri della Luna, che si chiama microscopia differenziale a contrasto, di interferenza a contrasto, **Differential Interference Contrast microscopy, DIC**, con infrarosso. L'infrarosso penetra un pochino di più in un tessuto, questo è un pezzo di tessuto di corteccia somatosensoriale del ratto, 300 **micrometri**, e io qui ho quattro pipette (adesso qui non si vedono, ce n'è una nel neurone 1, una nel neurone 4, una nel 3 e una nel 2). Se io controllo tramite una schicchiera di corrente, esattamente come la simulazione che vi ho fatto vedere diverse volte, sono io che inietto nel neurone 1, io non so se è un neurone presinaptico o postsinaptico, perché vi ho detto io non li vedo, cioè non so qual è la connettività fra questi. L'assone del numero 2 probabilmente va giù e poi forse ritorna su e stabilisce una sinapsi con i dendriti del neurone 1. Non lo so, non lo vedo. Quindi l'unico modo è **blind**, in modo, ok, non è del tutto **blind**, però metto queste pipette e inizio a stimolare un neurone alla volta e vedo se c'è un'eco, un'eco di attivazione di questi recettori che dovrebbero farmi vedere che ogni volta che io faccio un potenziale d'azione vedo un'eco oppure no. Ok, qui ci sono le pipette. Qui si intravede con questo colorante fluorescente, si intravedono i dendriti apicali e anche i dendriti basali, ma l'assone onestamente è talmente sottile che comunque non lo potete seguire. Potrebbe addirittura essere al di fuori del piano della fettina, della **slice**, perché è tagliato. Non è che il piano di una sezione contiene, non è che i neuroni sono tutti, perlomeno in corteccia, non sono tutti allineati in uno stesso piano, quindi alle volte potresti avere due neuroni che in vivo erano connessi, ma quando io faccio a fette il cervello taglio la connessione, che è la cosa che succede il più di frequente.

Quello che vedo è che se questo è il neurone 1, io vedo in uno degli altri, non mi ricordo qual era, vedo l'eco, un potenziale post-sinaptico, eccitatorio. Nota, qui la barra di calibrazione è 50 **millivolt** o 60 **millivolt**. 50 mentre qui questa barra di calibrazione piccolina è 0.2 **millivolt**, quindi l'ampiezza di questi potenziali sinaptici è piccolissima. Il che dovrebbe farvi pensare: "Hai voglia a sparare per un neurone presinaptico per eventualmente far sparare un neurone postsinaptico." Forse è necessaria una convergenza delle connessioni che tanti neuroni insistano su un neurone postsinaptico. Non c'è uno a uno, non è una catena: "Io sparo, allora tu spari, che tu spari," basta uno **spike**. No, questo ha un sacco di considerazioni molto interessanti.

Mentre la barra di calibrazione orizzontale è la stessa, ed è 20 **millisecondi**, che più o meno torna perché lo **spike** è piccolo, è dell'ordine di un millisecondo, andare giù e su. Per me è solo questo che mi interessa: il fatto di questa gobetta indica che ci sono un certo tipo di canali, ma non importa. Quando c'è lo **spike**, dopo qualche ritardo, forse dovuto al tempo che impiega il neurotrasmettitore a diffondere, circa un millisecondo, o comunque l'ordine di grandezza è quello, deve diffondere in uno spazio molto piccolo, che è dell'ordine di una frazione di **nanometro**, e si lega con questo recettore. E questo recettore avrà la sua cinetica prima di aprirsi. Quindi io non vedo subito e istantaneamente l'eco dell'apertura di un canale.

Inoltre vedo che qui, questo è il potenziale di riposo del neurone post-sinaptico, vedo che questa deflessione va in su, cioè va verso la soglia di eccitabilità, se mi concedete che esista. Al di là che esista o no, più io vado in su, depolarizzo, più

aumento la probabilità di sparare il neurone post-sinaptico. Ora, questo neurone qui stava seduto a **-70 millivolt**, quindi è impossibile che spari, ma magari dinamicamente poteva essere per altri neuroni che l'avevano eccitato, poteva essere per i fatti loro un po' più depolarizzato, allora arriva questo e lo fa sparare. In questo caso, iniettando un potenziale d'azione anche nell'altro neurone, nel neurone post-sinaptico, anche lui aveva una, elongava un assone e stabiliva una sinapsi chimica verso il neurone di partenza. Quindi in questo modo uno poteva dire: "Guarda che anche se con ampiezze diverse, questi neuroni, l'uno e il tre, erano sorprendentemente bidirezionalmente collegati," che è molto insolito.

Ora qui la cosa era interessante perché la probabilità di trovare semplicemente una coppia, non sto dicendo una coppia e anche l'altra, semplicemente due neuroni A e B, A connesso con B, in corteccia è una probabilità molto bassa. Per questo quel collega ha abbandonato la ricerca, perché era dell'ordine del 10%. Vuol dire che su 100 volte che voi mettete gli elettrodi, impiegate diversi minuti, impiegate probabilmente 5 – 10 **minuti** (a meno che non siate molto molto **skilled**, molto bravi), solamente 10 volte beccate una connessione. Questi tizi hanno 4 elettrodi, perché forse potete rendervi conto che se io sono povero, almeno due elettrodi ce li devo avere, quindi se no non studio la trasmissione sinaptica. Quindi almeno due devono esserci. Ogni volta che li affondo e idealmente riesco a beccare due cellule, le tengo stabilmente, riesco a fare, ho che con $n = 2$ ho due possibilità. Potrei avere che A è collegato a B oppure che B è collegato ad A. Ho anche tutte e due, ma diciamo concettualmente sono due possibilità. Mi sapete dire cosa succede quando $n = 3$? Quando ho 3 elettrodi e quindi posso studiare 3 cellule alla volta, che possono per i cavoli loro essere collegate, quindi qual è il numero di possibilità? La probabilità, ve l'ho già detto, è molto bassa. In corteccia la probabilità di connessione è dell'ordine del 10%, 0.1, che vuol dire 10%. La probabilità è un numero fra 0 e 1 e quindi mi piace esprimerlo come 0 e 1. Se ne ho tre, vuol dire che ogni volta mi devo mettere su un elettrodo, su una cellula, e ho due **target**. Poi salto e ho due **target** e lo faccio n volte, lo faccio tre volte. Vedete quante possibilità ci sono? E per 4, per ognuno mettete su e avete $n - 1$ possibilità perché voi siete già... potreste studiare le **autapsi** che sono sinapsi che il neurone si fa da solo, ma non necessariamente sono... esistono e sono importanti anche nella corteccia, ma non hanno, diciamo, non si vedrebbero con questo tipo di tecnica elettrofisiologica. $n \cdot (n - 1)$. E se vedete qui 12 rispetto a 2 è un ordine di grandezza, è un fattore 10 circa. Quindi se avete 4 elettrodi non lasciate la scienza perché più o meno ogni volta che mettete gli elettrodi dentro 4 cellule qualcosa trovate, a meno che non siano molto molto distanti perché ovviamente questa probabilità potrebbe dipendere dalla distanza. Se ne avete due avete necessità di sudare parecchio. Per questo che questo **dataset**, questo articolo e poi i dati che ha generato è stato molto importante. E con 10 elettrodi potete pensare che avete $10 \cdot 9$ (scusate, sono 12, il **record** del mondo è 12, quindi sono $12 \cdot 11$ possibilità), quindi lì è praticamente sicuro che ci siano diverse connessioni. Quindi in una botta sola, 12, riuscite a studiare un sacco di sinapsi simultaneamente.

Quindi questo è solo per farvi vedere, al di là dell'aspetto di cosiddetta **connettomica**, campo di ricerca relativamente recente, giovane, degli ultimi 20 **anni**, in cui la gente riesce o vorrebbe avere il diagramma circuitale delle connessioni di un pezzo di cervello. In questo caso il **connettoma**, identificato con questo modo, a forza bruta, era solamente fra il neurone 1 e il neurone 3. Sorprendente-

mente era una connessione bidirezionale. Mi sapreste dire qual è la probabilità che questo accada, supponendo che non ci sia un favoritismo, è sbagliato dirlo, che non ci sia una predominanza di sinapsi bidirezionali? L'informazione di cui avete bisogno è questa. Ed è la probabilità che ci sia una coppia e che ci sia l'altra connessione. Ricordate la storia della congiunzione e disgiunzione delle probabilità. È facile o difficile trovare, se il 10% è di beccare una coppia, di beccarla reciproca? Potreste dirmi che no, è proprio quella la scoperta, che esiste una sovraespressione delle sinapsi bidirezionali, quindi che più oppure viceversa, una sottoespressione. Risposta. Ma se voi pensate che sia semplicemente che non ci sia alcuna dipendenza (io proietto verso di te e tu proietta verso chi vuoi), stai proiettando verso di me, ok, non c'è una ragione per cui se io stabilisco una sinapsi con te perché siamo entrambi piramidali e io sono vicino spazialmente, allora anche tu mi contatti. Se fossero eventi indipendenti, quanto sarebbe la probabilità? Perché sarebbe che lei ha fatto $0.1 \cdot 0.1$, giusto? Sì. Quindi è un numero molto piccolo e tutta questa storia di questo specifico articolo è che è più frequente rispetto all'1% trovare le sinapsi bidirezionali in corteccia e hanno anche altre proprietà.

Ora, fatemi concentrare sulla trasmissione sinaptica chimica e poi ritorno brevemente sulla trasmissione sinaptica elettrica. Ho già introdotto una terminologia, parlando di **potenziale sinaptico**, semplicemente perché non è un potenziale d'azione, non c'è nulla da capire. Si chiama **potenziale sinaptico** l'eco che viene causata nel neurone post-sinaptico ricevente quando c'è uno **spike** nel neurone pre-sinaptico. E si parla di potenziale **P** oppure corrente **post-synaptic current**, **PSC** eccitatoria (quindi **Excitatory Post-Synaptic Current**, **EPSC** oppure **Excitatory Post-Synaptic Potential**, **EPSP**). È ovvio che io sto considerando e sto causando delle correnti. I canali sono in effetti, attraverso un cambio di conduttanza, di permeabilità, danno luogo a una corrente ionica, quindi in effetti sono correnti. Però se io ho il mio elettrodo misuro il potenziale e sarà la cellula con $C \frac{dV}{dt}$ a integrare quella corrente sinaptica. Quindi io vedo un **blip**, vedo una specie di cambiamento e quello lo chiamo potenziale, però concettualmente sono correnti, anzi più correttamente si dovrebbe dire un **cambiamento di conduttanza**. E questo cambiamento di conduttanza può essere eccitatorio-inibitorio.

La storia di eccitatorio-inibitorio vuol dire soltanto che questi canali qui hanno un **potenziale di inversione** più positivo o meno positivo rispetto al potenziale di riposo. Vi rammento la formula della corrente, sempre nel mondo ohmico: $I = G_{\max} \cdot x \cdot (E - V)$. C'è una conduttanza massima, c'è una qualche frazione di canali, ok, questi sono canali ligando-dipendenti, ok, sempre la solita cosa, e poi c'è la **driving force**, $E - V$. Questa roba qua dipende se E è maggiore di -70 o minore di -70 . Se è **0 millivolt** o **20 millivolt**... Quando questa roba qua è una roba che cambia da 0 e varia fra 0 e 1, questo si attiva, questo nel tempo probabilmente fa qualcosa del genere, si attiva e poi si disattiva. Interpreto questa salita e questa discesa. Poi ovviamente la parte del leone la farà la conduttanza. Se la conduttanza è molto grande avrà un impatto in termini di corrente molto notevole, ma il termine cruciale è questa roba qua. Dove si trova V ? In effetti dove si trova V in quel momento? Se V stava a riposo, quindi se questo era **-70 millivolt**, se questo potenziale di inversione E è **0 millivolt**, $0 - (-70)$ è un numero positivo, la corrente è positiva, è un effetto depolarizzante, un effetto eccitatorio. Se invece questa quantità non era 0 ma era -60 o -80 , supponi-

amo -80 , quindi inferiore a -70 **millivolt**, adesso $(-80) - (-70)$, quindi -10 . Dovete solo fare attenzione al segno. Quindi avete una corrente che è negativa, una corrente iperpolarizzante, una corrente che sfavorisce l'attraversamento di una soglia e quindi l'emissione di potenziale d'azione. Quindi è una sinapsi inibitoria. È il recettore postsinaptico che comanda, che dice chi è.

Poi in effetti c'è una consuetudine che in neuroscienze viene chiamata legge, però non sappiamo effettivamente se è una legge, anzi ci sono delle eccezioni, che si chiama **legge di Dale**, che dice che se io prendo un neurone, il neurone rilascia sempre lo stesso neurotrasmettitore. Particolarmente per i vertebrati è sempre vera, quasi sempre vera. Cioè, se io prendo questo neurone, o rilascia **Glutammato** o rilascia **GABA**, non rilascia tutte e due. Negli insetti e in altre bestie può essere diverso. Quindi sembra che... Se tu sia eccitatorio o inibitorio, e comunque è una roba del potenziale di inversione, quindi è una roba di **Nernst**, di quella particolare specie ionica per cui quel canale ligando-dipendente è permeabile, ma dipende dall'identità. Quindi se rilasci **Glutammato**, rilasci **Glutammato** per tutte le tue proiezioni. Oppure se rilasci **GABA**, rilasci **GABA** a tutti. Quindi se io ho diverse, il mio assone proietta, si dirama, sono tutti che vengono sputacchiati dello stesso neurotrasmettitore. Non è che a uno è eccito e a uno inibisco. Per lo meno non in termini del rilascio di neurotrasmettitori.

Tipi di Recettori Sinaptici e Modello Circuitale Equivalente

C'è poi un'importante distinzione fra i recettori. Credo che questa cosa qua dovrete averla vista. La prima cosa era questa, che dipende dal potenziale di Nernst. Sì, è vero che il **Glutammato** è associato prevalentemente o quasi esclusivamente alle sinapsi eccitatorie. Il **GABA** fa eccezione perché alle volte durante lo sviluppo ha un effetto eccitatorio, depolarizzante.

E l'altra cosa che forse adesso, alla luce di tutto il... di quanto vi ho bombardato sui canali ionici, di come si modellano, di come si descrivono, potrebbe essere una passeggiata. Ed è la seguente differenza: ci sono recettori **ionotropici** che sono dei pori. Sono esattamente quelli che vi ho raccontato: c'è il ligando che si attacca in un certo particolare punto nella parte extracellulare e la conformazione cambia e si crea un poro e gli ioni che per i cavoli loro erano lì a cui questo canale è sensibile, è selettivo, in virtù del gradiente elettrochimico che c'era e caratterizza quel tipo di ioni, fluiscono o attraversano il canale o da fuori a dentro o da dentro a fuori.

Nota, la storia del ligando che si attacca a un particolare sito è sfruttata per i psicofarmaci. Quando voi, spero di no, prendete **benzodiazepine** o altri farmaci neuroattivi che hanno un'azione veloce, voi state attaccando, state mimando, non necessariamente nello stesso sito di legame, l'effetto di un neurotrasmettitore che non c'è. Io prendo **benzodiazepine**, **Xanax** e l'effetto è quello che avrei se si fosse legato un particolare neurotrasmettitore che sarebbe il neurotrasmettitore **GABA**.

Nel caso dei recettori sinaptici prendono il nome dalla sostanza chimica che per la prima volta è stata vista aprire questi canali. Per esempio per i recettori **Glutamatergici** ci sono due importanti esempi. Uno si chiama recettore **AMPA**

(**AMPA** è un acronimo, non mi ricordo che cosa vuol dire, ha un nome molto lungo). Un altro si chiama **NMDA**. Voi potete trovare in commercio una boccetta di **AMPA**, non di **AMPA receptor**, ma di **AMPA**, che se la prendete e la versate su dei recettori **AMPA**, questi recettori si aprono perché questi sono **agonisti**. L'**AMPA** è agonista di questo recettore **AMPA** e il **Glutammato** è pure agonista. Agonista vuol dire che tende a favorire l'apertura. Ci sono altrimenti dei bloccanti che si chiamano **antagonisti**. Per il **GABA** invece si chiamano... questi recettori si chiamano **GABA A**, di tipo A. Quindi hanno un altro tipo di male... le **benzodiazepine**, aprono i recettori **GABA**.

C'è un altro tipo però di recettore che si chiama, non è **ionotropico**, ma è **metabotropico**. E **metabotropico** fa pensare a cascate di reazioni metaboliche dove non necessariamente ha a che fare con il consumo energetico, ma ha a che fare con una cascata di **step**, perlomeno così è come lo... perché c'è un consumo potenzialmente energetico ma non è necessariamente quello. In cui, cioè, il legarsi della molecola di neurotrasmettitore in un particolare dominio nella parte extracellulare del canale non accende direttamente un poro, non fa formare un poro. Adesso vi faccio vedere un'animazione in cui un cambiamento di conformazione di questa, che comunque è una proteina di membrana (quindi ha una parte di dominio fuori, in mezzo e dentro), si muove e questo movimento attiva una cascata di reazioni intracellulari, in particolare attiva una proteina che viene chiamata **G-protein** nella parte intracellulare. Questa **G-protein**, la vedete fra poco, diciamo inizia a interagire con un canale potassio, che per i fatti suoi è lì, vicino, e lo attiva.

Potete immaginare che mentre un canale **ionotropico** immediatamente mi attacco e si forma il poro ed esce la corrente, un canale **metabotropico** forse impiega qualche millisecondo, decina di millisecondi in più, perché la conformazione cambia, questa **G-protein** si attiva, si sposta, va a dare fastidio al canale potassio che è vicino, legandosi dalla parte intracellulare e il canale potassio si apre. Adesso l'ho banalizzata e sembra rapido. Può essere particolarmente lungo.

Questa è l'animazione.

Video 1: GABA-A Receptor

In questo video, abbiamo esplorato il **GABA-A receptor**. È un complesso importante proteine per ricevere i segnali di inibitore dei altri neuroni. Questo **receptor** può essere trovato in **the membranes of the postsynaptic neuron**. **The inhibition works by changing the membrane potential. The membrane potential is given by the difference of the ion concentration between the extracellular space and the cytoplasmic side. You can see the ion concentrations here. The concentration of each ion varies depending on the location. The chloride ions are relevant for the GABA-A receptor. Their concentration is higher in the extracellular space. The number of green ions floating around here is about accurate. The cube marks an area of 10x10x10 nanometers. That volume of extracellular space would be expected to hold about 70 chloride ions. Let's focus back on the GABA-A receptor. This receptor consists of 5 subunits, 2 alpha, 2 beta, and 1**

gamma subunit. Questo è il più **common**, ma altre **subunit** configurazioni sono disponibili. Quando il **presynaptic neuron floods** il **synaptic cleft** con **GABA**, then **GABA can bind to** il **receptor**. Il **change conformation slightly**, thereby permettendo di **chloro di ions** riusciano il cello. Il **opening** del **channel** è **short-lived**. Il **excesso GABA** è stato fatto da **GABA transporters located on the surrounding cells within milliseconds**. The **GABA that is associated with the receptor can also leave the binding pocket again**. Thus the **channel closes, ready for the next signal**. Grazie.

Può essere neuroattiva, potrebbe funzionare o interagire con i canali o con il tessuto nervoso in modi diversi, potrebbe lasciarlo aperto un po' più a lungo, eccetera, eccetera. Una cosa che non ho detto è che normalmente il neurotrasmettitore, una volta che l'ha detto lui, una volta che finisce di questa interazione, che comunque è un legame, non c'è nulla di magico, non è che "adesso sono legato, adesso ti espello," o diffonde via nello spazio extracellulare, oppure viene ricatturato dal bottone sinaptico, o soprattutto viene ricatturato dalle **cellule gliali**, che è un'altra famiglia di cellule importantissime del cervello, anche in alcune specie più numerose dei neuroni, di cui non parliamo in questo corso.

Video 2: GABA-B Receptor

In last week's video we took a look at the GABA A receptor. This time we'll focus on the GABA B receptor. The name is similar, but as you can tell just by looking at the structure alone, the way they work is very different. GABA A is a ligand-gated ion channel. GABA B, on the other hand, is a G-protein coupled receptor. This animation focuses on the GABA-B receptor located in a synapse of a postsynaptic neuron. However, GABA-B receptors can also be found in other locations where they perform different functions. While GABA-A receptors use chloride ions to modulate the membrane potential, GABA-B has this effect by changing the potassium ion concentration. Potassium is positively charged and is more abundant in the cytoplasm compared to the extracellular space. Therefore, releasing potassium into the extracellular space makes the cytoplasm more negatively charged. Let's have a look at the structure of the GABA-B receptor. The receptor has two subunits, subunit 1 and subunit 2. These two subunits are held in close proximity by coil-coil domains in the cytoplasm. Quando la neurotransmitter GABA floods la synaptic cleft, GABA can bind to la binding pocket of subunit 1. This changes the conformation of both subunit 1 and 2. A G-protein can bind to subunit 2. The G-protein consists of subunits G-alpha, G-beta, and G-gamma. Lipid modifications on the alpha and gamma subunits allow the proteins to be anchored to the cell membrane. When the G protein binds to the receptor, GDP and G alpha can be replaced with GTP. This activation causes the G protein to leave the receptor, and

G alpha separates from G beta and G gamma. In this step, a signal amplification can take place as one receptor can activate multiple G proteins. $G\beta\gamma$ can then diffuse along the membrane and bind the potassium channel GIRK. GIRK is a tetramer and has four binding sites for $G\beta\gamma$. By binding, the $G\beta\gamma$ facilitates the opening of GIRK. Potassium ions can flow out of the cell. The channel is deactivated when $G\alpha$ hydrolyzes its GTP and picks $G\beta\gamma$ back up. La final cosa che voglio toccare è la desensitizzazione GABA-B. Il KCTD12 può essere basato a subunit 2 del receptor.

Tutte queste cose in più è perché questo meccanismo di una cascata di eventi ha naturalmente (questo è il modo filogenicamente più antico, negli invertebrati molte cose funzionano così) automaticamente **gratis** una specie di **feedback** negativo. Quando ci sono tante **G-proteine** attivate, allora ci sono dei segnali che tendono poi a spegnere oppure ad autoamplificare. È una cosa molto interessante che la biologia molecolare abbia inventato degli amplificatori, oppure quindi un'amplificazione a **feedback positivo o negativo**, che in elettronica vengono utilizzati per fare computazione. Qui in particolare è, magari c'era solamente un pochino di **GABA** e io voglio amplificarlo e lo posso amplificare con questa cascata di reazioni intracellulari, ma a un certo punto voglio fermarmi, voglio inattivarli perché magari è troppo che sto tenendo inibita la cellula e di nuovo ci sono meccanismi che sono dei **feedback negativi**, tendono a bloccare questa attivazione della **G-protein**.

Ci fermiamo per 10 minuti.

Allora, il messaggio che dovete stamparvi nella testa è fondamentalmente questo. Per eccitatorie (e ci sarà un'altra **slide**), inibitoria, conta il **potenziale di inversione di Nernst** della specie ionica a cui quei canali ionotropici o metabotropici, non direttamente, indirettamente, sono permeabili. Se questa è più depolarizzata rispetto al potenziale di riposo, allora è un effetto depolarizzante eccitatorio, altrimenti inibitorio.

E quindi questa trasmissione sinaptica eccitatoria può essere **rapida**, nel caso delle sinapsi eccitatorie, **rapida** e sono i recettori **AMPA**. Oppure può essere un pochino più **lenta**, ma sono sempre **ionotropici** e sono... ok, no, qui era da dire no, quelli rapidi sono i **ionotropici** perché leggo il neurotrasmettitore, si apre il poro ed è finito. Nel caso **metabotropico** è molto più **lento** perché i recettori attivano una proteina, una cascata intracellulare che attiva un canale ionico eccetera eccetera. Quindi la differenza è **rapido**. Rapido vuol dire che l'attivazione dell'ordine di una frazione di millisecondo. Quindi qui c'è lo **spike** presinaptico e qui c'è il potenziale di membrana postsinaptico, si può scrivere spesso V_{post} , questo sarebbe V_{pre} . Dopo un certo ritardo questo va su molto rapidamente e l'attivazione viene, la cinetica di spegnimento è rapida. Qui la costante di tempo è dell'ordine di 1 – 5 millisecondi per i recettori **AMPA**, sono recettori **glutamatergici**. Mentre ci sono altri recettori sempre però **ionotropici** che vedremo perché sono interessanti, sono importantissimi specie per la memoria, in cui questa coda è un pochino più **lenta**, però lenta nell'ordine di 50 – 100 **millisecondi**. Questi si chiamano **NMDA**.

Mentre ci sono dei recettori **metabotropici** molto più **lenti** in cui questa roba

qua diventa centinaia di millisecondi, cioè qui l'attivazione tende a restare su e ad andare molto lentamente a zero. Questo è dell'ordine di, supponete, 500 o 1000 **millisecondi**. Questi si chiamano, per esempio nel caso del **Glutammato**, con immensa originalità di nomi, si chiamano **GLUMR**. Recettore **Glutamatergico Metabotropico**. È facile da ricordare. Ok, un altro recettore importante, particolarmente perché è quello che è legato anche alla **giunzione neuromuscolare** (questa cosa qua del rilascio chimico fa funzionare i muscoli, ed è quindi una cosa che credo che dal punto di vista evolutivo sia stata così **successful**, dal punto di vista del movimento, della trasduzione elettromeccanica, è diventata onnipresente dal punto di vista elettrico di trasmissione dell'informazione del segnale). Quindi i recettori dell'acetilcolina si chiamano **acetylcholine receptor**, con massima originalità. E tutti questi qui, anche se sono... Questo vuol dire che è attivato da una sostanza che si chiama **AMPA** oppure anche da **Glutammato**. Questa è una sostanza che si chiama **NMDA** oppure da **Glutammato** e questa è una sostanza che si chiama **acetilcolina** ed è **acetilcolina**. Non mi ricordo il nome di alcuni agonisti selettivi. Alcuni si chiamano competitivi, competitivi perché competono con il neurotrasmettitore endogeno giusto per i recettori acetilcolinergici. Non mi ricordo se ci sono delle sostanze, sicuramente ci saranno. E ci sono delle sostanze che li bloccano, ma non ve ne parlo.

Mentre quelli **metabotropici** avete, scusate la M va prima, è **mGLUR**, non **GLUMR** ma **mGLUR** (**Metabotropic Glutamate Receptor**), scusate. Per le sinapsi inibitorie **GABAergiche**, è più semplice. C'è **GABA A** e **GABA B**. **GABA B** è **metabotropico**. Più o meno le costanti cinetiche sono simili. Il **metabotropico** è dell'ordine di decine, centinaia di millisecondi. Il **GABA-A** è dell'ordine di qualche millisecondo, un po' più lento dell'**AMPA**.

In questo caso, tutti questi recettori (questo recettore della **glicina** è rappresentativo del sistema nervoso centrale nel midollo spinale ed è attivato da un neurotrasmettitore che si chiama **glicina**, perché nel sistema nervoso periferico non c'è **Glutammato**, **GABA** o comunque ci sono altri neurotrasmettitori che sono importanti). Sto avendo il dubbio se lo **spinal cord** debba essere chiamato **central nervous system** e non **peripheral nervous system**. Credo che debba essere chiamato **central nervous system** e **peripheral nervous system**, sistema nervoso periferico, è la periferia, non il midollo spinale. Comunque è tipico del midollo spinale questo recettore **glicina**.

In tutti i casi, questi recettori o il canale che poi è attivato dal cambiamento conformazionale del recettore **metabotropico**, sono tali per cui sono sensibili, selettivi a una specie ionica il cui potenziale di inversione Nernstiano è minore del potenziale di riposo ed è per questo che sono iperpolarizzanti, **alias** inibitori. Non è perché questa molecola, il **GABA**, il neurotrasmettitore **GABA** è particolare, scusate, il neurotrasmettitore è particolare, è il recettore che la dice tutta.

Come si fanno a combinare i due mondi, il mondo elettrico dell'equazione di bilanciamento della carica con la storia della trasmissione sinaptica? Nulla di più semplice: è come se aveste tanti rami, quante sono le specie ioniche o i canali ionici selettivi a diverse specie ioniche, canali ionici dello stesso tipo. Qui ci sono i canali ionici **fast inactivating** selettivi al sodio, qui ci sono i **delay rectifier** selettivi al potassio, qui ci sono i canali cloro che non sono voltaggio-dipendenti.

Un altro ramo, e quest'altro ramo non ha necessariamente questa freccetta che graficamente vuol dire: “Guarda che il valore di questa resistenza o conduttanza, che è la stessa cosa, cambia nel tempo dipendentemente dal potenziale.” Qui cambia nel tempo dipendentemente se c'è o no un neurotrasmettitore nel **cleft**, nello spazio intersinaptico. Se c'è, allora questi recettori iniziano ad aprirsi, se non c'è, stanno chiusi. Quindi qui questa conduttanza e alla fine questa corrente, questa grandezza qua, avrà uno schema cinetico, aperto, chiuso, che vediamo adesso.

Quindi nulla di più semplice, paradossalmente nel contesto di quello con cui vi ho ossessionato fino adesso, della storia in particolare con descrizione ohmica, che è più che adeguata per questo tipo di correnti, nel caso della trasmissione sinaptica chimica.

Per quella elettrica?

Per quella elettrica è sempre la stessa cosa, però nel senso che anche lì cambio, metto un ramo in più, però qui poi non avete fatto, non avete battuto ciglio del fatto che c'è anche una batteria, un generatore ideale di tensione, che è il potenziale Nernstiano della specie ionica per cui quel particolare canale ligando-dipendente è selettivo, a cui è selettivo. Nel caso delle sinapsi elettriche è un po' diverso perché qui queste **connessioni** potrebbero essere selettive a diverse specie ioniche, magari a più ioni potrebbero avere una selettività meno spiccata e semplicemente essere permeabili a diverse specie ioniche. Avete una qualche intuizione? Letteralmente è un pezzo di filo.

Avete una qualche intuizione di quella che potrebbe essere l'espressione per descrivere la corrente dovuta a una **gap junction**? Innanzitutto, come detto, è una cosa che interessa sia il neurone (lo chiamo) presinaptico che quello postsinaptico. In realtà non c'è una grossa distinzione, nel senso che sono entrambi istantaneamente **pre** e **post**. Quindi in qualche modo io ho un'equazione di bilanciamento della carica per il neurone 1 (questa sarebbe la corrente dovuta alla **gap junction**), e poi ho un'altra equazione (sto trascurando i vari termini su sodio, potassio, cloro, **leak**, bla bla). Qui mi dovrete dire che cosa diavolo ne metto? Ripeto, qua avete una membrana, avete un resistore e avete un'altra membrana. Ve lo faccio ancora più esplicito. Qui il potenziale ai capi di questa membrana è V_1 e qui è V_2 . Com'è l'espressione di questa corrente? Cosa devo mettere qui nell'altro? Bravo, perfetto. Esatto, esattamente.

E qui fondamentalmente questa differenza di potenziale, letteralmente qui sarebbe da qua a qua, sì è vero, dovrei fare **Kirchhoff**, la legge delle maglie, però lo vedo a occhio che qui è $V_1 - V_2$. Questa differenza ai capi di questo resistore è $V_1 - V_2$. Il vostro collega ha semplicemente invocato **Ohm** e ha detto che sì, la corrente dentro un resistore è questa differenza diviso R . Non stava necessariamente pensando al verso della corrente, però se io faccio le cose con tutti i crismi, immaginando, ricordando la convenzione degli utilizzatori, per cui se io prendo questa freccia, questo potenziale positivo in questo senso, allora la **legge di Ohm**, $V = R \cdot I$, oppure $I = \frac{V}{R}$, è positiva in quest'altro senso. Quindi, qui, visto che la corrente è entrante, io questa cosa qua scrivo, effettivamente scrivo:

$$I_{\text{gap}} = \frac{V_1 - V_2}{R_{\text{gap}}}$$

dove R la chiamiamo R_{gap} . Credo che adesso apparirà R_{gap} . E quassù però, vedete, qui entra nel neurone 2, qui sta uscendo dal neurone 1, quindi io qui devo mettere la stessa corrente col segno meno. Metto la stessa corrente a parte il segno meno.

Poi mi faccio prendere dalla mia solita paranoia e dico: “Aspetta, io sono... è vero che qui ho un’equazione differenziale in cui la variabile di stato qui compare col segno ok e qui è vero che ok perché c’è il segno meno, quindi non mi fa esplodere, non mi fa uscire fuori degli esponenziali, degli esponenziali positivi che esplodono.” E da qua vedo due cose: la prima è che c’è questa simmetria, alla fine è lo stesso termine a parte il segno meno, ma il fatto che la sinapsi sia eccitatoria o inibitoria (perché questo termine qui e o questo termine qui, chiaramente non possono essere simultaneamente, questo sia positivo o negativo) dipende da cosa stavano facendo quei due neuroni, V_1 , perché $V_1 - V_2$. Se i due neuroni sono per esempio sincronizzati nell’emissione dei loro potenziali d’azione, se fossero esattamente due cellule esattamente identiche e esattamente sincronizzate, questo termine non ci sarebbe più, perché dipende dalla differenza. Quindi se due neuroni sono esattamente sincronizzati, a spanne (perché ovviamente saranno diversi, avranno necessariamente delle capacità diverse, avranno delle superfici leggermente diverse, avranno delle conduttanze sodio, potassio, eccetera, non sono esattamente la stessa cosa), però se lo fossero, due neuroni esattamente sincronizzati che fanno la stessa cosa per i cavoli loro, non si influenzano più da una **gap junction**.

Viceversa, e questa è la cosa che è facile da capire una volta che ricordate la **legge di Ohm**, che quindi è utile anche in biofisica e in biologia, se $V_1 - V_2$ è positivo, allora la sinapsi per questo neurone 2 è eccitatoria, perché la corrente tende ad essere positiva, tende ad essere depolarizzante, invece nell’altro neurone è l’opposto. Ma basta che V_1 sia invece minore di V_2 , le cose cambiano. Quindi qui effettivamente, io le sto attaccando, diciamo, con il circuito equivalente, si vede forse meglio, però alla fine anche con i due **blob** spero che possiate digerirvelo senza troppe obiezioni. E qui non ho un potenziale di **Nernst** perché alla fine si comporta più come un **continuum** fra il citoplasma di un neurone e il citoplasma dell’altro neurone.

Quindi il **senza segno** adesso lo capisco perché dipende dal segno, può essere positivo o negativo, dipendentemente dall’attività in quel momento. Il fatto che sia **bidirezionale** lo vedo perché non posso scappare se tu mi stai facendo una **gap junction** e io la faccio a te e abbiamo le **connessine** allineate. E il fatto che sia **lenta**, questo non si vede subito facilmente, a meno che voi non siate degli esperti elettrotecnici per cui potreste dire: “Fermo, qui c’hai la capacità e qui c’hai la resistenza, da qualche parte hai RC .” Quindi questa roba qua se è dell’ordine di decine di millisecondi è più lento del recettore **AMPA** che ho cancellato adesso che andava su rapidamente, andava su in una frazione di millisecondo. Qui quello che fa un filtraggio, quello che condiziona l’accoppiamento di segnali sono le proprietà **RC** di questo accrocchio. Questo accrocchio qui è un **RC**. Cioè, se io qui immagino di avere un qualche segnale interessante, sì, lo vedo a un certo punto qui, ma io ho una resistenza qui e un condensatore qui. Quindi se considerate uno dei due neuroni un generatore di segnali, scoprite che il potenziale di membrana nell’altro neurone è nella versione **low-pass**, filtrata, **passa basso**, semplicemente per le proprietà capacitive e resistive di questo

accrocchio. Quindi io qui posso essere veloce quanto voglio, però questo è lento a integrare segnali, particolarmente perché questa resistenza di **gap** è molto grande, nel senso che le **connessine** non sono dei pori eccellenti.

E infatti abbiamo visto qui che era piuttosto piccolino l'eco, questa era una roba di forse 2 **millivolt**, quindi sì funziona, però non è che questa cinetica è particolare, riflette quello che è la cinetica del primo neurone nel caso degli **spike**, che quando il secondo neurone dovesse avere, in questo caso sono io che gli inietto una corrente negativa e lui va giù. Caspita se va giù lentamente e questo tizio segue, segue molto ridotto con un fattore, si chiama **fattore di accoppiamento**, molto basso, non è uno a uno, queste **connessine**, questa resistenza non è zero, ed è lento quanto la membrana è lenta a integrare i segnali.

Quindi probabilmente l'evoluzione ha favorito lo sviluppo o la costituzione, particolarmente forse per la **giunzione neuromuscolare**, che funziona (la **giunzione neuromuscolare** richiede che non ci sia necessariamente, già ma sì, è necessaria una prossimità geometrica fra il bottone sinaptico e il muscolo), però non è detto che debba essere il muscolo a esprimere le stesse **connessine**. Sono io che ti sputacchio **acetilcolina** e tu ti contrai perché hai recettori **acetilcolinergici**. Ed è più veloce. Forse la trasmissione sinaptica chimica è stata adottata proprio perché è molto più rapida di questa e quindi siamo forse, molti di noi, meglio degli insetti.

Questo è esattamente la stessa formula e notate che io sono... qui ho semplicemente scritto l'equivalente circuitale di **Thevenin** senza curarmi del fatto che sia canali sodio, potassio eccetera. La cosa che mi tranquillizza è che questa variabile di stato, come detto, compare qui anche con il segno meno e questo anche qui compare ed è un altro segno meno. Questo è un modo, se non riuscite a ricordarvi questo aspetto elettrotecnico, potete ricordarvi che io invece mi agito se fate degli esponenziali che esplodono, perché qui non deve esplodere nulla, è un sistema dissipativo, non c'è nulla che si autoalimenta che può amplificarsi. Qui l'amplificazione non c'è. Quindi il termine di corrente sinaptica in questo caso di nuovo anche lui diventa un arco... scusate un ramo in questo circuito. Non ha il potenziale di **Nernst** ma ha il potenziale di entrambi i neuroni, quindi dipende da **pre** e **post**.

Prima di raccontarvi questa storia, volevo insistere e dire: se siete coraggiosi potreste provare a implementare non uno dei modelli di **Hodgkin-Huxley**, due. Semplicemente copiate, incollate e cambiate il nome delle variabili. Qui non l'ho potuto chiamare V e V , se no avreste detto: "Ma è lo stesso V ." Quindi potreste provare a prendere due neuroni **Hodgkin-Huxley** indipendenti e accoppiarli con una sinapsi elettrica. Potreste scoprire che se iniettate in entrambi questi neuroni, per esempio la stessa corrente, ma usate delle condizioni iniziali diverse, se la conduttanza **gap** fosse zero (quindi non si parlassero i due neuroni), vedreste i due **spike train** fuori fase. Appena attaccate questo, quindi quando rifate la simulazione con questo, vedreste che progressivamente nell'arco di pochi **spike**, forse uno o due, i neuroni si sincronizzano. Il motivo per cui negli invertebrati, in particolare (l'ho detto a una vostra collega, mi sono scordato di dirlo), i cardiomiociti del cuore funzionano così con le **gap junction** e qual è il motivo? Devono essere ultra sincronizzati per contrarsi allo stesso momento. Sì, è vero, ci sono delle contrazioni spazialmente distribuite, sfruttate per esempio

dai **pacemaker** che fanno contrarre una parte e poi l'altra, se no il cuore non avrebbe l'effetto di una pompa, se fosse tutto sincrono. Ma al di là di questo aspetto di propagazione e che è anche legato all'attivazione dei nodi, quindi del sistema nervoso del cuore, il tessuto deve reagire come un **unicum**, benché sia fatto da cellule distinte. Per questo che ci sono queste **gap junction**.

E nel caso sperimentale che vi ho detto all'inizio, in cui ma forse solo gli invertebrati, ma ok, forse anche i vertebrati, però solamente nelle fasi iniziali dello sviluppo. No, anche nell'adulto ci sono in particolare sottopopolazioni di neuroni identificati, in particolare sono delle famiglie di **interneuroni**, quindi di neuroni **GABAergici** che sputacchiano **GABA**, e quindi presumibilmente hanno un effetto, quando loro sono eccitati, inibiscono gli altri, sono connessi da **gap junction** probabilmente perché l'inibizione, oltre ad avere un ruolo di elaborazione dell'informazione, è molto sottile che adesso non vi sto a raccontare, ma non è semplicemente che tutto lo fa l'eccitazione e l'inibizione serve solo a evitare che ci siano crisi epilettiche. Però da quella interpretazione del contenere l'eccitazione alla fine è un freno l'inibizione. Potrebbe essere utile avere che seppure spazialmente distribuite, nella mia corteccia sono diversi millimetri in tutte le direzioni, non è che tutti i neuroni inibitori sono lì in quel punto, sono distribuiti, potrebbe aver senso che debbano comportarsi globalmente allo stesso modo, debbano cioè essere sincronizzati.

Un termine che viene usato da alcuni ricercatori è che l'inibizione possa funzionare come un **blanket**, un piumino, una coperta, una coperta che quindi abbia istantaneamente un effetto su tutta una rete. Immaginate che punti diversi della vostra corteccia visiva rappresentino attivandosi punti diversi del mondo. Io adesso a parte vedo le vostre facce illuminate, le vedo distinte. Adesso dico una cavolata che però potrebbe non essere così stupida. Se in particolare, anche senza fissare uno di voi, se uno di voi particolarmente non lo so, dico: "Caspita, io questo devo averlo incrociato al supermercato l'altro giorno," può essere che per questo effetto di aumento del contrasto, che vuol dire, nella mia corteccia, visto che sulla retina siete in punti diversi, anche nella mia corteccia visiva siete, per la **retinotopia** siete distribuiti, siete rappresentati in punti diversi, le vostre faccine. Potrebbe essere che se io ho un'inibizione complessiva, globale, non locale, ma globale, posso fare, diciamo, spuntare, per esempio, quello di voi che ha la faccia più bianca, pallida (perché adesso sto in una stupidaggine), perché magari riflette meglio, non lo so, perché avete preso meno sole, non lo so, perché non lo so. In questo caso l'effetto dell'inibizione mi fa spegnere tutti i competitori, tutti questi **foci** di eccitazione e mi fa magari vincere il più importante, quello che dal punto di vista computazionale viene immaginato (non è detto, diciamo non sempre esiste, non si sa se esiste esattamente questo meccanismo), viene chiamato **winner takes all**, che sì è una canzone di **ABBA** [sic - **ABBA**], non un'equazione, magari fosse un'equazione di **ABBA**, ma vuol dire che è un metodo per aumentare il contrasto e soltanto il più forte vince perché gli altri vengono soppressi. Per fare questo mi serve un'inibizione che sia comune globale, anche se io ho un neurone inibitorio e ce l'ho qua. No, io voglio che tutti i neuroni inibitori siano sincronizzati. Non sto dicendo che le **gap junction** abbiano questo come un unico ruolo, la gente non lo sa. In particolare quel tipo di popolazione di **interneurone** inibitorio ha sia **gap junction** che sinapsi chimiche fra di loro e quindi è un gran casino e quindi **bottom line** non lo sappiamo.

Una cosa interessante, quindi per cercare di legarlo a qualcosa di ingegneristico che oltre all'aspetto chiaramente modellistico, matematico, di descrizione, di meccanismo, vorrei presentarvi rapidissimamente un concetto che va nella direzione di questa **connettistica**. Come per le sinapsi chimiche, ha un'importanza enorme il riuscire a capire qual è il diagramma di connessione e questo si fa in un modo a forza bruta, difficilissimo, mettendo un sacco di pipette, facendo sparare un neurone, vedendo l'eco degli altri e così via. Quando c'è una connessione, io so che c'è una connessione anatomica, quando vedo l'eco, quando vedo per esempio un potenziale eccitatorio post-sinaptico o inibitorio post-sinaptico.

Nel caso delle **gap junction** posso immaginare che, di considerare lo **steady state**. E se io inietto una corrente qua, se io qui ho una pipetta, se qui in mezzo c'è solamente un salto, quindi non c'è una catena di cellule connesse con una **gap junction**, io potrei essere collegato a questa cellula, ma in mezzo... e se ce ne altre due. Io l'unica cosa che faccio è metto un elettrodo in uno, un elettrodo in un altro, depolarizzo, iperpolarizzo e vedo che in entrambi i casi ho un accoppiamento, ma non so se è un accoppiamento debolissimo oppure un accoppiamento... quindi è debolissimo perché le **connessioni** sono poche, oppure è debolissimo perché in mezzo, e io non le vedo anatomicamente, ce ne sono altre due di cellule che sono intermedie.

E intuitivamente, io questa è una roba che capisco qua. Qui ho solo questa conduttanza di questo neurone, poi ho questa altra resistenza, alla fine è in serie, sono tutte in serie, questo è in serie con questo, che è in serie con questo. Quindi se per caso ci fosse un'altra **gap junction** e un'altra cellula e un'altra **gap junction**, sarebbe una serie, una catena di resistori. Quindi dal punto di vista dell'ampiezza in questo regime **DC**, in cui i condensatori spariscono perché spariscono i transitori, se io vedo un accoppiamento molto molto debole, quindi io iperpolarizzo o depolarizzo e vedo nell'altro neurone un eco molto molto piccolo, potrei dire: "Ah, caspita, quindi dal punto di vista topologico ci sono diversi neuroni in mezzo," oppure, e questo non lo potrei discriminare, "c'è una **gap junction** unica però con questo valore di resistenza che è altissimo, quindi è un accoppiamento scarso." Questo è quello che ho in mente.

Io metto delle pipette a caso, non so esattamente se questo, supponendo che questo sia una catena, è un caso semplice di una rete monodimensionale, il dimensionale non cambia granché. Io non so che 2 e K hanno una prossimità, quindi sono connesse ma non direttamente, sono indirettamente. Quindi è come se potessi, vorrei volessi desumere una distanza fra le connessioni, perché se ho la distanza potrei forse ricostruire la connettività, potrei ricostruire la topologia. Potrebbe essere interessante. Potrei vedere come se io aprissi un cellulare, vedessi lo schema elettrico, potrei inferire, alla fine potrebbe essere quasi impossibile. Se io apro un **iPhone** non riesco ad avere un'idea, magari grosso modo, di dove è la batteria e dove è la **CPU**, ma in teoria potrei inferire la funzione dalla struttura.

E per quello che vi ho detto, nel caso **DC** è parecchio complicato. La difficoltà è questa ambiguità. Io potrei avere, in questo caso semplice, una cellula in mezzo che mi attenua tantissimo. Io supponete inietto in 1 e registro in 3. Potrei fare l'opposto, però ho anche 2 di mezzo. Oppure ho 4 e 5 o 6, quello che è, sono con un unico **step**. Se volete potrei definire una specie di distanza. Qui la distanza

fra 1 e 3 è 2, perché c'è un salto intermedio. Qui la distanza è unitaria, c'è una prossimità immediata, però vedete che qui è fatto apposta, qui la resistenza è piccolissima, mentre qua è un po' più grande. Quindi potrei nell'interpretare le due situazioni non riuscire a distinguere il caso di una rete così, di una topologia così in cui c'è un neurone intermedio, se io guardo solo quella che è la differenza fra V_1 e V_3 , dico: "Ok V_3 , sei attenuato, ma sei attenuato perché c'era 2 di mezzo." Supponete che io non veda 2, io vedo V_1 e V_3 . Qui io vedo V_4 e V_6 e qui vedo praticamente la stessa cosa e quindi potrei concludere e dire: "C'è una cellula di mezzo," invece no, sono collegate direttamente.

Interessante, forse per voi non è particolarmente interessante, se io guardo invece il **transitorio** e non soltanto lo **stato stazionario**. Lo **stato stazionario** non posso distinguere, questo è un esempio che ho costruito apposta per questa ambiguità. Se vedo lo **stato stazionario** mi accorgo che le curve, le costanti di tempo, gli esponenziali hanno una cinetica leggermente diversa, perché qui ho un condensatore qui, ho un condensatore qui, ho un condensatore sono solo due condensatori, non sono tre. Quindi se io riuscissi, l'ho fatto, a scrivere analiticamente le equazioni differenziali che vanno da una all'altra, vedrei che ho più termini, più condensatori, non mi basta un'equazione del primo ordine, devo scrivere un'equazione del secondo ordine. Non mi piace lavorare nel tempo, quindi non mi piace vedere questi **transitori** così, perché sono difficilissimi. Sperimentalmente è impossibile vedere una roba del genere, per via di quel rumore, il rumore dell'amplificatore ma anche il rumore di canale. Sì, vedo che c'è una differenza minima, adesso non so più chi è chi, la parte tratteggiata e la parte continua, ma le curve non sono sovrapponibili, tanto che le vedo che quelle tratteggiate sono leggermente diverse da quelle continue.

Quello che posso fare è, visto che gli ingegneri fanno quello di mestiere, inietto delle **sinusoidi**, quindi passo nel dominio di **Fourier**, studio un **regime sinusoidale permanente** perché so, o spero, in particolare non inietto una frequenza alla volta, inietto un **chirp**. Si chiama **chirp** perché se lo ascoltassi a un altoparlante avrebbe un sibilo che aumenta in frequenza come un cinguettio di un uccellino. Questo lo faccio qui, vedete che diventa sempre più, le oscillazioni si vedono, sono della stessa ampiezza e si vedono all'inizio perché sono lente, poi accelera, accelera, accelera. Accelera fino a, credo, 50 **cicli al secondo**, quindi non è che va a frequenze del **kilohertz**, ma mi è sufficiente per indurre in un sistema lineare, **RC**, che alcuni di voi sapranno che può essere scritto, quindi l'equazione differenziale può essere scritta come un'equazione algebrica nel dominio delle frequenze, come una diversa relazione di fase. Se io vedo le due situazioni, paragono V_1 e V_3 o V_4 e V_6 , non ho la stessa, quindi se ho una cellula di mezzo ho uno **sfasamento** in più. Tecnicamente questo è vero a frequenza infinita, nella realtà si vede anche a frequenza relativamente alta.

E quello che abbiamo fatto sperimentalmente è, visto che questi **interneuroni** inibitori sono connessi fra di loro con **gap junction**, se io le **peccio** due, riesco per caso a sapere o avere un metodo sperimentale per dire: "Sono collegati direttamente o c'è un intermediario?" Una cosa ancora più interessante, ma non ve ne parlo, è che i neuroni non sono palline, non sono purtroppo questi circuiti, non sono cioè delle strutture che sono a un singolo compartimento, a **parametri concentrati**, sono degli oggetti distribuiti. Che succede se io ho il mio assone o il mio dendrite e sono due dendriti che si toccano in modo distale,

distale da dove ho le pipette, è come se avessi un cavo, un cavo elettrico, lì una connessione ohmica e io me ne accorgo da qua. Comunque, per farla breve, questo è un metodo letteralmente preso dall'elettrotecnica e descrive una tecnica per inferire il **connettoma elettrico** di una rete di neuroni connessi da sinapsi elettriche.

Direi che ci fermiamo qua e continuiamo la settimana prossima.

Cinetica dei Recettori e Trasmissione Sinaptica

Con oggi vorrei finire la parte sulla trasmissione sinaptica. E quindi gli argomenti di cui vorrei trattare sono, di nuovo, gli schemi cinetici, questa volta applicati alla descrizione quantitativa dei recettori sinaptici, recettori post-sinaptici, che sono quindi operati, *gated* dai ligandi, non necessariamente dal potenziale. Vorrei farvi vedere come una semplificazione del modello permette di acquisire un'intuizione su quello che è la fisiologia dei segnali sinaptici e raccontarvi a livello un po' quantitativo sia la cosiddetta plasticità sinaptica a breve termine, sia quella a lungo termine, e vedremo le due differenze.

Quindi, nella conclusione della lezione scorsa, l'elemento, quindi il *take-home message*, l'elemento da portarsi a casa, era che lo stesso formalismo, lo stesso schema concettuale si applica anche quando si descrive come due neuroni sono collegati assieme e si aggiunge in parallelo, per via della conservazione della carica, del bilancio... Quindi la conservazione della carica, della massa, l'equazione di bilancio della carica: un altro ramo in cui fondamentalmente questo tipo di ramo rappresenta delle correnti che sono mediate da recettori, che sono attivati dalla presenza di neurotrasmettitore nel *cleft*.

Qui con questo formalismo in effetti io sto ragionando avendo un neurone come un elemento puntiforme, e questo non è. Credo che alla fine della giornata saremo passati a un'altra descrizione in cui conta l'estensione spaziale, la morfologia del neurone, ma per il momento tutto è in un punto. E quindi se in questo punto ci sono anche dei recettori che vengono accesi quando ci sono molecole di neurotrasmettitore, ebbene in questo caso questo ramo avrebbe un cambiamento nella conduttanza di quel percorso, di quel *branch*, di quel componente.

E come ho insistito parecchio l'altra volta, il tipo di valore del potenziale Nernstiano o potenziale di equilibrio è quello che dipende, chiaramente, dalla specie ionica a cui quel tipo di recettore o canale (quindi ricordatevi, ionotropici o metabotropici) è selettivo, ed è quello che decide se l'accoppiamento sinaptico è eccitatorio o inibitorio. E abbiamo visto che nel caso di una sinapsi elettrica, che non considereremo più, le cose erano leggermente diverse, nel senso che non era un ramo solamente nel neurone post-sinaptico che riceve, ma c'era anche un resistore che univa i due circuiti indipendenti che erano due cellule distinte.

Descrizione della Corrente Sinaptica

Quindi, concentrandosi solo sulla descrizione della trasmissione sinaptica chimica, vorrei risolvere con lo stesso formalismo il problema di come descrivo la corrente. La corrente la descrivo come il cambiamento nel tempo di una conduttanza, per esempio per semplicità dettata da una differenza fra due stati

conformazionali di una proteina, di questo recettore di membrana, che per semplicità può essere o aperta o chiusa.

E così facendo in effetti io sto esplicitando quello che dovrebbe essere il valore della conduttanza, la chiamo conduttanza sinaptica, che è lei che cambia nel tempo. E cambia nel tempo quando, se e se un altro neurone presinaptico decide di “sputacchiare” delle molecole di neurotrasmettitore, perché nel bottone sinaptico, che è giustapposto alla membrana del neurone postsinaptico, le vescicole si fondono e le molecole di neurotrasmettitore contenute all’interno di queste vescicole diffondono. Ma tutto questo meccanismo a me per il momento non interessa; lo esamineremo leggermente dopo quando parliamo di plasticità cosiddetta omosinaptica.

Qui voglio solo capire qual è la dinamica di questi recettori e quindi questa conduttanza sarà di nuovo legata, proporzionale, al numero di recettori postsinaptici in uno stato aperto. Quindi è sempre lo stesso giochino: ci sarà un valore massimo \bar{G} e una variabile di stato che rappresenta una frazione. Ho ripreso qui a descrivere le cose in modo deterministico, in modo mesoscopico, di popolazione; qui ci sono tantissimi recettori postsinaptici e questa è una descrizione senza rumore se volete, soltanto nel caso deterministico (sapete eventualmente come traslarla nel caso stocastico).

Cinetica di Transizione e Dipendenza dal Neurotrasmettitore

Allora, nel caso più semplice i canali possono essere chiusi o aperti. I valori dei *rate* di transizione li sto prendendo in questo caso già con l’idea che so come devono descrivere le cose. In particolare non saranno voltaggio-dipendenti; potrebbero esserlo, alcuni lo sono, in alcuni casi c’è una dipendenza dal potenziale, ma è esplicitata in modo diverso e ve lo dirò (è il motivo per cui in questo periodo dell’anno, con la vostra stanchezza dello studio, vi rifilano le cose ricche di magnesio, di ioni magnesio e commenteremo il perché brevemente), ma per me i *rate* di transizione sono di fatto costanti, a meno che nel caso di transizione da chiuso a aperto, a meno che ci sia nel *synaptic cleft*, nello spazio intersinaptico, ci siano molecole di neurotrasmettitore.

Quindi β è una costante, è un numero, è l’inverso di un tempo, infatti è un *rate*, è una velocità, tot transizioni al secondo. E $\alpha \cdot T$ è un prodotto, mentre prima nella descrizione per esempio delle conduttanze voltaggio-dipendenti scrivevamo (poi tirerò sullo schermo, non importa, lo scrivo qui), scrivevamo $\alpha(V)$, quindi dicevamo è una qualche funzione molto antiestetica nel caso del modello di Hodgkin-Huxley del potenziale. Qui la dipendenza la rendo esplicita, dico che è una dipendenza lineare, proporzionale, quindi è un prodotto fra un numero che dimensionalmente non è soltanto l’inverso di un tempo, ma è anche l’inverso di un tempo per una concentrazione (perché moltiplicato per la concentrazione i termini di unità di misura, concentrazione/concentrazione, si cancellano e di nuovo ritorna a essere un *rate*, una probabilità di transizione nell’unità di tempo, una velocità di transizione). E con questo simbolo T , con queste parentesi, alludendo alla concentrazione extracellulare di molecole di neurotrasmettitore, T -trasmettitore.

Quindi è leggermente diverso da quello che abbiamo visto prima, ma anche qui α e β , in questo caso solo (scusate, solo questa probabilità di transizione che è α

per qualcosa), questa cosa qua, dipende dal tempo, perché dal tempo dipende la concentrazione del neurotrasmettitore nel *cleft*. Nella maggior parte dei casi se il neurone presinaptico non parla, non emette dei potenziali d'azione, questi non daranno, non *triggereranno*, non inizieranno alcun rilascio sinaptico e quindi la concentrazione di neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico sarà nulla.

Quando invece arriva un potenziale d'azione e le vescicole si fondono e inizia la diffusione di molecole di neurotrasmettitore, allora lì ci sarà un cambiamento nel tempo che però non è detto che sia... non è che resta poi costante, perché lo spazio sinaptico è piccolo, è dell'ordine di una frazione di nanometro (o pardon, decine di nanometri), però è aperto. Inoltre, quindi la diffusione delle molecole di neurotrasmettitore continua e il neurotrasmettitore si diffonde allontanandosi dai recettori. E inoltre ci sono le cellule della glia che sono lì pronte per riciclare, succhiare, gestire il riciclo di molecole di neurotrasmettitore.

E adesso vedremo uno dei modi, perché altrimenti questo profilo di neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico può avere una... sì, immaginiamo che possa aumentare rapidamente e poi diminuire. Quindi l'aumento probabilmente è dovuto alla cinetica e al coefficiente di... quindi alla cinetica di diffusione delle vescicole e al coefficiente di diffusione di queste molecole di neurotrasmettitore nel mezzo, nel *medium* extracellulare, ma a un certo punto si spegne, la concentrazione torna a zero con una qualche dinamica che non so a priori indicare, dipende come detto dalla diffusione libera e dal *re-uptake* da parte per esempio delle cellule della glia.

Modellizzazione del Canale Aperto/Chiuso

Però la strategia è questa: dico che la conduttanza è attiva soltanto nello stato aperto, per convenzione, per mia convenzione, e di nuovo con lo stesso giochino scriverei che dO/dt (vedete c'è una freccetta che esce da questo stato O) ed esce con una velocità β e questo flusso dipende da quanto c'è O , quindi è meno perché esce, $-\beta \cdot O$. È una proporzionalità, ve lo ricordo, per la legge di azione di massa, ma è ragionevole perché se io non ho O , se qui non ho un termine che è proporzionale a O , non avrebbe senso che fosse un termine negativo, perché integrando ogni membro avrei una quantità, avrei O che col tempo tende a diminuire, addirittura andando negativo. Mentre così ho i famosi archi di esponenziale, vedete il segno meno, io sono tranquillo, non ho problemi e quindi c'è un effetto di saturazione, di spegnimento a zero che mantiene la consistenza fisica.

Ora la consistenza fisica nel corso probabilmente di questa ora e della successiva a un certo punto la inizio ad allentare perché mi serve poter semplificare questa descrizione per estrarre qualcosa che io da qua non vedo istantaneamente, non vedo immediatamente.

L'altro termine, vedete, in questo contenitore (di nuovo io me l'immagino come se fossero dei contenitori, delle tanniche di liquido) c'è questo rubinetto, questo flusso, che è tanto più intenso quanto più c'è C , quanti più sono i canali nello stato, i recettori nello stato chiuso, proporzionalmente a $\alpha \cdot T$. Vedete che T funge come una specie di rubinetto: quando T è 0 il rubinetto è chiuso, qui non c'è più questo arco qui da C e O ; c'è solo quando T è non nullo. E quando T diventa, cambia (può avere una qualche gradazione, supponete da 0, 0,5

millimolare, 1 millimolare che è il picco di concentrazione di neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico), allora questa velocità di transizione di aumento di O ovviamente tende ad aumentare. La chiamo velocità di aumento perché io qua sto descrivendo la derivata temporale, che è una velocità di comparsa, di apparizione.

In effetti lo posso scrivere anche per C , però queste due equazioni sono linearmente dipendenti, quindi alla fine mi basta ricordare la conservazione della massa, 1, quindi scrivo C come $1 - O$, stessa cosa che abbiamo fatto nel caso generico delle conduttanze voltaggio-dipendenti. E possiamo arrivare a questa forma che è parente esattamente alla stessa forma riscritta in cui avevo una quantità variabile di stato, versione infinita, come era m_∞ , n_∞ , h_∞ , e ho anche la τ , in questo caso l'ho chiamato O_∞ e τ_O . Questa è la costante di tempo con cui questa equazione cambia e O_∞ è il valore di regime. Vi ho detto da praticone, da ingegnere, posso considerare questo sistema una scatola in cui l'uscita è la variabile di stato, l'ingresso è questo O_∞ e alla fine O segue O_∞ , come lo segue? Con questa cinetica, con un pochino di ritardo.

Costanti di Tempo Dipendenti dalla Concentrazione

La cosa interessante è che questa costante temporale, d'altronde come era anche nel caso dei *gating* voltaggio dipendenti, è dipendente dalla concentrazione. Quando non c'è concentrazione di neurotrasmettitore, il denominatore è più piccolo, quindi 1 diviso un numero che è più piccolo tende a essere... No, sto sbagliando. Quindi, pardon. Se io, allora, se T è 0, questa costante di tempo è $1/\beta$. Quando T è non nullo, sì, è giusto. Quando T è non nullo, il denominatore tende ad aumentare. Quindi 1 diviso qualcosa che è più grande tende ad essere più piccolo.

Vuol dire che nella fase di salita, nella fase cosiddetta di *onset*, di apertura, le correnti che sono alla fine proporzionali a O , le correnti sinaptiche, vanno su molto più rapidamente. È sempre un arco di esponenziale, io sono tranquillo, vedete qui c'è il segno meno, ma questa τ è molto più piccola quando T è non nulla. T , notate, può essere solo positivo, quindi quando T è non nullo, qui il denominatore diventa più grande, però è più grande al denominatore, quindi questa τ_O diventa piccola, quindi cresce molto rapidamente. E poi quando decresce, supponete che decresca perché T si è spento, perché T è zero, allora di fatto resta solo β ed è una quantità, visto che non c'è più questo termine additivo al denominatore, è una quantità più lenta, va su rapidamente e va giù più lentamente.

Che se non ricordo male, è simile al tipo di potenziale sinaptico (qui è il potenziale che stiamo registrando e in effetti non è la corrente, però alla fine potenziale sinaptico e corrente sinaptica sono la stessa cosa a meno di un'integrazione, integrazione ad opera dell'equazione di bilancio della carica, l'opera dell'equazione a cui soddisfa il potenziale di membrana). Vedete che qui la salita è molto più ripida, molto più rapida della discesa, la discesa o chiamata anche cinetica di spegnimento è molto più lenta. Qui con queste considerazioni abbiamo questa conseguenza di fatto gratis. E di nuovo è implicito nell'aver reso concentrazione-dipendente una delle due cinetiche, la cinetica di apertura.

Approssimazione dell'Impulso di Neurotrasmettitore

Voi avreste potuto dire: “Ok grazie, è intuitivo”. Nel seguito io ho un pochino di problemi a risolvere un’equazione differenziale di questo tipo, che si è pur vero ed è del primordine, ma non è a coefficienti costanti, perché per definizione τ_O , che è un coefficiente, e O_∞ , che è il termine noto, il termine forzante, da cui in effetti discende l’integrale, da cui dipende l’integrale particolare, sono funzioni del tempo e come detto io non so qual è effettivamente il profilo di neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico.

Lo posso misurare, in alcuni casi ci sono delle sinapsi che sono talmente massive che in qualche modo io posso misurare al variare del tempo la concentrazione di neurotrasmettitore, potrei addirittura utilizzare i recettori stessi come *reporter*, come antenne, visto che si aprono e si chiudono a seconda del se c’è o non c’è neurotrasmettitore, potrei da loro vedere qual è il profilo e qual è la durata, facendo una specie di operazione di deconvoluzione, di *reverse engineering*.

Però per semplicità, per fissare le cose, dico che questo T , funzione del tempo, è una particolare funzione del tempo, semplice per me, ed è una funzione costante a tratti. Costante a tratti vuol dire che, supponete che l’attivazione del neurone presinaptico, quindi il momento in cui il bottone presinaptico “sputacchia” il neurotrasmettitore, inizia a un millisecondo, va su rapidissimamente in tempo nullo, raggiunge un valore massimo, T_{max} , che può essere di un millimolare, e poi torna giù dopo un millisecondo, quindi un millimolare per un millisecondo. Questo è il modo che ho per, di nuovo, cercare di capirci qualcosa ed estrarre delle intuizioni, semplificandomi la vita.

In effetti, come detto, questo sarebbe una cosa che cambia dolcemente, va giù, va su magari rapidamente, ma sicuramente non in un tempo zero, e va giù in un tempo un pochino più lento, probabilmente perché è legato a una diffusione laterale e a un *re-uptake*, un recupero con endocitosi da parte del neurone stesso e da parte di altre cellule come quelle della glia. Se però faccio così, anche questa equazione differenziale diventa a parametri costanti a tratti, quindi io so che posso risolverla da qui a qui, in cui di fatto τ_O è solamente $1/\beta$ e O_∞ è 0, vedete, al numeratore, quindi se T è 0, O_∞ è 0, e se T è un valore costante T_{max} , di nuovo, questo è un numero e quest’altro è un numero, quindi posso scrivere la soluzione come due termini distinti e alla fine trovo sempre gli stessi esponenziali, non è una grossa sorpresa.

Se paragono, quindi la soluzione di questa equazione con parametri costanti a tratti, e questa traccia nera che vedete è paragonata in blu con la corrente, ovviamente normalizzata, con la corrente che è in effetti un vero recettore **AMPA**, recettore che come vi ho detto l’altra volta è un recettore glutamatergico, si lega al glutammato, ovviamente si lega anche alla sostanza che si chiama AMPA con cui è stato selezionato. Il glutammato si lega a tanti recettori, si lega ai recettori AMPA, i recettori NMDA, si lega anche ai recettori glutamatergici metabotropici. Per l’AMPA, e lo riconosco dal fatto che la cinetica di spegnimento è rapida e dell’ordine di 1-2 millisecondi, forse l’ho chiamato la Ferrari dei recettori sinaptici, è un recettore sinaptico ionotropico, salita e discesa sono immediatamente conseguenze di un flusso ionico attraverso il poro che si crea in quel recettore. E vedete, non è perfetto l’accordo, nella parte di salita sì, nella parte di discesa no, però potrebbe non essere così cruciale cogliere esattamente la forma d’onda

di questo potenziale, di questo cambiamento temporale della conduttanza sinaptica.

Modelli Avanzati: Desensitizzazione del Recettore AMPA

Se uno deve fare qualcosa del genere può preferire una descrizione molto più accurata. Questa è una descrizione del recettore **AMPA** che, come vedete, non è “chiuso-aperto”: ci sono tre stati che sono stati indicati con la lettera C e sono **Chiusi**, nel senso che il canale non è permeabile agli ioni. A proposito, il canale AMPA è permeabile a un mix di ioni sodio e potassio e il potenziale di inversione è di 0 mV, credo di averlo detto la volta precedente. Negli stati C_0 , C_1 e C_2 il canale non è aperto, la conduttanza è 0. L'unico stato in cui la conduttanza è non nulla è questo stato O .

E c'è un ulteriore stato che viene chiamato D , in cui di nuovo la conduttanza è zero, e ha questa lettera, questa etichetta D , perché sperimentalmente si è capito che c'è necessità di avere tutte queste transizioni. Alcune delle quali sono dipendenti dalla presenza di neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico, ma non tutte; per esempio, queste in cui dallo stato Chiuso 2 si scappa in qualche modo in questa specie di trappola, non sono dipendenti dalla concentrazione di neurotrasmettitore, sono fissate. E questo stato si chiama stato **desensitizzato**.

Infatti, quando prendete questo schema cinetico e lo attivate (quindi simulando, immaginandovi che ci sia un treno di questi impulsini, di questi rettangolini di concentrazione di neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico, che siano regolari: qui credo che siano uno ogni 10 millisecondi, quindi 100 volte al secondo, 100 attivazioni, 100 **Hz**), vuol dire che il neurone presinaptico sta sparando a 100 Hz, che è parecchio, è una frequenza di attività molto elevata. Forse un neurone corticale potrebbe sparare a 100 Hz per un brevissimo tempo, fare un **burst**, un pacchetto di spike. Scordatevi di vedere 100 Hz per un neurone, per esempio piramidale, che lo tiene per qualche secondo. Non avviene: il neurone si stanca, si spegne, ci sono fenomeni di adattamento frequenza-dipendente, come vi ho menzionato, eccetera.

Confronto tra Modello Semplice e Modello con Desensitizzazione Se usate questo schema [semplice], l'ampiezza di questi picchi massimi della conduttanza sinaptica resta praticamente la stessa. Di nuovo, l'importante è che non andiate ad attivare questo recettore più veloce con una frequenza dell'ordine o più veloce di β . β è una frequenza (un rate), $1/\beta$ è la cinetica, è la costante di tempo di spegnimento. Quindi quello che sto dicendo io a braccio, a occhio, è che questo β in qualche modo mi dice qual è la scala temporale in cui si esaurisce la coda. Oggi parleremo di code (non so se ho parlato con voi del mio conto bancario dell'università che mi pago ogni mese... Sì, lo riprendiamo. Esatto, era dell'adattamento, dello *spike frequency adaptation*. Qui fondamentalmente sto pensando alla stessa cosa). Quindi la coda è finita qua e se c'è un ulteriore impulso di neurotrasmettitore nel *cleft*, quindi un altro spike, ok, il sistema è pronto di nuovo.

In questo caso invece [con lo stato D], se voi (e non è particolarmente complesso, l'unica differenza è che qui è una singola equazione differenziale, qui è 1, 2, 3, 4, 5 stati; sono 5 – 1, sono 4 equazioni differenziali simultanee che dovete risolvere

numericamente. Potete potenzialmente scriverlo, sapete che è possibile descrivere un sistema di più di un'equazione differenziale come un'unica equazione differenziale non di ordine 1 ma di ordine N , in questo caso sarebbe di ordine 4, però non ha grosso senso), alla fine voi vorreste avere un valore da mettere qui dentro e da simulare questa corrente sinaptica. In questa simulazione V_m è rimasto fissato perché qui non sta cambiando il potenziale di membrana, è come se fosse un esperimento di **voltage clamp**.

E qui vedete che, visto che vado così veloce (quindi ripeto, qui è dell'ordine di un impulso ogni 10 millisecondi; me ne accorgo perché qua su 20 millisecondi ce ne sono due, quindi a spanne deve essere quello), allora si fa sentire l'inattivazione e quindi l'ampiezza di questi picchi di conduttanza (questa è la conduttanza post-sinaptica, lo enfatizzo perché vedremo qualcosa di simile in un altro contesto) mostra una specie di "stanchezza".

La cosa interessante è che è possibile farmacologicamente, per il caso specifico del recettore AMPA: c'è una sostanza che si chiama **ciclotiazide** che, se voi la applicate, rimuovete la probabilità di occupazione dei recettori AMPA dello stato desensitizzato. Di fatto il recettore AMPA, anche a 100 Hz, continua a funzionare senza stancarsi.

Significato Fisiologico: Runaway Excitation

Probabilmente la natura ha pensato (al di là del ciclotiazide, che credo sia un composto artificiale, non so se esiste in natura, o forse è un agonista in questo caso, anziché un antagonista, in qualche modo tende a potenziare l'effetto di queste correnti), ma in generale il fatto che i recettori sinaptici glutamatergici, quindi eccitatori, abbiano forse evoluto in alcuni casi una specie di fatica, potrebbe essere come interpretazione possibile (potrebbe non valere nulla questa interpretazione) essere dovuto al fatto che se io sono una sinapsi glutamatergica è una bella responsabilità. Perché se io mi attivo e propago il segnale di eccitazione, può essere che questo segnale di eccitazione possa diventare patologico, possa essere esplosivo, possa essere quello che viene chiamato in gergo **runaway excitation**, eccitazione che "corre via" incontrollata, ovvero una **seizure**, una crisi epilettica: una sincronizzazione globale di tutto il tessuto corticale.

Perché il tessuto corticale e tante altre aree del nostro cervello e del nostro sistema nervoso hanno delle connessioni che sono ricorrenti. Faccio l'esempio stupido che faccio spesso, visto che voi siete particolarmente vicini e magari siete nervosetti oggi (non lo so perché, di nuovo per l'allarme anti-incendio): se io dovessi, un esempio stupido, dovessi schiaffeggiare uno di voi e un **burst** di eccitazione... voi vi girate verso il vostro collega o collega che è accanto a voi e vi iniziate a menare particolarmente. Se foste molto più lontani non ci sarebbe una rissa. È un esempio stupido per dire che se per caso ci fosse una specie di fatica muscolare nelle vostre braccia, nelle vostre sinapsi (in realtà dovrebbe essere in questo caso nei recettori, quindi sarebbe la parte ricevente), però se ci fosse una specie di fatica in questo senso, potrebbe essere che l'effetto collettivo di questa riverberazione, di questa ricorrenza di eccitazione, potrebbe essere sedato. E questo sembra che possa essere uno dei motivi di questi meccanismi di **spike frequency adaptation** (adattamento frequenza-dipendente) e desensitizzazione.

È diversa la cosa sulle sinapsi inibitorie e ne parliamo, perché è molto interessante, perché è l'effetto esattamente duale. Se io sono inibitorio, forse c'è un senso per cui mi stanno arrivando un sacco di spike, perché gli spike evidentemente sono stati generati da eccitazione. E questa eccitazione forse mi mette nelle condizioni di dover inibire gli altri e magari la mia inibizione deve non abbassare la voce, ma alzarla: il mio effetto inibitore deve diventare sempre più prominente se c'è qualcuno che continua a dire "spara, spara, spara". Ma sarà chiaro nel prosieguo.

Interpretazione Intuitiva dello Schema Cinetico Qui è semplice da capire perché, di nuovo, io me lo immagino come se ci fosse qui una specie di tubatura fra quattro tanniche di liquido e qui di fatto c'è una specie di perdita. Ok, in effetti la perdita... la freccia può andare anche in sopra, però dipende dai valori di questo R_D , di questo rate che dallo stato desensitizzato ritorna su. Perché solo quando sono in C_2 posso aprire, altrimenti no. Quindi se ho qualcosa che mi fa cadere... io me lo immagino di nuovo con un sacco di canali, di recettori che tutti lavorano in parallelo e molti stanno a un certo punto muovendosi da sinistra a destra perché T è diventato diverso da zero. Quindi queste frecce sono possibili, però qui si cade nello stato desensitizzato, sottraendosi da quelli che possono invece raggiungere lo stato aperto.

Dovete immaginarvelo come qualcuno che lancia una moneta. Ok, la probabilità lì è 0.5, ma non è che ogni volta esce testa. Quindi supponete che la probabilità sia 0.1. Una volta su 10... che cosa vuol dire? Volta? Ok, sono probabilità per l'unità di tempo, quindi non ha senso dire 0.1; dovrei dire 0.1 per millisecondo. Ogni millisecondo c'è una probabilità solo del 10% di fare la transizione e quindi magari la maggior parte di questi recettori (che mi immagino tutti in parallelo, indipendenti, eccetera) non lo vedono lo stato desensitizzato, ma qualcuno sì. Quindi collettivamente la frazione di canali che sono disponibili per andare nello stato aperto si riduce. È ancora più semplice del caso in cui i rate cinetici sono controllati da una variabile esterna, come il potenziale o come la concentrazione di un ligando. Semplicemente avviene la transizione.

Come avviene spontaneamente? Il fatto che qua si chiuda spontaneamente se non c'è più... In effetti si chiude anche se c'è neurotrasmettitore, però di fatto si vede perfettamente: quando non c'è più neurotrasmettitore c'è questo **recovery**, questa chiusura cinetica del canale.

Il Ruolo del Magnesio e i Recettori NMDA

Perché prendete il magnesio? O perché si dà il magnesio ai bambini iperattivi? La volta che ho detto: "Ma è possibile che sia così?", cioè la psichiatria in generale (quindi mi prendo la responsabilità di questo), la psichiatria dà le molecole così a caso, dicendo: "Sì, ma perché io so... io ho fatto la storiellina (adesso ve ne faccio un'altra), la storiellina dei recettori AMPA, e quindi se io metto un pochino... quindi abbasso il tono glutammatergico e la gente è meno stressata". Alla fine per il momento è così: oltre ovviamente alla medicina e alla psichiatria, avere un'enorme base di osservazioni, prova ed errore (nemmeno "prova e riprova" di Galileiana memoria). Ho mille pazienti nel mio studio, ho visto che quelli a cui ho dato le benzodiazepine di quel tipo oppure l'antidepressivo, ok, stanno un po' meglio, e quindi dico: "Ok, tu mi sembri simile". Ma non c'è

una conoscenza come la vorrebbe un ingegnere, di dire: “Quel parametro doveva essere 20%, adesso è del 26%, lo devo ridurre”. Non c’è questo in biologia ancora.

Con la bioingegneria, particolarmente con le **neurotecnologie**, questo si avvicina. Uno dice: “Ok, non so qual è la temperatura giusta, ma magari metto una qualche neuroprotesi che con un controllo ad anello chiuso mi adatta dinamicamente un’attività, mi riporta, mi toglie il tremore parkinsoniano perché tende a diminuire l’affiliazione di una particolare popolazione”. Non so quella che sarebbe fisiologica, però posso misurare il tremore; quanto più c’è tremore... quindi questa è una direzione più basata su principi rispetto a quella basata sull’esperienza.

Quindi, qualcuno sa perché prendete il magnesio se siete iperattivi o per placarvi? Potreste pensare, e non andreste lontano dalla verità, che è perché c’è qualcosa che ha a che fare col **sistema glutammatergico**. Ok, ma caspita, è solamente un modo, una modalità di comunicazione fra cellule (la modalità magari più importante del sistema nervoso, d’accordo), ma non è che tutto il mio sistema nervoso, se tu mi abbassi un pochino \bar{G} , allora io divento un’altra persona. È un casino, non lo sappiamo.

Il Blocco del Magnesio Voltaggio-Dipendente Tant’è, il fatto particolare del magnesio, lo sapete? È dovuto al fatto che ci sono dei recettori glutammatergici, sempre **ionotropici**, che si chiamano **NMDA**. Si chiamano recettori NMDA perché c’è una sostanza che si chiama NMDA (di cui, come per AMPA, non mi ricordo per cosa sta l’acronimo) che si comporta come agonista. Sono però recettori glutammatergici, quindi quando c’è glutammato nello spazio intersinaptico, questi si aprono. Però hanno, nella parte... nei loro domini (sarebbe sbagliato dire nella parte intracellulare ed extracellulare perché è dappertutto), hanno un **sensore del potenziale di membrana**.

Quindi ripeto: sono dei recettori che sono messi nel neurone post-sinaptico, sono intercalati e quindi per i fatti loro (come i canali di membrana sodio, potassio, calcio, eccetera, sono voltaggio-dipendenti) anche questo in qualche modo ha una dipendenza dal potenziale. Il potenziale è del neurone post-sinaptico in cui sono messi, però si aprono quando c’è glutammato.

Un modo facile per descriverli, senza schemi cinetici complicati, è di pensare che ci sia sicuramente una variabile di stato fra 0 e 1 (la frazione di canali aperti) e questa per esempio evolve con uno schema cinetico aperto e chiuso a due stati, semplicissimo. Ma il valore massimo (\bar{G}) non è un numero: è un numero per una quantità, e questa quantità è una funzione istantanea del potenziale di membrana e della presenza di **magnesio extracellulare**.

Cioè a dire, se voi avete 0 magnesio (sono le palline nel grafico) o 0.01 millimolare di magnesio extracellulare, avete che questa \bar{G} non è che è costante, come vi aspettereste (dato dalla conduttanza del singolo canale per il numero totale di canali). Bene, in questo caso, in modo fenomenologico, in modo effettivo, vedete che dipende (sto guardando solamente questa curva qua per il momento) dipende anche dal **potenziale transmembrana post-sinaptico**.

Se questo è molto depolarizzato, allora sì, fondamentalmente è costante. Però come inizia a essere iperpolarizzato, questo valore della conduttanza massima

dei recettori post-sinaptici NMDA tende a diminuire. E diminuisce di brutto, diminuisce fino al 25% o a zero. Quindi vuol dire che se non c'è magnesio esiste una notevolissima dipendenza dal potenziale di membrana... Ok, no, detto così è sbagliato. Il recettore dipende anche dal potenziale di membrana e quanto più c'è magnesio (passando dai circoletti ai diamanti, ai quadrati, ai triangoli, quindi la concentrazione extracellulare sta passando da 0, 0.1, 1, 10 millimolare), questa dipendenza tende a essere comunque lì e tende a spostarsi verso valori più depolarizzati.

E il **range** di questa sensibilità è esattamente nel range in cui avviene l'integrazione sinaptica e il potenziale d'azione. Non è che ha un range per cui fisiologicamente non avviene; è proprio lì. Quindi l'evoluzione l'ha fatta lì.

Rivelazione di Coincidenze (Coincidence Detection) Lo ridico in un altro modo, così forse potete anticipare: ma questo a che caspita serve? La conduttanza... supponete che ci sia una quantità fisiologica necessaria di magnesio. Quindi se voi prendete magnesio per via orale, vi state muovendo su queste curve, quindi state a potenziali per esempio di riposo, state **spegnendo** la trasmissione sinaptica glutammatergica, indipendentemente dal fatto se c'è o no neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico. La cosa interessante è che questo cambia: quindi questa curva non è più 0, diventa 0.75, 1, eccetera, fino a un massimo, quando il potenziale è particolarmente depolarizzato.

Quindi, affinché questo recettore conduca una corrente: 1. Deve esserci molecole di neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico, così che il giochino “chiuso-aperto” flippi e quella variabile R (o O) diventi diversa da zero, perché altrimenti questa corrente è nulla. 2. E poi qui c'è un prodotto, quindi logicamente è una specie di **congiunzione** (AND): devono valere due cose affinché uno possa vedere una corrente NMDA. Deve esserci il neurotrasmettitore (quindi il canale flippare da chiuso ad aperto) **E** il potenziale di membrana post-sinaptico deve essere depolarizzato (per rimuovere il blocco del magnesio).

Quindi io sono il neurone presinaptico e “sputacchio”, parlo, sono eccitato e parlo, e parlando sputo glutammato. E il neurone post-sinaptico lo sente, gli si lega nel recettore, però lui di suo, per avere questa corrente, deve essere depolarizzato, deve sparare (o quasi). Mi viene in mente: che cos'è questa cosa qua? È un'operazione, è una computazione notevole. È una **rilevazione di coincidenza temporale** di due eventi. Il neurone presinaptico sta sparando **E** il neurone post-sinaptico, per i cavoli suoi, è depolarizzato.

Quindi questa correlazione non è probabilmente un caso, perché il recettore NMDA è estremamente permeabile agli ioni **calcio**, anche lui ha un potenziale di inversione attorno a 0 mV (quindi comunque sicuramente è eccitatorio perché è maggiore del potenziale di riposo, -60), ed è coinvolto in tutta una serie di fenomeni legati alla **plasticità sinaptica**. Questo rivela le coincidenze fra attività pre e attività post.

E ovviamente, se per caso tutte le volte che io, neurone post-sinaptico, sono attivo quando il neurone presinaptico mi vuole parlare, forse c'è un qualche motivo per cui noi due diventiamo connessi, per cui si passi da un evento di **correlazione** a un evento di **causazione**. Magari è necessario, come per due concetti in psicologia che sono simili e si co-attivano, è necessario che magari se

si co-attivano sempre, che esista una specie di rinforzo fra i due e che diventi che quando il neurone presinaptico spara, allora anche il neurone post-sinaptico spara.

Però questa cosa qua in teoria precede, perché di nuovo il potenziale di membrana può o deve essere depolarizzato e potrebbe essere depolarizzato per altri motivi, per l'attivazione di altre sinapsi. Non è necessariamente che io parlo a te e ogni volta ti devo eccitare; tu puoi essere per i fatti tuoi eccitato e se temporalmente ci sono queste co-attivazioni, cioè questa sincronia, forse è bene che anche la nostra sinapsi, il nostro canale di comunicazione, diventi privilegiato.

Comunque mi ha sempre fatto molta impressione il fatto che uno dà magnesio a un bambino iperattivo perché così questa sigmoide **drifta** (si sposta) e quindi tende a essere ancora meno eccitabile. Se non date magnesio, quindi se c'è poco magnesio, o questa curva è praticamente orizzontale o è comunque molto shiftata a sinistra e quindi anche a potenziali di riposo, se c'è un pochino di glutammato, questo ha un effetto depolarizzante sul neurone post-sinaptico. Ha senso? Questo inizia a richiedere un po' di attenzione perché, di nuovo, qua sto parlando del neurone presinaptico che eccita il post, e il post per i fatti suoi deve essere depolarizzato. So per esperienza che la gente un po' si confonde: "Ma come? Il glutammato dà un effetto depolarizzante...". L'NMDA, visto questo potenziale di inversione, è una corrente depolarizzante. Sì, questa è una cosa in più, è un rivelatore di coincidenze in più.

Recettori Metabotropici e Schemi Cinetici Complessi

Ok, ora nel caso di **recettori metabotropici** il discorso, anche se non lo approfondiremo più di tanto (potete provare a scrivere l'equazione), nulla è... Permette di, con lo stesso linguaggio (è molto potente, perché è fenomenologico: alla fine io non devo specificare che questa è la G-protein che si è attivata, è semplicemente G_0). Una quantità che mi descrive una densità, una concentrazione di oggetti in un particolare stato che può essere libero, oppure qui potrebbe essere legato al recettore.

E posso tradurre in uno schema cinetico quello che è per esempio il comportamento metabotropico in cui il neurotrasmettitore, quando si lega con il recettore in uno stato *naïf* che non è legato, non soltanto dà (quindi non apre un canale, la conduttanza qui... la O spunta qui, quindi sì, nell'espressione della corrente metterò la frazione di canale in quello stato)... prima di arrivarci devo pensare un po'.

[Image of G-protein coupled receptor signaling cascade]

Qui R mi rappresenta lo stato del recettore (per esempio sto pensando al recettore **GABA-B** oppure al recettore metabotropico glutammatergico, **mGluR**) quando è legato, in uno stato che è legato alla molecola di neurotrasmettitore. E per i fatti suoi, vedete qua, può addirittura andare in uno stato desensitizzato e flippare e può anche tornare indietro, può liberarsi (visto che non ci sono... visto che tutte queste probabilità di transizione sono costanti, quindi non sono ulteriormente dipendenti dal voltaggio). E mi è necessario i recettori in questo stato **E** devono esserci delle **G-protein** intracellulari nello stato libero per poter andare in uno stato conformazionale di combinazione "recettore e G-protein attivata",

che dopo un po' si stacca.

E questa G-protein in uno stato attivato per i fatti suoi decade e torna in uno stato pronto, ma si lega a un canale che era (un canale per esempio potassio) che era in uno stato chiuso. Ne servono magari *N* G-protein (vedete quell'animazione tridimensionale che vi ho fatto vedere l'altra volta di questo tizio su X o Facebook o Twitter o quello che è): solamente in questo caso si passa a una permeabilità aperta di un canale potassio.

E quindi tutto questo casino tradotto in un sistema di equazioni differenziali mi rappresenta e mi permette di descrivere e di comprendere l'attivazione metabotropica. L'unica cosa che avviene è, immaginando che ognuno di questi step abbia una o più equazioni differenziali, potete immaginare che ogni volta che c'è un'equazione differenziale avete qualche tipo di costante di tempo, di cinetica temporale, quindi una specie di **ritardo**. Che giustamente giustifica il fatto che i recettori ionotropici sono Ferrari (si lega il neurotrasmettitore, si apre il poro e gli ioni passano subito). I metabotropici sono i più antichi dal punto di vista evolutivo, filogenetico (e sono probabilmente... filogenetico vuol dire sulle specie, sulle diverse specie di mammiferi, di insetti, di invertebrati, vertebrati, quello che volete, sono i più antichi) e sono **lenti**.

Quindi se entra la tigre, forse mi conviene evolvere nel mio sistema visivo delle sinapsi che possano far passare rapidamente delle informazioni, piuttosto che una roba che qui magari si attiva dopo 50 millisecondi. La tigre potrebbe avere la meglio su di me.

La cosa interessante qui è che potrebbero, per questi schemi (che potreste anche leggere come schemi cinetici biochimici che qualcuno di voi potrebbe aver fatto), si presta, e nella realtà biologica è così, a tutta una serie di **feedback positivi**, amplificazioni. Quindi io ho magari soltanto una molecola di neurotrasmettitore. Questo è particolarmente interessante per il bulbo olfattivo, per il sistema olfattivo in cui magari anche solo una molecola di odorante di gelsomino (del fiore, vabbè, della rosa) ne prendo solamente una e la devo amplificare. E anziché fare un lavoro di amplificazione che esiste nel sistema nervoso centrale a livello di spike, a livello di attività elettrica, lo posso fare a livello di reazioni biochimiche. Come pure posso fare una specie di meccanismo di *safety*, di sicurezza, di freno in cui se ho troppa attivazione la posso bloccare. E quindi questo con l'AMPA... il recettore AMPA non ce l'ha (ok, ha questo stato desensitizzato, ma è semplice dal punto di vista... non permette... permette solo magari di sfavorire, non ad amplificare i segnali deboli).

Dopo la pausa di 10 minuti vi farò vedere come, per cercare di semplificare le cose, quali vantaggi ci sono se, anziché pensare a un treno di questi impulsini, di questi rettangolini (ciascuno messo a un tempo in cui c'è un potenziale di azione presinaptico), io li baratto, li sostituisco con delle **delta di Dirac**. E voi mi direte: "Ma questo non esiste in natura, la concentrazione non raggiunge un valore infinito in un tempo nullo". Sì, però matematicamente l'effetto è simile, è molto simile. E lo vediamo dopo.

Mi fermo per 10 minuti, sapete dove trovarmi se avete domande.

Approssimazione con Delta di Dirac e Risposta all'Impulso

Bene. Allora, qui ho ripreso questo schema cinetico dei recettori post-sinaptici della trasmissione chimica in cui ci sono solo due stati, chiuso e aperto. Di nuovo, questa è l'equazione che scrivo quando descrivo il cambiamento nel tempo della frazione di canale nello stato aperto. E la cosa che posso osservare è che se io qua, anziché mettere T , una funzione arbitraria (che in qualche modo mi tiene conto di questa sommazione grafica, sovrapposizione grafica di funzioni che sono praticamente zero dappertutto, tranne dove c'è il rettangolino), la posso scrivere anziché come una somma di funzioni individuali, dove l'argomento comunque lo devo cambiare dipendentemente dall'indice dell'elemento sommato. Posso cioè immaginare che quel treno di impulsi che vi ho fatto vedere prima, di rettangoli, sia descrivibile come una sommatoria e poi qui c'è una traslazione, uno *shift*.

Chi di voi ha avuto il coraggio di vedere quei pochi video di introduzione matematica avrà visto che in modo molto intuitivo vi faccio vedere (forse era addirittura con qualche Jupyter Notebook o Google Colab o quello che era), vi faccio vedere che era possibile capire che se voi mettete, cambiate l'argomento della funzione, sottraendo o sommando, la funzione si muove rigidamente sull'asse delle X; se invece mettete più o meno qualcosa qui, la funzione trasla dall'alto al basso, quindi verso o lungo la direzione dell'asse delle Y.

Qui però io cambio, non mi interessa più di usare i rettangolini, voglio le **delta di Dirac**, perché mi piacciono. O meglio perché so come comportarmi quando sono messe al membro di destra di un'equazione differenziale. Lo so perché gli ingegneri quando calcolano la risposta all'impulso, di fatto stanno avendo un impulso nella parte destra di un'equazione differenziale di un sistema di questo tipo, e ne hanno uno. Ok, qui anziché essere uno sono un numero arbitrario, sono N , e sono ognuno messo, piazzato a un diverso istante t_k ($t_1, t_2, t_3 \dots$).

Quindi la situazione è questa, in cui ho diversi istanti. Non necessariamente per il momento... non necessariamente questi tempi che rappresentano i tempi di attivazione del neurone presinaptico, non necessariamente devono essere uniformi, cioè multipli interi di una qualche quantità; possono essere anche casuali. Tanto, purché io li chiami t_1, t_2, t_3 , abbia da qualche parte scritto dove sono, posso scrivere in modo conciso. Quindi scrivendo somma di questi termini, $\delta(t - t_k)$, di fatto sto in una botta sola esprimendo il grafico di questa funzione che ha 4 (in questo caso sono 4), 4 delta di Dirac. Questa è una cosa molto conveniente e vale perché laddove la delta di Dirac non c'è (come laddove non c'era il gradino) la funzione è zero, quindi io la posso letteralmente sommare. E facendo la sommazione, a meno che non sono... quindi le devo *shiftare* le cose, ma se non... qui è un po' più difficile, però se io faccio attenzione a metterli in istanti che sono più distanti dell'intervallo di quel millisecondo di questa durata del neurotrasmettitore, del profilo di neurotrasmettitore nello spazio intersinaptico, non mi si vanno a sovrapporre le ampiezze. La somma avviene sempre fra una quantità che è 0 dappertutto e una quantità che è 1 (o T_{max} , dov'era? T_{max}) solamente in un punto. La sto facendo molto lunga per chi di voi magari non ha visto le delta di Dirac, però questo è molto conveniente per tanti motivi.

Termini Moltiplicativi e Saturazione dei Recettori Quello che ho sentito scritto qua e C l'ho scritto come $1 - O$, che per definizione (quindi in questo

caso ancora l'equazione è esatta) e T_{max} , che era l'ampiezza di queste delta di Dirac, ma visto che l'ampiezza era la stessa per tutte, l'ho portata fuori dalla sommatoria.

Guardando questa equazione io non la so risolvere perché qui non è un sistema... al di là del fatto lineare o non lineare (in questo caso è un sistema lineare, ha coefficienti costanti), però qui l'input è un input **moltiplicativo**, si dice, perché la variabile di stato O , qui moltiplica l'ingresso. Mentre io sono abituato, nella teoria dei sistemi, ad avere un termine che esaurisce (che compaiono come vogliono) tutti i termini che sono la variabile di stato, più qualcosa, e questo qualcosa non contiene la variabile di stato. Questo è tipicamente la versione semplice, di cui io so manipolare, so scrivere la risposta all'impulso, so risolvere analiticamente con l'integrale di convoluzione o con varie tecniche euristiche. Quando ho una cosa del genere non lo so fare perché, o meglio lo potrei fare ma è più complicato, perché è un termine di ingresso moltiplicativo.

Vi faccio riflettere che questo termine $(1 - O)$ ha come funzione quella di, gratis (emerge da questo schema cinetico), di tenere in conto quella che è la **saturatione dei recettori post-sinaptici**. Per come ve l'ho raccontato, il bottone presinaptico "sputacchia" le molecole di neurotrasmettitore e queste si legano a un numero che comunque è limitato e finito di recettori post-sinaptici. Quando una molecola di neurotrasmettitore si avvicina a un recettore post-sinaptico e lo trova occupato perché c'è già un'altra molecola che è legata (quindi se sono quasi tutti aperti, aperti nel senso che sono legati a una molecola di neurotrasmettitore), $1 - O$ è molto piccolo. E quindi questo termine qua, che ci sia o no questo input, che ci sia o no, non viene preso in considerazione, non c'è spazio, non ci sono altri *slot*, visto che la maggior parte di canali è in uno stato (di recettori post-sinaptici) è in uno stato legato a molecole di neurotrasmettitore.

Tuttavia una situazione del genere avviene in due circostanze. La prima è che ci siano così tante vescicole nel bottone presinaptico che in un attimo io ti inondo e ti saturo tutti i recettori (come se fossero dei sedili, forse questo è un esempio più calzante, come se fossero dei sedili di un'aula: entra una quantità enorme di studenti, i sedili sono quelli e in una botta sola si siedono). Un'altra possibilità (questa di solito non è, anche perché metabolicamente è complicato rigenerare nel bottone presinaptico una quantità notevole di neurotrasmettitore, quindi il più delle volte la quantità è limitata, è piccola di neurotrasmettitore; d'altro canto è una conversione elettrochimica e quindi potrebbe essere, e lo è, metabolicamente costoso sintetizzare il neurotrasmettitore, impacchettarlo nelle vescicole, può essere faticoso).

Il secondo scenario, che è un pochino più realistico, è che le porte si aprano ripetutamente con una certa frequenza e ogni volta entrano dei nuovi studenti. Quindi se l'attività di *firing* del neurone presinaptico è a una certa frequenza, questa frequenza di nuovo ha a che fare con β , con β è una specie di termine di paragone. Allora ovviamente lo dico perché β è il *rate* con cui il neurotrasmettitore si slega, quindi con cui voi magari avete finito di stare seduti e uscite. Quindi se io inizio ad avere un'attivazione che è dell'ordine di β , allora di nuovo posso avere che saturo, non ci sono più posti liberi. Quindi mi è assolutamente comodo questo $1 - O$. Però questo succede di nuovo non così frequentemente, perché di nuovo vuol dire che il neurone presinaptico sta sparando a frequenze paragonabili a β , che mettendo le opportune... mettendo gli opportuni valori

numerici vuol dire dell'ordine di qualche centinaio di Hertz, qualche centinaio di spike al secondo, che è praticamente molto molto raro. Sì, potrebbe essere per brevissimi... per pacchetti, per *burst*.

Però da qui in avanti io sto facendo delle assunzioni, delle approssimazioni. Quindi sono conscio del fatto che non solo questa era una visione semplificata, ma qui sto dicendo: "Sai cos'è? Io questo lo butto proprio". Dico che c'è solo 1. Quindi è come se dicessi: la maggior parte dei recettori sono quasi tutti liberi, quindi sono quasi tutti chiusi, sempre. E voi mi potreste dire: "Ma no, non lo sono". Sì, perché comunque la frazione di recettori nello stato aperto, quando aumenta, aumenta e diventa a un valore di picco per un breve tempo. Quindi se l'attività presinaptica non è molto frequente, il neurotrasmettitore trova sempre i recettori liberi.

Quindi sto scrivendo che approssimo e sto mettendo qua un termine che finalmente è abbastanza semplice da trattare. L'avete mai vista un'equazione differenziale di questo tipo in cui il termine forzante è una delta di Dirac? Gli ingegneri elettronici, quelli che hanno l'idea della risposta all'impulso, dovrebbero dare risposta positiva. Magari non l'avete mai visto con un treno di impulsi, quindi con un sommatore di tanti impulsi shiftati, quello che viene chiamato un treno di impulsi.

Vi faccio vedere fra poco, paragonandolo e facendo carta e penna (o pennarello e lavagna, se scrive il pennarello), vi faccio vedere che se mi consentite questa semplificazione io posso estrarre una qualche informazione che è fondamentale qua. Cioè posso avere da un lato un'espressione (ma questa non è particolarmente interessante: anziché risolvere questa equazione differenziale, io posso avere un'equazione algebrica, iterativa, che mi dice qual è l'ampiezza all'istante dello spike $k + 1$ -esimo, sapendo qual era l'ampiezza all'istante k e sapendo quanto tempo è passato). Ma questo potrebbe avere un valore del tipo: se volete fare delle simulazioni, volete avere un metodo per accelerare i tempi. Perché se un neurone piramidale riceve qualcosa come 10.000-100.000 input sinaptici da altri neuroni, potrebbe fare caldo ad avere 100.000 (anche magari saranno 50.000) equazioni differenziali di questo tipo da risolvere numericamente istante per istante.

Steady State Dinamico e Conversione Frequenza-Corrente

Ma la cosa più interessante, di cui vi voglio solo far vedere come ci si arriva, è questa espressione qua che dice che più o meno allo *steady state*, allo stato a regime... E voi mi potete dire: "Ma quale regime? Ho degli spike presinaptici e dal punto di vista post-sinaptico i potenziali (quindi le correnti o il potenziale post-sinaptico, il cambiamento di conduttanza) è qualcosa che va su e poi va giù, va su e va giù. Dov'è il regime?". Non c'è un regime fisso, è simile a quello che viene chiamato regime sinusoidale permanente, in cui anche lì non c'è un regime fisso, non c'è un regime costante, ma è una specie di regime dinamico che vi faccio vedere.

E da questo (adesso vi dico che cos'è questo *steady state*) ottengo questa informazione che è molto importante: a parte α , T_{max} e β^{-1} che sono numeri, qui mi dice che allo *steady state* una sinapsi, un recettore post-sinaptico, una famiglia di recettori post-sinaptici, mi stanno producendo una corrente (ok, questo deve

essere moltiplicato per \bar{G} e moltiplicato per la *driving force*), ma comunque di suo è una corrente **proporzionale alla frequenza presinaptica**.

Che è una cosa molto interessante, molto potente. In qualche modo, nonostante sia una forte approssimazione, mi dice che **una sinapsi è un oggetto che converte frequenze in correnti**. Che è quello che fa. E questa conversione è lineare, è proporzionale. E potrebbe illuminarsi una lampadina nel vostro cervello e dire: “Ok, se devo sviluppare una qualche intuizione su cosa fa una sinapsi in una rete grande di neuroni, forse potrei dire che il suo valore mi sta testimoniando quello che è un valore... quindi me lo testimonia con un valore analogico continuo nel tempo, di quella che è la frequenza di un evento digitale e mi estrae la frequenza”.

Quindi questo è quello di cui sto dicendo e non ne abbiamo parlato, ne parleremo l'anno prossimo, combinato con quello che i neuroni fanno. Alla fine l'abbiamo visto solamente dal punto di vista numerico, questo l'abbiamo visto quando vi ho fatto vedere che per il modello di Hodgkin-Huxley, per esempio aumentando la corrente (la corrente mia iniettata, però potrebbe essere la corrente sinaptica iniettata da un altro neurone), quando questa corrente viene aumentata la frequenza di sparo aumenta. Non importa che aumenti linearmente.

Quindi in un certo mondo (per cui questa slide ha metà senso adesso e l'altra metà non ha senso perché non l'abbiamo visto in questo modo approssimato), la cosiddetta curva frequenza-corrente, che forse vi ho chiesto di provare a giocare, forse l'ho chiesto ai vostri predecessori del secondo anno, converte una corrente in una frequenza. Quindi converte un livello analogico in un treno di impulsi. Mentre la sinapsi fa l'effetto opposto: converte un treno di impulsi in un valore analogico. E quindi magari a un certo punto potrebbe (ma non viene adesso la tentazione, verrà fra un anno) di dire: “Ma ok, se io per caso collego questa freccia a questa...”. Perché alla fine le sinapsi sono degli oggetti che hanno un effetto su altri neuroni e diciamo l'attività di frequenza di questa freccia di fatto potrei attaccarla qui, perché alla fine sono i neuroni che producono questi treni di potenziale d'azione, quindi non è che le sinapsi se le inventano questi treni di potenziale d'azione. Quindi potrei vedere e studiare (e si fa in modo autoconsistente) una specie di combinazione fra una sinapsi e un neurone che potrebbero essere rappresentativi di tanti neuroni.

L'Analogia del Conto Bancario Allora, quello che vorrei fare è, prima di passare alla plasticità sinaptica, vorrei mettere una maledetta slide nera perché non voglio spegnere il proiettore che non so come si fa, quindi datemi un secondo. Questo non è molto elegante... ok... ok. È breve, è un giochino, ma una volta nella vita la storia del mio conto bancario deve essere chiarita matematicamente.

Quindi mi dovete permettere di fare una approssimazione, una semplificazione. Sto pensando che il treno di spike presinaptico nel tempo sia a **frequenza uniforme**, cioè questa volta sì, le delta di Dirac devono essere equispaziate. Quindi se fossi “figo” dovrei scrivere che t_k è proporzionale a un qualche ΔT , per esempio. È un multiplo intero di un qualche periodo. E questo periodo, ΔT , potrebbe essere descritto come $1/f$, visto che la frequenza e il periodo sono uno l'inverso dell'altro, in un contesto in cui c'è una frequenza uniforme, si dice, perché non cambia nel tempo.

Quindi l'equazione era qualcosa del genere (non importa della α , non importa del T_{max} e β^{-1} , non importa), era qualcosa in cui c'era, in funzione del tempo, un'equazione differenziale che descriveva dx/dt , c'era un $-\beta x$ più, fatemelo chiamare, A , poi c'era la somma su k di queste $\delta(t - t_k)$. Non importa tanto, è tanto un numero, adesso lo vedrete perché non è particolarmente importante.

Quindi la prima cosa che posso dire è che quando non sono vicino in prossimità a una delta di Dirac, questa quantità sparisce, perché è zero dappertutto, praticamente è zero sempre, quasi sempre, tranne quando ci sono esattamente quelle delta di Dirac. Quindi in quel caso, quando t non è... è diverso da t_k (k da 1 a quello che è n), l'equazione diventa molto semplice, ed è la solita, noiosissima equazione:

$$\frac{dx}{dt} = -\beta x$$

E questa la so risolvere perché x (a parte la condizione iniziale, che qui la lascio indicata la costante da identificare) è $e^{-\beta t}$. Sono contento perché c'è segno meno e quindi c'è il segno meno nell'esponenziale, quindi vuol dire che è un esponenziale decrescente.

Quindi da qualche parte qua (quindi questo sarebbe il grafico, quindi questo è in qualche modo l'input presinaptico che appare in quell'equazione, input presinaptico, e questo è per esempio il valore di $O(t)$, o di $x(t)$, quello che è; alla fine x e O sono la stessa cosa a meno di un fattore di scala che adesso non ho, non ha importanza recuperare nel suo valore preciso). Quindi a un certo punto ogni volta che c'è uno spazio fra due, quindi l'intervallo in cui non c'è una delta di Dirac, partendo dove parto (quello che sarà la condizione iniziale, non lo so, fissata a quello che è), io so scrivere l'evoluzione nel tempo perché è un arco di esponenziale che va giù.

Qui forse vedete il giochino che voglio fare. È come se fosse... quindi quella è l'università mi dà (perché c'è un più) una quantità di soldi alla fine di ogni mese. Però io fortunatamente non mi comporto così: non spendo proporzionalmente a quanto ho nel conto bancario. Ho delle spese fisse, qualche volta esagero con Amazon, però sicuramente non è che lo faccio proporzionalmente: "Adesso c'ho [tanto], allora raddoppio". No. Qui invece per la legge di azione di massa sì: io sto... quanto più è alto il valore di x , tanto più rapidamente deve scendere, infatti ho un esponenziale.

Nel caso del mio conto corrente, qui è come se io non avessi più la dipendenza dal valore dell'estratto conto, dal valore totale dei soldi nel mio conto corrente, e quindi la soluzione non sarebbe questa, sarebbe una retta, sarebbe qualcosa del tipo costante ($t_0 - t$), qualcosa del genere. Quindi è qualcosa che anziché andare e poi piano piano saturare, andrebbe linearmente, tanto che io posso andare non solo... vado in rosso, posso scendere arbitrariamente, il mio debito può aumentare arbitrariamente, è proporzionale a quanto spendo. Quindi non è questo, però la storia del conto bancario forse vi resta nella mente.

Nota: questa stessa analogia l'ho fatta per l'accumulo di calcio nel citoplasma di un neurone quando si parlava dei meccanismi di adattamento frequenza-dipendenti. Qui sto parlando invece della frazione di canali post-sinaptici in uno stato aperto. La matematica è la stessa, però sono due concetti diversi. In un primo caso era una concentrazione di calcio che si accumulava (questo

poteva essere una specie di influsso di calcio, si aprivano i canali calcio, c'era un *puff* di calcio). Qui è un'altra cosa: quello è un'apertura, una quantità di neurotrasmettitore che arriva tutta di botto in un momento del tempo e fra un momento e l'altro questa è la cinetica in questione perché è un recettore sinaptico che da aperto diventa chiuso.

Integrazione della Delta di Dirac Il secondo step è di dire: ma quando sono attorno a t_k , come mi devo comportare? Allora qui io posso applicare l'integrale da ambo i membri e lo applico a cavallo di una delta di Dirac. Lo applico fra... supponete che questo sia t_k , il k -esimo istante. Utilizzando questa nomenclatura, questo formalismo dei matematici, scrivo (togliendo questo), scrivo che faccio l'integrazione fra t_k^- e t_k^+ . Quello che dovrei dire più correttamente è che io sto immaginando di fare questo integrale, t_k , fra due punti, quindi in un intervallo, fra due punti che sono a cavallo di una delta di Dirac, una qualunque (poi vedete che la cosa si ripete sempre). Dopodiché dovrei fare un procedimento di limite, dicendo che questo di sinistra, questo estremo di sinistra va a t_k da sinistra e questo a destra diminuisce andando a t_k da destra. Ma non ha così tanta importanza, perché l'unica cosa su cui devo ragionare è che qui ho l'integrale di una derivata. Integrale e derivata si cancellano perché sono una l'operazione inversa dell'altro.

Quindi fatemi cancellare questo... quindi qui per il teorema fondamentale del calcolo integrale, io questo lo so scrivere perché so qual è la primitiva. La primitiva x la calcolo in un estremo meno la calcolo nell'altro estremo: quindi $x(t_k^+) - x(t_k^-)$. Questo mi piace perché alla fine io so qual è il valore di questa x subito prima e mi immagino che subito dopo ci sia un qualche tipo di salto. Alla fine l'università mi versa uno stipendio, io qui sicuramente vado su, di non so quanto, ma vado su (purtroppo ho sempre poco, però vado su), cioè dopo meno prima sarà una qualche quantità.

Resta questo pezzo [il termine $-\beta x$]. Questo è il pezzo più fastidioso, perché devo invocare una cosa che mi fastidiva da studente, che è una cosa abbastanza euristica, cioè invoco la **continuità** di questa funzione x . Voi mi dite: "Ma non hai risolto questa equazione, come fai a sapere che x è continua?". Io assumo che x sia continuo e qui fondamentalmente sto dicendo che sto facendo l'integrale, cioè sto calcolando l'area sottesa di una funzione che è ok, che non è patologica. Questa [la delta] è una funzione patologica, però fortunatamente si cancella con l'integrale, lo vedremo fra un attimo. Se è una funzione normale, quando faccio l'area sottesa è facile, ed è facile comprendere che quando io restringo molto gli estremi di integrazione (i matematici dicono "quando faccio l'integrazione su un dominio di misura nulla", la stessa cosa), l'area diventa zero. Perché non ci sono discontinuità particolari; al massimo ci potrebbe essere una discontinuità di prima specie, come questa, però per la matematica questa non è particolarmente drammatica, non ci sono delta di Dirac.

Quindi questa quantità qua so che è zero. Però c'è ovviamente un'euristica che vi può disturbare perché di nuovo io non lo so in anticipo, quindi lo devo assumere e poi devo verificare che sia così. Un altro modo per vederlo è che questa classe di equazioni differenziali ($dx/dt = -\text{bla bla} + \text{qualcosa}$) hanno l'uscita che si dice sempre più continua dell'ingresso, perché di mezzo c'è un'operazione di integrazione. L'integrale, al contrario della derivata (che fa risaltare le transizioni,

fa risaltare le discontinuità, fa risaltare i cambiamenti), l'integrale ammoscia tutto, diciamo fa *smoothing*, fa "alliscia", come si dice, rallenta tutto quanto. Quindi è per questo che io assumo che se le delta di Dirac che sono delle brutte bestie (sono fortemente discontinue, vanno all'infinito in un tempo nullo; peggio di così potrebbero esserci le derivate multiple di questa delta di Dirac, sono ancora peggio, però non ci sono qui), se è una delta di Dirac, la x , che di fatto è una specie di versione integrata, al massimo sarà un gradino. Cioè sto immaginando in un altro contesto, sperando che qualcuno possa risuonare, che dovrei parlare di distribuzioni, che sono queste funzioni speciali che sono la delta di Dirac, il gradino (spesso si chiama, si indica con θ , la cosiddetta funzione di Heaviside), sono tutte funzioni che sono... non sono funzioni speciali, e io so che di fatto l'integrale di una delta di Dirac diventa un gradino, e il gradino è una funzione che ha solo una discontinuità di prima specie.

Comunque, per farla breve, in quel caso ho tolto quel termine che era tranquillo, tranquillo, quindi qui scrivo letteralmente 0. Più questo: è semplice perché la delta di Dirac è per definizione sua una funzione (ci sono vari modi per definirla, addirittura un modo è utilizzando l'antitrasformata di Fourier, oppure l'antitrasformata di Laplace, oppure prendendo un gradino la cui ampiezza è inversamente proporzionale alla durata, quindi se tu fai il limite, quando fai restringere la durata, l'ampiezza va all'infinito), ma comunque sia, c'è un'altra definizione che mi piace di più perché è assiomatica, dove non c'è da capire granché, che dice: la delta di Dirac è quella funzione che, se tu la metti sotto il segno di integrale, e gli estremi di integrazione la comprendono (comprendono dove è il termine t_k , dove è centrata la delta di Dirac), estraggono la funzione che premoltiplica questa delta di Dirac. Uno. Un altro modo per dirlo è che l'integrale di quella delta di Dirac (scusate, qui tolgo la sommatoria perché sto considerando solamente una delta di Dirac alla volta), un altro modo è che la delta di Dirac è quella funzione la cui area è sempre unitaria, cioè l'integrale a cavallo di dove è definita la delta di Dirac è uno. Comunque la volete mettere, qui scrivete A .

E questa è una cosa drammaticamente più facile da fare rispetto che risolvere, seppure sia lineare, costante a tratti, l'equazione a cui soddisfa O per quando l'impulso, quando la concentrazione di un neurotrasmettitore non è descritta da una serie di impulsi di Dirac, ma da quei rettangolini. Quindi qui ci ho guadagnato che ho una regola semplice, perché questo vuol dire che **dopo** (quindi portando questa parte a destra), **dopo = prima + un fattore che è sempre costante A**.

Quindi l'università mi versa lo stipendio, oppure viceversa, sono le vescicole piene di neurotrasmettitori che hanno inondato lo spazio intersinaptico e si sono legati a questi recettori di cui sto descrivendo la frazione. Dopodiché però qui fra una e la successiva continua a decrescere, continua a decrescere esponenzialmente. Qui continuo ad avere l'*income* dall'università e qui decresco.

Il Regime Stazionario Dinamico A un certo punto (e questo ovviamente vale a rigore soltanto se le delta di Dirac sono equispaziate, adesso qui graficamente l'ho fatto tornare perché sono pigro, l'ho fatto tornare dopo due o tre... dopo due o tre delta di Dirac), a un certo punto vedete che la delta di Dirac successiva avviene, arriva più o meno sempre allo stesso momento. Quindi è

come se ci sia una ripetizione, quindi è come se questo va giù e poi torna su. In questo tempo, che so essere $1/f$, questo valore qui so essere il valore che era... lo stesso valore che era qui. Supponete questo lo chiamo... come lo chiamo? Lo chiamo \bar{x} (x barrato). Questo lo chiamo \bar{x} perché, di nuovo, è una specie di equilibrio dinamico. Continua a ripetersi in modo sempre uguale a un certo punto. Lo fa perché continua a insistere sulla coda residua, però allo stesso momento. Quindi questo punto qua lo chiamo $\bar{x} + A$. Questo decade a \bar{x} e questo punto qua sarà di nuovo \bar{x} più... punto... più A .

Se volete questa è un'ipotesi: io sto ipotizzando che esista un regime in cui questa cosa va su e giù e a un certo punto fa sempre la stessa cosa. Cioè dinamicamente è come se queste ampiezze di picco (oppure potreste vedere le ampiezze invece di... i minimi, oppure potreste vedere l'ampiezza intermedia), più o meno sono la stessa cosa. E l'unica domanda è: ma qual è \bar{x} ? \bar{x} , io lo so scrivere, perché è $(\bar{x} + A)$ (che è il punto iniziale... sto pensando a questa... questo k è il valore che assume la funzione quando t è 0; t in questo caso è l'intervallo, è come se fosse un... io avessi preso questa variabile t , adesso questo è 0 e questo è $1/f$). Io so che è passato $1/f$, e $1/f$ millisecondi prima questo valore era $\bar{x} + A$. E quindi qui scrivo: per $e^{-\beta \cdot (\text{quanto tempo è passato})}$, $1/f$.

Da qui mi basta rendere esplicito \bar{x} , perché per esempio voglio scrivere qual è l'espressione di questo valore in basso, \bar{x} . Ma potrei aver scritto in modo diverso, potrei fare x di nuovo, il picco o il valore intermedio. Quindi quello che faccio è scrivere:

$$\bar{x}(1 - e^{-\beta/f}) = A \cdot e^{-\beta/f}$$

Ho portato al membro di sinistra questo \bar{x} , fattorizzandolo. Questo moltiplicava questo esponenziale, quindi l'ho portato a sinistra ed e compare qui in questa parentesi. E a destra scrivo, rimane A per $e^{-\beta/f}$. Quindi \bar{x} diventa una specie di funzione di f :

$$\bar{x} = \frac{A \cdot e^{-\beta/f}}{1 - e^{-\beta/f}}$$

Adesso non vi stresso ulteriormente, anche se, credetemi, se provate a farlo voi, a ragionare... In teoria potreste anche provare a scrivere del codice per rendervi ragione del fatto che con questa regola (quindi 1 più 2), che incidentalmente è simile a quello che scrivereste per il calcio intracellulare nell'adattamento frequenza-dipendente, ma è una cosa diversa... qui stiamo parlando di sinapsi e non stiamo parlando del mio conto corrente perché io non spendo tanto quanto, proporzionalmente a quanto ho. Con queste due regole vi potreste rendere conto che quando c'è un regime uniforme, una frequenza uniforme di attivazione presinaptica, a un certo punto questo transitorio, se strizzate gli occhi, vedete che c'è una specie di banda. E si dimostra che questa banda è dell'ordine di $1/\beta$, ma non importa. A un certo punto avete un regime e questo regime potreste descriverlo come il valore medio, il valore di picco, quello che è, è una funzione di f .

Questo non lo faccio, ma se f è particolarmente grande, se la frequenza è elevata (che nella vostra mente potrebbe dire: questo fenomeno si verifica rapidamente, perché elevato vuol dire elevato rispetto a β , cioè vuol dire che la nuova delta di Dirac arriva prima che la coda si sia esaurita completamente)... Fortunatamente

io sono parsimonioso, quindi lo stipendio successivo non arriva trovandomi proprio a... mi trova che... quindi per questo che io riesco a risparmiare, spero che queste cose stupide possano essere utili. Quindi qui in effetti mi sta dicendo che io sto risparmiando a un certo punto, però più di tanto non è che il mio conto corrente aumenti... Ok, il mio conto corrente potrebbe aumentare se le entrate fossero superiori alle uscite. Ma qui ho che la perdita è proporzionale a quanti i recettori sono in quello stato, per definizione di azione di massa. È per questo che c'è uno steady state.

E quindi quando f è sufficientemente grande rispetto a β (vedete qui che avete β diviso f), potete approssimare l'esponenziale con il primo termine di Taylor. Non lo faccio, potete provare e vedete che vi viene un'espressione in cui \bar{x} è uguale, è proporzionale a f . E questa è una cosa, ripeto, interessante perché mi dice che questa banda, grosso modo, sale o scende a secondo di quanto è f .

Ovviamente nel caso vero, non è vero che le sinapsi sono sempre guidate, sono sempre attivate da un treno di potenziale d'azione a frequenza uniforme. Anzi non lo sono mai. Tuttavia qualcosa di simile in un regime che non è deterministico ma è stocastico, quindi in cui i momenti sono imprevedibili però avvengono con particolari condizioni di distribuzione di probabilità, lo stesso tipo di ragionamento può rendere ragione del fatto che la sinapsi in qualche modo risponde in modo proporzionale a quella che è la frequenza. Questo è un argomento più avanzato per cui non ha senso stressarvi adesso. C'è ancora la lucetta verde? Sì? Grazie.

Plasticità Sinaptica e Apprendimento

Ora, sembra (oramai lo sappiamo dagli anni '70, quindi sono più di 50 anni, dagli anni '70 e da anche scoperte relativamente recenti) che la trasmissione sinaptica è, rispetto a tutte le cose che vi ho descritto, biofisiche, biologiche che vi ho descritto fino a questo momento, una delle sedi in cui l'esperienza o in generale l'attività elettrica cambia la struttura. Quindi sto parlando di **plasticità**, sto parlando in effetti di... sto evocando il tema dell'**apprendimento**, che non è equivalente necessariamente alla plasticità sinaptica.

Questa è una cosa molto interessante, molto profonda, perché apprendere delle memorie, dei concetti e poterli rievocare, non nasce immediatamente dalle conseguenze di dire: "Guardate che T_{max} potrebbe cambiare nel tempo, oppure \bar{G} (che era la conduttanza massima o il numero massimo o la conduttanza massima di recettori post-sinaptici AMPA) potrebbe non essere fissato, potrebbe cambiare nel tempo". Magari cambia molto lentamente, non cambia su una scala di tempo di millisecondi, cambia su una scala di tempo di minuti, di ore.

Voi mi vedete, imparate (spero) e qualcosa vi resta in mente (se non altro la storia del conto corrente bancario, che spero insieme alla storia del leccarvi il sudore, sia oramai indelebile). Quello sicuramente non è avvenuto istantaneamente. Può essere che però adesso mi abbiate dedicato un'espressione genica in cui nuove proteine, nuovi canali sinaptici, nuovi recettori sinaptici sono stati inseriti nelle membrane post-sinaptiche, perché quel concetto doveva essere potenziato.

Alla base di questo (che ripeto non è così scontato sulla base di queste considerazioni) ci sono due fenomeni che si chiamano plasticità sinaptica (quindi non è

necessariamente equivalente ad apprendimento, però ne è il probabile substrato cellulare). E sono di due tipi; quelli che esaminiamo oggi sono di due tipi: si chiama plasticità **omosinaptica** e **eterosinaptica**. Non ha nulla a che fare con le preferenze sessuali, ma come in quel caso, qui ha a che fare con qualcosa che non comprende il neurone presinaptico... scusate, non comprende la coppia pre- e post-sinaptico, mentre eterosinaptico vuol dire che comprende l'attività fra neurone presinaptico e post-sinaptico. Diventa chiaro in un attimo.

1. La **plasticità omosinaptica** viene anche definita **plasticità a breve termine** (*Short-Term Plasticity*). E vi mostro e commentiamo e studiamo assieme quella che è la depressione a breve termine e la facilitazione a breve termine.
2. Mentre per la **plasticità eterosinaptica** viene anche chiamata e attribuita a caratteristiche di *long term plasticity*, **plasticità a lungo termine**, e ha a che fare con una (o è necessaria, una condizione necessaria alla sua espressione) una co-attivazione o una relazione, una correlazione fra l'attività presinaptica e post-sinaptica. Questo non c'è nella plasticità omosinaptica, che è più solitaria, mentre eterosinaptica vuol dire che c'è chi parla e chi riceve devono fare qualcosa (tipo la storia dell'NMDA, del recettore NMDA).

E quindi parleremo della plasticità sinaptica a lungo termine dipendente dal *timing* (dipendentemente dalla temporizzazione degli spike) e di quello che viene chiamata redistribuzione dell'efficacia sinaptica.

Plasticità a Breve Termine: Inerzia e Risorse Limitate

Una cosa importante da realizzare (probabilmente un ingegnere non lo realizza perché per lui la trasmissione sinaptica è un guadagno, è un valore simile a un fattore di amplificazione, oppure al valore di un resistore su un filo, la resistenza di un filo che quella è, e ok, io metto un segnale, il segnale a destinazione diventa amplificato o attenuato, però non cambia nel tempo, quello che cambia magari è il segnale). Invece le sinapsi, che sono degli oggetti, come detto, sono probabilmente gli organelli più complessi che esistano in biologia, su tutti gli esseri viventi, hanno una certa dinamica, latenza, inerzia. Ci vuole un po' di tempo perché si esprima, si sintetizzi del neurotrasmettitore, per cui queste vescicole vengono impaccate, vengono poi ancorate nella membrana presinaptica.

Un'analogia di nuovo disgustosa e stupida è quella del **lama**, dell'animale lama che credo (alcuni lo fanno, io non l'ho visto fare) sputa. La sinapsi sputa. Se voi chiedete al lama di sputare con una certa frequenza, e la frequenza è molto elevata, potrebbe il lama avere un'arsura nella sua bocca e semplicemente non avere più saliva da sputare (cosa disgustosa, con rispetto per gli animali lama), per rendervi partecipi del fatto che questo non è un sistema... non è un filo, è un sistema dinamico.

Poi come potrei essere io con la mia voce (sono un po' raffreddato ma penso che me la sto cavando), in cui adesso sono ok, ma alla terza e alla quarta ora la mia voce con l'attività sarà molto più bassa. Questo indipendentemente dal fatto che voi parliate, siate attenti oppure no. È solamente un mio problema, un problema legato alla mia capacità di fare *replenish*, di ripristinare le mie risorse in termini generici (non dico che cosa sono), le risorse per la mia neurotrasmissione.

Depressione Sinaptica (Short-Term Depression) E quindi queste sinapsi hanno fatica, inerzia o **depressione**, quindi depressione delle risposte durante un'attivazione ripetuta. Quindi se il neurone presinaptico, per i fatti suoi, ha un'attività, una frequenza di, che ne so, 50 spike al secondo, può essere che siano troppi per le sinapsi. Possono essere troppi per le vescicole sinaptiche ancora prima dei recettori. I recettori magari si desensitizzano per i fatti loro, ma io potrei non avere più alcun neurotrasmettitore da rilasciare perché mi sono proprio [perso] la voce.

Facilitazione Sinaptica (Short-Term Facilitation) Tuttavia, come qualche volta mi succede (sicuramente succede anche a voi), lo stesso sistema dinamico può invece mostrare un comportamento duale di non una depressione delle risposte, ma una **facilitazione** alle volte. E immagino che la speranza è che lo possiate fare anche durante il corso di colloquio in bioingegneria, in cui chiedo agli studenti di fare una presentazione all'esame, di organizzarsi in gruppi durante quando vengono gli speaker e quindi di iniziare a mettervi in gioco, a fare presentazioni. È utile, colloqui di lavoro e altro, non ve lo devo dire. Potrebbe esservi già capitato per esempio nella vostra difesa della tesi di bachelor che all'inizio eravate parecchio nervosi e poi vi siete riscaldati.

Quindi questo contesto di riscaldamento o di depressione ha soltanto... è sul breve termine, perché se mi lasciate un pochino di tempo senza parlare, la voce mi ritorna. Viceversa, se voi siete belli gasati perché siete nel mezzo della vostra presentazione e io vi metto a dormire, tornate a un certo valore basale di ansia verso confidenza. Quindi è indipendente da quello che fa l'*audience*, è indipendente da quello che fa il neurone post-sinaptico. Se fosse dipendente sarebbe un processo di plasticità eterosinaptica, perché coinvolgerebbe entrambi chi parla e chi ascolta. Qui è soltanto chi parla: se chi parla parla troppo, parla troppo frequentemente e gli viene depressione o viceversa gli viene facilitazione.

Evidenze Sperimentali: Connessioni Piramidali e Interneuroni

Questa cosa della depressione a breve termine è in realtà un'osservazione relativamente recente degli anni 90-2000, ma non è una sorpresa perché la gente che studiava la giunzione neuromuscolare lo sapeva da sempre, dagli anni '70, che quando il rilascio di acetilcolina produceva una contrazione muscolare, a un certo punto le fibre nervose dell'aggiunzione neuromuscolare potevano semplicemente esaurire l'acetilcolina. Potete provare, anche se dal punto di vista muscolare avete anche l'insorgenza di acido lattico, e quindi avete anche altri meccanismi, addirittura altri meccanismi di desensitizzazione delle fibre nervose (quindi in qualche modo anche degli assoni), però in qualche modo se voi provate a fare un'azione muscolare "dà e dà", a un certo punto non riuscite più a farla. Ripeto, in quel caso è più per l'acido lattico nel muscolo, ma il concetto potrebbe essere a voi familiare.

Quindi questo è un esempio, non nell'aggiunzione neuromuscolare, ma fra sinapsi glutammatergiche fra due neuroni piramidali della corteccia somatosensoriale di ratto. Qui vedete due cellule, una è di colore verde (sono delle ricostruzioni tridimensionali), una è verde e una è nera, sono molto molto vicine, i loro soma sono molto vicini. Lo sperimentatore aveva due pipette, una nel soma, nella pancia del neurone nero e l'altra nella pancia del neurone verde e in uno di

questi (come nell'esperimento che vi ho fatto vedere la volta scorsa), anziché però dare solamente una "schicchiera" per produrre uno spike presinaptico, lo sperimentatore ha dato un treno. Credo che siano dieci, tre, quello che è, più ha lasciato trascorrere forse 800 millisecondi o giù di lì, e poi ha dato un'ulteriore schicchiera per far emettere un potenziale di azione ulteriore. E ha misurato il potenziale di membrana post-sinaptico.

La cosa è più interessante rispetto all'altra volta. L'altra volta si vedeva soltanto che, fondamentalmente facendo sparare uno spike, vedevi se il neurone post-sinaptico era collegato oppure no (che aveva un'importanza notevole, permetteva in parte di desumere il connettoma a livello cellulare, vi ho raccontato). Qui, sorprendentemente, la gente (non so come mai ci è venuto fino al '97, alla fine degli anni '90, perché la gente non desse solamente un impulso... la gente magari ne dava due, ma dai un treno e magari cambia anche la frequenza, così magari puoi studiare il comportamento frequenza-dipendente della sinapsi).

Per farla breve, quello che si vede nel neurone post-sinaptico è una progressiva diminuzione. Questi sono potenziali eccitatori post-sinaptici, qui la cellula è semplicemente registrata in cosiddetto *current clamp*, a -70 mV, a -60, quello che è, e di nuovo qui l'ampiezza di questi eventi è piccola piccola, sono eventi sinaptici, sono molto molto piccoli. Si stanca. Ma se aspettate un po', quindi c'è un periodo di pausa, vedete che l'ampiezza della risposta allo spike ennesimo, successivo, è molto maggiore rispetto all'ampiezza dell'ultimo del treno, non ancora completamente ripristinato, non completamente recuperato rispetto all'ampiezza del primo. L'ampiezza del primo è più alta perché lo sperimentatore aveva aspettato qualche minuto prima di riprendere la stimolazione. Quindi in effetti questa traccia che vi sto mostrando è la media di diverse ripetizioni e fra una ripetizione e l'altra lo sperimentatore ha aspettato magari non qualche minuto ma sicuramente qualche decina di secondi.

Specificità del Target: Depressione vs Facilitazione La cosa interessante è che se questo stesso neurone (supponete il neurone nero, che è questo qui che ho fatto sparare, quello che è presinaptico) per caso proietta (qui non credo che sia qui, forse apparirà a destra, ma comunque), se proietta non soltanto a un altro neurone piramidale, ma proietta a un **interneurone**, a un altro neurone in particolare si chiamano **basket cell** (sono cellule a basket, a canestro, non lo so), nelle loro vicinanze, sono tipicamente neuroni inibitori. Io sono un piramidale, sono eccitatorio, proietto (ripeto questa è la **legge di Dale**: se io sono eccitatorio, glutammatergico, tutti i miei bottoni sinaptici sono glutammatergici), quindi rilascio, sputacchio a quell'altro neurone con una sinapsi a quell'altro neurone piramidale e la sinapsi però si deprime.

E ha un altro target post-sinaptico (sono sempre io, quindi sempre io rilascio glutammato), ma la sinapsi verso quell'altro neurone, guardate cosa fa? In effetti si **facilita**. Non è così tanto diversa in ampiezza rispetto allo stesso ordine di grandezza di una frazione di millivolt, però è un comportamento del tutto diverso: tende a essere, a facilitarsi, man mano che... quindi non a spegnersi progressivamente per la fatica, ma a "gasarsi". E se uno aspetta un certo intervallo di tempo, praticamente l'ampiezza della risposta (quindi la risposta allo spike ennesimo) diventa paragonabile o su per giù paragonabile con la prima.

- **Depressione (Piramidale-Piramidale):** Qui ho arsura e non ho più saliva, non ho più le risorse, quindi le vescicole di neurotrasmettitore probabilmente si sono esaurite, sono vuote, non hanno ancora avuto il tempo per ripristinarsi. Sì, il meccanismo è molto veloce, però potrebbe essere non così veloce a questa frequenza (che credo che sia... Dunque, ci saranno 4 o 5 spike in 200 millisecondi, quindi sono 25 Hz, potrebbe essere. Sto pensando di se questo fosse invece 1000 millisecondi sarebbe facile... quindi potrebbe essere, quindi da 200 per arrivare a 1000 devo moltiplicare per 5, quindi sarebbero sì, attorno a 20-25 Hz). Quindi non stiamo parlando di centinaia di Hz come nel caso precedente in cui l'AMPA si desensitizzava. Qui già a frequenze fisiologiche, 25 Hz è ok, anzi anche 20 Hz è ok, le sinapsi hanno un comportamento fortemente tempo-variante.
- **Facilitazione (Piramidale-Interneurone):** E in questo caso idem, qui non è arsura, qui è probabilmente (questo vi sto dando due spiegazioni) qui è probabilmente l'**accumulo di calcio intracellulare**. Sapete che il rilascio di queste vescicole dipende dall'influsso di calcio, può essere che esista del calcio residuo nel bottone sinaptico, per cui permanga e se permane potrebbe rendere più facile il rilascio quando c'è un ulteriore influsso di calcio.

La vera domanda è: ma perché due bottoni sinaptici che vengono dallo stesso assone, dello stesso neurone presinaptico, in un caso fanno depressione, in un caso fanno facilitazione? Nessuno lo sa. Sembra esserci una specificità del tipo di sinapsi sulla base dell'identità del target, dell'interlocutore.

Interpretazione Funzionale della Specificità della STP

Di nuovo, con un'interpretazione in parte probabilmente superficiale: se io sono eccitatorio e proietto a un altro neurone eccitatorio, forse è meglio che il mio canale di comunicazione, visto che è glutammatergico, perda forza. Perché nel caso di connessioni ricorrenti potrebbe facilmente esplodere; potrebbe essere questo un **feedback positivo** e potrebbe esplodere. Quindi se io ho un meccanismo per cui mi viene "arsura", mi va via subito la voce, può essere che io riesca a interrompere eventualmente una **seizure**, una crisi epilettica.

Forse questo è esattamente per lo stesso motivo [che accade l'opposto con l'interneurone]: io, glutammatergico, eccito te che sei inibitorio, che sei GABAergico, e il tuo ruolo è probabilmente quello di fare da paciere, da inibire tutti quanti. Perché magari io posso essere impazzito. Anche di nuovo, se queste frequenze non sono elevatissime, potrebbe aver senso che io continuo a facilitare risposta dopo risposta. Perché mentre qui sfavorisco l'eccitazione (l'emissione di uno spike da parte del neurone post-sinaptico), qui onestamente un EPSP di 2-3 mV non fa sparare un neurone; al massimo se sono a -60 mV lo fa arrivare a -65 mV. Ok, se fossero più neuroni simultaneamente forse sarei vicino alla soglia e potrei sparare, però può essere che se questo primo EPSP mi faceva arrivare alla soglia, l'ultimo sicuramente non me la fa [nel caso della depressione], quindi posso interrompere così, anche senza andare completamente senza voce.

Qui [nel caso della facilitazione], se gli EPSP sono, di nuovo, sono potenziali eccitatori post-sinaptici (depolarizzano il neurone), però il neurone post-sinaptico è inibitorio, a un certo punto (e questo si vede sperimentalmente), se io continuo,

a un certo punto una sinapsi... io a lui riesco a far sparare il neurone inibitorio. Quindi devo sparare tante volte (e non sto parlando qui di sommazione temporale, ma sto parlando semplicemente di questa facilitazione). Può essere che quindi sia evolutivamente proficuo che, quando io sono magari impazzito, la sinapsi con un interneurone inibitorio sia particolarmente attivata, così il neurone inibitorio GABAergico si attivi, spari e, visto che lui di mestiere rilascia GABA, silenzia tutta la rete.

Di nuovo, la cosa interessante è che questo è calcio-dipendente e sembra essere di nuovo... qui è il grafico in cui l'neurone piramidale rispetto all'interneurone ha addirittura il potenziamento e poi addirittura uno spike; in caso di piramidale-piramidale una depressione.

La Sfida Sperimentale: Connettività e Multi-Patch

Questa fu una scoperta abbastanza importante. Ripeto, è banale nel caso della giunzione neuromuscolare, ma nessuno per qualche motivo l'aveva osservato fra i neuroni del sistema nervoso centrale. Uno dei motivi è che, come vi ho detto l'altra volta, visto che questi neuroni piramidali (o il neurone piramidale e questa cellula che probabilmente non è una *basket cell*, ma è una cellula di **Martinotti**, si chiama, è un interneurone GABAergico che sta vicino allo strato 5; questo è lo strato 5 dove ci sono i soma di queste cellule), la **probabilità di connessione** è molto, molto bassa.

Quindi la gente almeno deve avere due pipette, due elettrodi, due amplificatori, due micromanipolatori. E vi ho detto l'altra volta che se avete solamente due micromanipolatori, due pipette, due amplificatori, siete destinati a trovare poche coppie connesse. Se invece avete 4 o 6 o 8 o 10 o 12... se ne avete 2, 3, 4, 5, avete un numero che cambia quadraticamente [esponenzialmente nel parlato, ma intende combinatorio] di coppie possibili: $n \cdot (n - 1)$. Se con 2 ne avete solo 2 possibilità, con 3 ne avete già 6, con 4 diventano 12: avete già aumentato di un ordine di grandezza.

Questo tizio, **Henry Markram**, che è stato il mio advisor al mio secondo postdoc all'EPFL a Losanna, aveva un setup... è un artista, ha le mani di un violinista. Perché per avere questa capacità di (nonostante siano dei controlli, quindi voi forse sareste più impressionati da un *gamer* che gioca rapidamente), la stessa classe, lui riusciva a mettere le pipette rapidissimamente nel soma di questi due neuroni senza perdere l'altro *patch*, senza introdurre vibrazioni. E ne aveva quattro, e quindi ne aveva più degli altri ed è riuscito a trovare facilmente e a descrivere questo fenomeno che magari gli altri vedevano una volta ogni due o tre mesi.

Sinapsi Dendro-Dendritiche nel Bulbo Olfattivo La cosa interessante è (forse devo fare la pausa, quindi vi dico semplicemente che) anche nel **bulbo olfattivo**, in tipi cellulari che si chiamano **cellule mitrali**, si ha la stessa cosa. Una cellula mitrale ha un target, ha un comportamento (che qui si vede male perché è una schifezza) depressivo, e in altri ha un comportamento facilitativo. La cosa interessante delle cellule mitrali (forse ne parlavo con una delle vostre colleghe la volta scorsa) è che qui le sinapsi sono **dendro-dendritiche**: quindi non sono le vescicole di neurotrasmettitore alla fine dell'assone, ma sono nel

dendrite. Semplicemente un altro esempio.

Mi fermo per dieci minuti, scusate se ho l'entusiasmo per le sinapsi. Grazie.

(Intervallo / Risposta a una domanda durante la pausa)

Grazie. No, è la dinamica di quello che succede nel bottone sinaptico, che può essere diversa per qualche motivo. L'effetto è sempre depolarizzante, perché vede che queste curve vanno sempre verso l'alto, mai verso il basso. È sempre qualcosa che depolarizza, però qui depolarizza con ampiezze sempre decrescenti. Qui invece depolarizza però con un *build-up*. È come se io parlassi a lei e adesso veramente la voce mi sta andando via, mentre qualcun altro sentirebbe la mia stessa voce (perché sono sempre io che la emetto dal mio soma, la sparo) e il suo collega invece la sente che inizio a gridare, grido sempre di più. Però non è nelle orecchie di chi riceve, è nella bocca di chi parla; e io avrei due bocche, però le bocche sono attaccate alla stessa faringe in qualche modo, allo stesso soma, viene fuori dalle stesse corde vocali. È lo stesso neurone che proietta qui.

Codifica dell'Informazione e Storia Sinaptica

Allora, questa cosa della plasticità sinaptica a breve termine è molto interessante quando pensate a un regime in cui i neuroni non sparano in modo così stereotipato come ve l'ho venduta finora (in cui la frequenza è uniforme), ma in generale se voi mettete un elettrodo in un qualunque punto nella mia corteccia, vedreste che un treno di spike realistico è simile a un **processo stocastico** piuttosto che a un metronomo che ha una frequenza fissa.

E questo vuol dire che istante per istante, se voi di nuovo registrate nel neurone presinaptico e registrate anche nel neurone post-sinaptico (con tutta la difficoltà del caso, perché registrare il neurone presinaptico vuol dire beccare dei segnali che sono dell'ordine di 100 mV picco-picco, nel caso di attività cosiddetta sottosoglia... sottosoglia di eccitabilità, perché l'neurone post-sinaptico non sta facendo nulla quindi c'è l'eco dei singoli spike presinaptici e sono piccoli; qui non c'è la barra di calibrazione verticale ma questa cosa qua qui è dell'ordine di da -60 a -70 a +20; qui probabilmente è da -60 a -58, è una roba piccolina, infatti vedete che è molto rumorosa la traccia. Lo vedete in particolare qua che è una versione zoomata).

La cosa interessante è che uno potrebbe pensare che le sinapsi convertono in forma chimica quello che è lo spike presinaptico. Se guardate semplicemente qui questo esempio, vedete che l'ampiezza dei potenziali eccitatori post-sinaptici (questi sono sempre due neuroni piramidali dello strato 5, corteccia di ratto, somatosensoriale, la sinapsi glutammatergica e il neurone pre connette al neurone post; non so se c'è una sinapsi reciproca, anche il post connette al pre, ma comunque non lo vedrei perché il neurone post non spara mai, l'ampiezza è sempre piccola piccola)... E quello che vedete qua in questo esempio è che l'ampiezza parla forse, cambia nel tempo, e parla forse di una specie di **storia precedente** dell'attività del neurone presinaptico.

Quindi io ho questo bottone sinaptico e parlo con un qualche tipo di codice di cui, non so, probabilmente ha a che fare con la esatta temporizzazione, ha a che fare con la frequenza di sparo, probabilmente con tutte e due le cose (le informazioni si presume che siano codificate in entrambi gli aspetti). E a seconda, se volete, di quanto tempo è passato rispetto allo spike precedente, la sinapsi mia (io parlo) è quella che in qualche modo rilascia nel trasmettitore che dà luogo a delle ampiezze che sono sorprendentemente variabili, sorprendentemente che cambiano.

Quindi non solo c'è un'informazione potenzialmente codificata in questo treno di spike, che sembra essere una specie di stringa binaria, non lo so, qualcosa del genere. Qui c'è pure una specie di possibilità di codifica delle informazioni, in un modo che non sappiamo. Un termine definito da Markram anni fa era che ogni sinapsi non è semplicemente un fattore di guadagno, un cavo, ma è da un punto di vista di quella che è stata la storia precedente, seppure a breve termine, dell'attività elettrica del neurone che parla al neurone post-sinaptico. Quindi è molto diverso da dire "io emetto uno spike e tu sinapsi lo converti in un potenziale eccitatore post-sinaptico". No, in più stai dando un'informazione di quella che è la storia precedente, perché per esempio se qui questa ampiezza è piccola, è piccola perché ci sono state due attivazioni repentine subito prima. Ovviamente qui è un gran casino, questo probabilmente è un treno stocastico, eccetera eccetera.

Modellizzazione Cinetica della Depressione Sinaptica

Quindi vale la pena, perché no, con i soliti schemi cinetici (questa volta applicati in un altro contesto) di capirci qualcosa. Perché di nuovo, se riusciamo a mettere in un modo leggerissimamente più formale il fenomeno che vi ho descritto... Finora vi ho semplicemente raccontato quello che la gente ha visto: il fatto che si sappia che in parte è legato all'esaurimento di risorse di vescicole (che non ci sono più vescicole perché sono in numero limitato) oppure c'è un accumulo di calcio libero nel bottone presinaptico che cambia l'offset, rende molto più facile il rilascio; sono cose che sono venute dopo. E il vantaggio di poter, per esempio con degli schemi cinetici, dare una rappresentazione quantitativa, perché poi io la posso aprire, posso fare di tutto, posso in parte semplificarla ed estrarre di nuovo delle intuizioni, tipo quella che una sinapsi converte una frequenza in un livello analogico che ne è proporzionale.

Qui sto pensando, quindi descrivo soltanto la **depressione sinaptica a breve termine**. E di fatto, anche se è sbagliato (perché non sappiamo se il fenomeno che vi ho venduto fino adesso come depressione a breve termine sia totalmente un fatto presinaptico... intuitivamente vi ho detto che le vescicole sono limitate, quindi sto stressando il fatto che sia soltanto un fatto legato al bottone presinaptico; attualmente non sappiamo se c'è anche una dipendenza dal neurone post-sinaptico, in particolare dalla popolazione di recettori post-sinaptici; probabilmente sono due cose combinate).

Il Modello a Tre Stati (R, E, I) Tanto che in letteratura la gente ha detto: "Sai cos'è? Io descrivo genericamente quelle che sono le **risorse** per la neurotrasmissione". Voi mi direte: i neurotrasmettitori. Le chiamo risorse, così i *reviewer* di un articolo non mi possono attaccare, dicono: "Io non ho detto che

è un fenomeno presinaptico”. Per semplicità possiamo immaginare che stiamo parlando delle vescicole sinaptiche, presinaptiche.

E quindi queste vescicole presinaptiche, o meglio il neurotrasmettitore in esse contenuto, si può trovare in tre stati (di nuovo qui vedete l’approccio fenomenologico, non sto descrivendo in un modo biofisico). Sto semplicemente dicendo: guardate che possono essere in uno stato: 1. **Recovered (R)**: Viene anche detto *ready, releasable*, pronto a essere rilasciato, ristorato. 2. **Effective (E)**: In uno stato efficace, effettivo, in cui sono state rilasciate e sono disponibili a legarsi ai recettori post-sinaptici. 3. **Inactive (I)**: E poi possono essere in uno stato inattivo, per cui, per esempio, si stanno diffondendo lateralmente nel *cleft* sinaptico, nello spazio intersinaptico o sono in fase di *re-uptake*, di ripescaggio, per essere riciclate e rimesse dentro, re-impacchettate nelle vescicole.

Ci sono quindi tre stati e tre transizioni, non sono reversibili. Quindi se tu sei pronto per andare, quando c’è... questo è una probabilità di attivazione, la probabilità di rilascio, oppure un *rate* di rilascio. Storicamente è stata chiamata U come **Uso**, in modo barbarico, però è stato così. Quindi quando una vescicola è pronta all’uso, se con una probabilità di uso (chiaramente questa probabilità è normalmente zero e diventa diversa da zero quando c’è uno spike)... Di fatto questa cosa che vi sto raccontando è la storia del rettangolino di neurotrasmettitore, però con i controficiocchi, molto più sofisticato: lì era un rettangolino che va su, arriva a un millimolare, T_{max} e torna giù. Qui sto dicendo: con questa cosa qua, quel T_{max} lo rendo dipendente dall’attività precedente, dalla storia precedente.

Quindi qui quando viene usato, quando c’è uno spike, passa da “pronto” a “efficace”: il neurotrasmettitore viene rilasciato in modo molto molto veloce. E poi in modo altrettanto veloce ma un pochino più lento (con una cinetica che qui sto scrivendo come uno diviso una costante di tempo per poter saltare un passaggio e di fatto introdurre perché mi viene comodo intuitivamente parlare di costanti di tempo, di scale temporali), con cui avviene un fenomeno di **inattivazione** ($1/\tau_{inact}$). Oppure ancora con cui avviene un fenomeno con cui le vescicole che sono in uno stato non più funzionale, non più utile per legarsi ai recettori post-sinaptici, hanno un periodo, una scala temporale di **recupero**, *recovery* ($1/\tau_{rec}$), che di nuovo rende ragione di questa transizione con un *rate*, che è un rate, quindi non è un tempo, è l’inverso del tempo, è una velocità.

La cosa che noto è che ovviamente (altrimenti non l’avremmo vista se il lama o se Michele Giugliano non avesse bisogno di un certo tempo lungo per ripristinare le vescicole di neurotrasmissione, la saliva o la voce, non avremmo visto, non avremmo apprezzato la depressione a breve termine). Quindi è ragionevole assumere, perché è una conseguenza, che questa freccia qui, questa transizione sia molto più lenta. Quindi il valore qui di questa velocità sia piccolo, cioè la costante di tempo sia grande: la scala temporale è lunga, 500 millisecondi, contro questa, la scala temporale di inattivazione, che magari è di 1 millisecondo, 5 millisecondi. Il neurotrasmettitore sparisce subito, però poi impiega parecchio tempo, 100 volte più lentamente a essere recuperato.

Equazioni Differenziali del Modello

Quindi la prima cosa che faccio, adesso scrivo per ogni stato un'equazione differenziale. Però vedrete che inizia a fare un pochino caldo perché sono tre equazioni differenziali (in effetti sono due perché una è dipendente linearmente dalle altre), però sono brutte. Io vorrei avere una qualche espressione che mi dice: “Ecco, questa è l'ampiezza dell'impulso di un neurotrasmettitore sulla base della storia pregressa”. Però iniziamo.

La prima è, di nuovo, sono come se fossero delle taniche di acqua.

$$\frac{dR}{dt} = \frac{I}{\tau_{rec}} - U \cdot R \cdot \delta(t - t_{spike})$$

Quindi R diminuisce o aumenta? Diminuisce con questa freccia, in modo proporzionale a quanto liquido c'è, e aumenta, per quest'altra freccia entrante, in modo proporzionale dipendente da quanto I c'è. Quindi è meno U per R più I diviso τ_{rec} . Quindi questo l'ho scritto come “1 su” perché adesso è facile fare delle approssimazioni.

La seconda equazione è per E . E compare perché questa freccia entra e scompare perché questa freccia esce. La freccia che esce è facile: meno E per $1/\tau_{inact}$. E I più è U per R . Di nuovo iniziate a vedere che ovviamente c'è una qualche simmetria. Quello che esce qui entra qui.

$$\frac{dE}{dt} = -\frac{E}{\tau_{inact}} + U \cdot R \cdot \delta(t - t_{spike})$$

Quindi la I di nuovo aumenta perché E entra proporzionalmente a $1/\tau_{inact}$ e sparisce proporzionalmente a quanto I c'è con questa scala temporale. Quindi dI/dt più $1/\tau_{inact} I$ e meno $1/\tau_{rec} I$. Però per il momento le lascio così.

Simulazione e Separazione delle Scale Temporal E vi faccio vedere cosa succede se io prendo quelle tre equazioni e le simulo. Ovviamente la cosa che devo fare è prendere (se no il sistema va in un qualche *steady state* e non fa nulla di interessante), io prendo U e istantaneamente lo faccio diventare a un certo valore e poi lo riporto a zero. Questo mi simula l'arrivo di un potenziale di azione e mi simula il fatto che la probabilità di rilascio, rilascio sinaptico che alla fine è quanto è descritto da questa U , sia molto rapida. La probabilità di rilascio cambia, normalmente è zero (normalmente nella realtà non è proprio proprio zero perché c'è un livello basale... le sinapsi sono, l'ho detto ai vostri colleghi, sono un pochino incontinenti, perdono, quindi rilasciano vescicole anche quando non c'è un potenziale d'azione presinaptico). Però a questo livello e in questo contesto deterministico la parte del leone la fa il cosiddetto rilascio sinaptico evocato dall'attività presinaptica.

Quindi quello che ho fatto è mettere U a una qualche funzione che è 0 sempre, poi a un certo punto diventa a un certo valore, non importa il valore numerico, e poi torna giù. E quello che ho visto è che gratis questo sistema di equazioni mi portano ragione di una cosa che è molto semplice: cioè c'è uno **svuotamento rapidissimo di R** , del compartimento R , e poi c'è un **lento recupero**. E me lo immagino: la sinapsi ha queste vescicole, io ne ho fatte fuoriuscire un po', è

ovvio che quelle che sono rimaste [sono] diminuite, non sono più il 100%, sono diminuite. E per questo ciclo, che ho gratis con le equazioni cinetiche equivalenti a questo schema cinetico, inizia lentamente, con la stessa scala temporale di τ_{rec} , inizia a ritornare verso il 100%. Mi aspetto che arrivi al 100%, perché vorrei, mi aspetto che qui non ci sono altri rami. Quando U è 0, ok, se aspetto tanto tanto tempo, il 100% del (quindi la probabilità di occupazione diventa unitaria per R o in altri termini, tutte le vescicole, quindi sono tante, indipendenti, identiche) ritornano pronte per agire.

La cosa che vedo è per esempio che quelle efficaci (E) sono l'eco di questa diminuzione di R , perché E ed R hanno delle similitudini. Vedete però che è un pochino più lento rispetto a U . U è un segnale impulsivo, perché l'ho fatto io e l'ho voluto fare impulsivo perché volevo capire cosa sarebbe successo se dicevo "adesso rilascia le vescicole e poi mi faccio da parte". Questo che vedete è che la fase di salita di E è ripida e poi la fase di discesa non è istantanea. Non è istantanea perché questa costante di tempo $1/\tau_{inact}$ è sempre il solito giochino, la stessa equazione differenziale è sempre quello, sono esponenziali decrescenti. Ok, è parecchio più veloce di questa costante di tempo, di questo esponenziale che impiega tanto tempo a tornare al 100%, però sicuramente ha un tempo finito, non è la delta di Dirac che è istantanea.

Quindi di nuovo, la cosa che mi interessa è solamente... sono due cose che mi interessano per la mia successiva approssimazione: la inattivazione, il processo di inattivazione sono molto veloci e il recupero, il riempimento delle vescicole di neurotrasmettitore è molto molto lento. Tradotto in termini matematici, questa τ ha un valore numerico molto più grande di τ_{inact} . E l'altro elemento è che l'attivazione delle vescicole, questo qua, è rapidissimo.

Visto che sono di umore devoto a Dirac (che tra l'altro era un tizio molto curioso, molto interessante, ci sono dei libri sulla vita di Dirac, era un po' particolare), dico che è una **delta di Dirac** centrata, quindi shiftata, col meno (questo vuol dire che l'ho centrata all'istante generico di un potenziale d'azione presinaptico). E poi l'area di questa delta di Dirac la specifico: dico che è U grande, quindi fattore di uso, ma U grande, perché è una costante, mentre $u(t)$ è una funzione del tempo, U grande è un numero. Lo devo mettere perché altrimenti resterei con l'area di questa delta di Dirac che è 1, perché è proprio 1 e non 1,2 o 0,65 o 45. Quindi così fisso l'idea e quella è l'area della delta di Dirac.

Riduzione del Modello: Separazione delle Scale Temporali

Mi servono queste due informazioni e riesco a ridurre tre equazioni differenziali in un'unica sola equazione differenziale, che riesco a scompattare. Ok, per finire, questa è la I . La I è abbastanza noiosa, sembra in qualche modo ricalcare la stessa dinamica della R . Quello che sono inattivo, resto inattivo per tanto tempo, tanto quanto tempo impiego a recuperare. Quindi è come se qui ci fossero solo due meccanismi: uno, quello del nero e del verde che sono molto rapidi, e un'altra scala temporale che è quella del blu (ok, del rosso, però blu e rosso sono circa simili). Questa è una tecnica che spesso viene utilizzata in vari campi della fisica della biofisica che si chiama **separazione delle scale di tempo**. Io qua mi sto rendendo conto che ci sono due fenomeni che sono su scale di tempo diverse, quindi magari posso considerarne una immediatamente allo

steady state e l'altra invece che ancora deve iniziare a fare la dinamica. Adesso vi faccio vedere in che termini.

Quindi riprendo le equazioni e inizio a considerare questa equazione differenziale qui, quella della E . Qui l'ho semplicemente trascritta e una cosa che faccio semplicemente per comodità, ho moltiplicato adesso ambi membri per τ_{inact} , in modo tale che qui mi venga quel tipo di forma $\tau \cdot df/dt$, che può essere tipica, perché mi fa piacere vedere che qui c'è un tempo al numeratore e c'è un tempo al denominatore. In realtà, quello che sto dicendo è che se τ_{inact} , rispetto a tutte le altre costanti di tempo in questione, in particolare τ_{rec} , che è quella più importante, se è molto molto piccola, vuol dire che questa equazione qua (vi ricordate l'ingegnere "strizza gli occhi", dice questo è un *black box* la cui uscita insegue l'ingresso e insegue l'ingresso con questa costante di tempo). Se questa costante di tempo è molto molto piccola, uscita e ingresso sono praticamente la stessa cosa. In altri termini, questa equazione è già sempre allo *steady state*, cioè non cambia più, non c'è più dinamica, questa derivata la posso annullare e posso scrivere quindi che E , quindi questo secondo membro, è uguale a zero, cioè $E = U \cdot R \cdot \tau_{inact}$.

E mi sono tolto dalle scatole questa equazione differenziale. Ripeto, è un'approssimazione perché E non era istantaneamente una copia di U , aveva una certa codina, però io qua, con questo ragionamento, dico che è sufficientemente analoga a rappresentare una transizione.

Se voglio mettere, voglio legare le due cose, lo schema cinetico, recettore post-sinaptico aperto/chiuso, T_{max} a questo mondo, devo probabilmente dire: aspetta aspetta, prima che faccio altre cose, T_{max} ... e lo devo probabilmente mettere in analogia o legare al picco di questo impulsino di neurotrasmettitore, perché questo ha il significato di neurotrasmettitore in uno stato efficace, attivo, pronto per legarsi ai recettori post-sinaptici. È esattamente T , però mentre lì avevo il rettangolino, qui ho qualcosa che è un transitorio con un esponenziale che avete visto numericamente. Quindi quello che potrei fare è potrei dire: prendo il picco. Allora se avete una funzione che matematicamente è scritta così, allora io adesso qui lo vedo che il picco è il fattore che premoltiplica questa pizza qua. Ma se io non l'avessi, potrei dire, per mettere T_{max} qui, potrei dire che io prendo $E(t)$, che potrebbe non avere quella forma dopo la mia approssimazione, lo integro e poi divido per τ_{inact} .

Se voi prendete questa espressione qua, fate l'integrale da meno infinito a più infinito, fate l'area sottesa, l'esponenziale lo sapete fare perché l'integrale dell'esponenziale è ancora un esponenziale, a parte un fattore che cancella quello che si avrebbe derivando la funzione primitiva, ed è questo il termine che metto per compensare il termine che ottenete facendo la derivata. Scoprite che facendo l'integrale e dividendo per τ_{inact} trovate esattamente il picco, perché in altri termini se prendete soltanto un esponenziale così diviso per τ_{inact} ha un'area, è una funzione che ha un'area unitaria.

In altri termini, io voglio metterci questo picco, e qua sto pensando: questo somiglia tanto a un singolo esponenziale, però in generale adesso qui ho fatto casino, non ho più un esponenziale, ho U , che è una delta di Dirac, o R , che è una funzione del tempo, ok, questa è una quantità. Quindi cosa devo mettere qui a T_{max} ? Con questo accorgimento posso dire: fai l'integrale di E . Qui l'integrale

è solo... quindi è solo... ok, non è banalissimo, non è banalissimo. Dico che, visto che qui c'è una delta di Dirac, l'integrale tira fuori il valore della funzione R , che è sotto l'integrale assieme alla delta di Dirac, e mi dà il valore della funzione R in quel punto. Questo è di nuovo... è utilizzato è un'euristica fatta sulla base della definizione di delta di Dirac e si appoggia su un'interpretazione grafica. Se io avessi scritto direttamente di botto: “mettete qui anziché T_{max} mettete U grande per R al momento dello spike”, voi avreste detto: “Ok, da dove viene?”. Viene da qua. Se fate così, nonostante questa approssimazione, continua ad avere un legame con quello che è il picco del neurotrasmettitore descritto invece da questo schema cinetico a tre stati.

L'Equazione delle Risorse (R) Questo tolto dalle scatole (quindi di nuovo qui ho il modo per legare i due mondi), ritorno perché sono rimasto con due equazioni differenziali, io vorrei averne una. Quindi qui è quello che rimane, ovviamente è un'approssimazione, rimane dall'equazione differenziale che era dR/dt . Adesso utilizzo la famosa, solita espressione di conservazione della massa. In tutti gli schemi cinetici, un'equazione differenziale è combinazione lineare degli altri, perché alla fine o stai in R , o stai in E , o stai in I : devono sommarsi al 100%. Scusate se non vedo...

Quindi scrivo 1 come... Una di quelle quantità la scrivo come 1 meno il resto. Quindi I lo scrivo come $1 - R - E$. E lo so scrivere, R lo lascio indicato, semplicemente diventa $1 - R - U \cdot \delta$... perché E è approssimato. Ovviamente questa continua a essere un'approssimazione perché questa è un'approssimazione, però in realtà questa è un'espressione esatta, I uguale a 1 meno il complementare. Quindi, nell'ultima equazione che rimaneva, io avevo R , che diminuiva proporzionalmente con la U (U per R , qui adesso ho scritto U grande per delta di Dirac R), e avevo un termine entrante che era dovuto a I . Però adesso I lo scrivo come $1 - R$ (trascurando E perché è molto piccolo nel tempo), e quindi riesco a fattorizzare e scrivere un'unica equazione differenziale in cui al membro di destra ho solamente R .

Quindi non ho più altre incognite, mi basta R , che è la quantità di neurotrasmettitore nello stato recuperato, che ha una certa dinamica lenta e che si comporta... se voi immaginate che non ci siano degli spike, questa roba qua la togliete, sono distante da dove c'è uno spike, quindi quel termine è nullo. Quindi se questo termine nullo moltiplica per 0 anche questo R ... è leggermente più fastidiosa dell'equazione del conto bancario eccetera che vi ho fatto vedere prima, perché qui l'input è moltiplicativo e qui non ho scampo, l'input lo devo tenere moltiplicativo. Quello che resta è:

$$\frac{dR}{dt} = \frac{1 - R}{\tau_{rec}} - U \cdot R \cdot \delta(t - t_{spike})$$

Guardandola io posso dire: “Ma sì, certo”, a parte il meno che mi rende felice perché alla fine non esplode nulla, è un'equazione differenziale che normalmente ha degli archi di esponenziale (non so se vanno in giù o vanno in su, ma sono sempre degli archi che poi saturano), e allo *steady state*, se non ci sono input, questo va a 1. Come lo so? Se c'è lo *steady state*, R è costante, quindi la derivata è 0, e questo termine qua si annulla quando il numeratore si annulla, cioè quando $R = 1$. In altri termini, questo pezzo qua mi rende ragione del

fatto che adesso R parta dove deve partire (R sempre fra 0 e 1 perché è una frazione, e questa è una costante che vale quando lavoro con gli schemi cinetici). Parte da dove parte e poi lentamente, con la costante di tempo τ_{rec} , ritorna al 100%, che è quello che vedevo nella traccia (non mi ricordo se era rossa o no, era blu prima). R , anche se prima era il modello completo, senza avere alcuna approssimazione, quello faceva. Partiva, era immediatamente, drammaticamente diminuito dovuto all'uso e poi tendeva a recuperare.

Ora, questo termine qua, al di là del fatto che voi potreste dire: “Ok, ho spento il cervello come mi hai detto di fare, è venuto fuori questa cosa quindi credo che sia equivalente”, però intuitivamente questo tuttavia ha senso. Non posso banalmente fare, per rendermene conto, fare l'integrale di ambo i membri. Qui lo saprei fare (teorema fondamentale del calcolo integrale, la primitiva, ok); qui farei esattamente la stessa cosa (continuità, l'integrale su un insieme di misura nulla e quindi è zero). Qui mi frego, perché qui è l'integrale ma c'è R e non si fa così. Si fa separando le variabili, ma non lo facciamo.

Quello che vedete è che qui è una quantità tutta positiva. La delta di Dirac è una roba che va all'infinito. U è una probabilità di rilascio, presumibilmente è una quantità positiva. R è una quantità fra 0 e 1. Qui c'è un meno: quando c'è la delta di Dirac, qui c'è una fortissima sottrazione di quantità e quindi R , che prima era a viaggiare al 100% perché era lo *steady state*, inizia istantaneamente ad abbassarsi. Però c'è R , cioè lo fa proporzionalmente con quanto R c'è. Cioè se immaginate che ci sia non solo uno spike, ma tanti spike presinaptici, non è che qui togliete, togliete, togliete come le spese di Amazon dal mio conto corrente. Qui la spesa dipende da quanti soldi ho: se questa R che è fra 0 e 1 tende a diventare piccola piccola piccola, diventa piccolo piccolo la quantità che gli sottraggo. Alla fine se io ho poche risorse di neurotrasmissione nel mio bottone sinaptico, qui lui dice: “Guarda che devi darne...”. Un altro modo per leggere la probabilità: la probabilità del 0,5 vuol dire il 50% le devi dare. No, è il 50% di quelle che restano, perché è moltiplicato R . E ha senso. Se io non ne ho, io al massimo ne do una frazione. Non è che ne do un numero assoluto. Il fatto che ci sia “per R ” vuol dire che ne sto dando una frazione.

Steady State Dinamico e Dipendenza dalla Frequenza

Ok, questo era il passaggio intermedio che sarebbe dovuto apparire prima. Avendo fatto questa riduzione, un'unica equazione differenziale (non vi sto ad annoiare a fare carta e penna per vedere com'è), posso prenderlo e in modo analogo, simile a quello del conto corrente con questa coda, posso cioè dire: se l'attivazione presinaptica è un treno di impulsi a frequenza costante, di cui il periodo è $1/f$ (la frequenza f), posso calcolare quello che è allo **steady state dinamico**.

Prima l'avevo chiamato O_{ss} (*steady state*) ed era la frazione di recettori post-sinaptici. Qui, in qualche modo, sto pensando a qual è l'ampiezza di questi impulsi di neurotrasmettitore dovuto a questo meccanismo di depressione sinaptica. E quello che vedo viene fuori (non ve lo faccio), viene fuori un'espressione che non è proporzionale alla frequenza, nonostante io possa eventualmente fare l'espansione in serie di Taylor qui; è un po' più complicata rispetto a prima e rende ragione del fatto che se la frequenza... (quindi innanzitutto in qualche

modo, comunque dipende dal periodo; adesso scusate qui ho indicato il periodo T e disturba, devo cambiare questa slide e mettere $1/f$ perché se no T pensate che sia la concentrazione di neurotrasmettitore).

Questo R_∞ è il valore a regime, ed è quello, notate, che io mettevo qui. Quindi io qui a T_{max} metto $U \cdot R$, quindi R conta. E se fate esattamente la stessa storia di passaggio (è leggerissimamente più complicato per quel fatto di questo termine moltiplicativo, in cui la delta di Dirac non può essere fatto banalmente con quell'integrale), trovate che comunque è una dipendenza dalla frequenza. Quindi, e questo non è sorprendente, la quantità di neurotrasmettitore esso stesso dipende dalla frequenza di attivazione: non è una sorpresa, tanto più lentamente vai, tanto più questa quantità di neurotrasmettitore sarà pronta, sarà al 100%; quanto più alta la frequenza sarà sempre meno neurotrasmettitore rilasciato nello spazio sinaptico.

Però se guardate la specifica dipendenza dalla frequenza, e fate di fatto questo grafico in cui sull'asse delle x avete la frequenza (cioè 1 diviso il periodo) e nell'asse delle y avete questa quantità, vedete che c'è una regione per frequenza bassa in cui c'è una dipendenza della quantità di neurotrasmettitore con la frequenza. Quindi è una sinapsi che tende a diventare, a crescere con la frequenza. C'è però una certa frequenza in cui un certo regime (qui lo chiamano **supra-lineare**, **lineare** e **sublineare**), in cui la pendenza di questa curva tende a diminuire e a un certo punto satura. C'è una frequenza, per esempio, a cui la sinapsi diventa insensibile alla frequenza, per lo meno dal punto di vista della quantità di neurotrasmettitore.

La Sinapsi come Filtro Passa-Alto (Derivatore) Questo per esempio si vede qui: questo è un esperimento in cui la frequenza del neurone presinaptico è stata cambiata da 0 a 15 spike al secondo, 30 spike al secondo, 80 spike al secondo. E vedete, oltre al comportamento indicato qui (e questo rende ragione soltanto dello *steady state*, del fatto che qua sembra un comportamento che ha un transitorio integrativo, qua sembra che sia un comportamento, ok, proporzionale alla frequenza, va bene, il neurotrasmettitore c'è tanto di più quanto più è la frequenza, e poi questo neurotrasmettitore attiverà ulteriormente i recettori sinaptici che hanno pure una dipendenza dalla frequenza).

Ma vedete quale cosa molto interessante accade a una frequenza, a un salto di frequenza, da una frequenza di 30 spike al secondo a 80 spike al secondo. Avete un... quindi praticamente l'ampiezza cambia, ma è cambiata di poco. Ma il transitorio ha segnalato nella concentrazione di neurotrasmettitore la variazione. Quello che l'altra volta vi ossessionavo dicendo: guardate che l'adattamento frequenza-dipendente è un filtraggio ed è un filtraggio **passa-alto**, perché la natura è, dicevo, totale, sempre continuo cambiamento, quindi il sistema nervoso si è abituato, si è evoluto per scartare le cose che non cambiano nel tempo.

Qui avete di fatto lo stesso sistema a livello della singola sinapsi, che è una cosa pazzesca. Perché non solo è pazzesca di per sé (perché a livello di singola sinapsi), ma perché ogni singola sinapsi avrà potenzialmente una storia diversa, una storia dettata dal neurone presinaptico che la controlla. E comunque questo comportamento *high pass*, di passa-alto, di derivatore, cambia al variare della frequenza. Se la frequenza è bassa, qui è più simile a una integrazione lenta.

Quindi per farla breve: le sinapsi (che ne dicano i modelli *Large Language Model* e le architetture *Deep Learning*), in vivo, biologicamente, non sono dei pesi W che sono costanti nel tempo. Hanno loro stessi delle proprietà di filtraggio. Per chi di voi è particolarmente interessato (non sono sicuro che nei vari corsi di *machine learning* vi venga raccontato), provate a cercare le **KAN (Kolmogorov-Arnold Networks)**. È un'architettura diversa proposta da gente dell'MIT recentissimamente, qualche anno fa, due o tre anni fa. E in qualche modo lo stesso concetto di avere dei filtri e delle... Quindi non sono le sinapsi come pesi che cambiano i guadagni, ma sono delle computazioni temporali che sostengono alla possibilità dell'apprendimento, alla possibilità di approssimare delle funzioni. Non sto dicendo che le Kolmogorov-Arnold Networks implementino esattamente la depressione e facilitazione sinaptica, ma sono simili.

Ok, qui semplificando le cose diventa un'ulteriore legge: per frequenza molto elevata (ma a me interessava a tutte le frequenze) diventa $1/f$, che è questo andamento $1/f$, andamento a potenza, ma di cui non ve ne parlo.

Fenomeni di Rete: Up-States e Down-States

Prima di fare la pausa volevo dirvi brevemente che questa dipendenza dalla frequenza della quantità di neurotrasmettitore (che adesso l'abbiamo vista grazie a questa riduzione del modello in modo molto approfondito): praticamente abbiamo estratto quella che è potenzialmente una **primitiva computazionale**.

Se ve la immaginate semplicemente come qualcosa che quando c'è tanta attività spegne la voce (e quindi la sinapsi non trasmette più), potete immediatamente immaginare o capire perché se io pianto (o meglio se un PhD student che adesso è ricercatore all'Università di California in San Diego, Joao Couto), se metto dei **silicon probe**, degli elettrodi, nella parte di corteccia medio-prefrontale di un ratto anestetizzato (e visto che ognuno ha più di un sito di registrazione), quello che registro è un'alternanza fra epoche in cui c'è attività (**Up state**) e epoche in cui l'attività sparisce (**Down state**). Up, down, up, down.

E la stessa cosa se prendo una rete di neuroni *in vitro*, quindi non un sistema *in vivo*, complesso, ma prendo dei neuroni dissociati, le famose colture cellulari, le metto in un piatto di Petri (magari un piatto di Petri più... forse ve l'ho già raccontato, con degli elettrodi tipo "letto da fachiro", in cui tanti elettrodi detettano l'attività di tante unità). Posso in qualche modo intuitivamente apprezzare il perché l'attività consiste in epoche in cui tutti i neuroni sparano, poi le sinapsi si stancano e questi neuroni si staccano. Quando le sinapsi iniziano a fare *recover*, i neuroni possono connettersi di nuovo e l'attività non è più disordinata ma è sincrona (dappertutto quella specie di fuochi d'artificio rappresenta la visione dall'alto di questi elettrodi). Lo vedete bene adesso che arriva un cosiddetto **super burst**.

Questo è un fenomeno di rete, non sono i singoli neuroni che hanno per i fatti loro la proprietà di essere dei *bursting cells*, degli *intrinsic bursting*. È a livello di rete. Questa cosa della violenza degli schiafi, dei ceffoni che inizierei io, qui se la iniziano da soli: a un certo punto qui c'è un sacco di attività, ma si staccano i neuroni e sono silenziosi per un po', perché le sinapsi si sono stancate, si sono esaurite. E vedete attività spontanea, vedete che ci sono queste onde di attività sincronizzata, che arriva spontaneamente perché: 1. Il sistema è a temperatura

corporea, 37 gradi, quindi c'è rumore di canale. 2. Le sinapsi sono incontinenti, quindi c'è comunque rilascio sinaptico e quindi i neuroni post-sinaptici sono un po' attivati, un po' stimolati, anche se non c'è attività presinaptica. 3. E ultima cosa, la connettività (nella corteccia ve ne ho già raccontato, è attorno al 10%, eccetera): in queste colture è più elevata la probabilità di avere due neuroni a caso qui connessi, ed è del 30%, ed è una connettività ricorrente. Io connetto te, tu connetti... ma a un certo punto in qualche modo ritorna. È un **feedback positivo**.

Questa cosa del feedback positivo, con semplicemente l'elemento di cui potenzialmente abbiamo anche esaminato la componente dinamica (filtraggio passa basso, passa alto, che ve lo metto lì, non mi aspetto che lo digeriate così facilmente), ma semplicemente la storia che io mi stanco e non ho più neurotrasmettitore nel bottone sinaptico da sputacchiare, mi spiega gratis, istantaneamente questi fenomeni che sono molto importanti. Perché sia una rete di neuroni *in vitro*, ma sia più importante la corteccia di poco fa *in vivo*, è un modo di operazione di tutte le parti del sistema nervoso durante lo sviluppo e ogni notte quando dormite (non quando sognate, ma quando fate il sonno a onde lunghe, **slow wave sleep**). La vostra corteccia si sincronizza, le sinapsi si stancano e si spegne, si risincronizza, eccetera eccetera, e voi dormite.

Facciamo una pausa di 10 minuti. Grazie.

Meccanismi della Plasticità a Lungo Termine (LTP)

(Intervallo / Risposta a domande)

Credo, generalmente no, ok. Ok, allora, nella lezione di oggi e della volta scorsa, fondamentalmente abbiamo tirato in ballo, anche dal punto di vista quantitativo, diversi concetti. L'ultimo di questi era la **probabilità di rilascio**, che è quello più etero. Che cosa vuol dire la probabilità di rilascio? Sì, ok, la posso definire matematicamente, ma a che cosa la attribuisco? Questo è più complicato.

Sicuramente ho parlato delle vescicole, ho parlato del numero di, o comunque ho parlato della quantità di neurotrasmettitore che viene rilasciato (quindi in qualche modo quante molecole di neurotrasmettitore sono all'interno di ciascuna vescicola) e ho parlato di recettori post-sinaptici.

Nel caso di **plasticità a lungo termine** è concepibile che possano cambiare in modo persistente (non dinamico, non attività-dipendente come la storia della plasticità a breve termine, omosinaptica, in cui in qualche modo vi ho detto che c'è un qualche tipo di relazione fra la frequenza, la richiesta di uso e la quantità di neurotrasmettitore che è pronto per essere rilasciato). Ci può essere invece un cambiamento persistente, drammatico, strutturale, che potrebbe avere a che fare con:

1. **Numero di Recettori (N_{post}):** Per esempio, passando da 1 a 2, il numero di recettori post-sinaptici. Questo porterebbe a un cambiamento dell'efficacia sinaptica, un cambiamento della corrente massima sinaptica, perché cambierebbe \bar{G} (G-bar), cambierebbe il numero totale dei recettori post-sinaptici che è incapsulato dentro quel \bar{G} .
2. **Numero di Vescicole (N_{pre}):** Un'altra cosa che potrebbe cambiare è, passando per esempio da qui a qui, è il numero di vescicole contenenti

neurotrasmettitore. Quindi potrebbe essere che c'è un cambiamento strutturale in cui di fatto sarà T_{max} a cambiare. Vero, T_{max} è una quantità dinamica che dipende (in termini di plasticità a breve termine) dalla storia pregressa, però ok, ne avreste di più. Cambierebbe la quantità, un fattore di scala. Cambierebbe quindi la quantità o, se volete, potremmo dire potrebbe cambiare la probabilità di rilascio; ne avete di più vescicole quindi potrebbe cambiare.

3. **Conduttanza di Singolo Canale (γ):** Un'altra cosa che potrebbe cambiare (che qui non mi ricordo più in questa review... credo che sia, non mi ricordo da dove ho preso questo grafico qua, non mi ricordo chi è chi, qual era il passaggio, era molto elegante), potete anche avere un cambiamento non del numero di recettori, non del numero di vescicole, ma della conduttanza di singolo canale, per quella che viene per esempio chiamata **fosforilazione**. Quindi un qualche cambiamento strutturale persistente dei recettori che fa sì che in qualche modo il poro sia più largo.

In tutti questi casi questo cambiamento ha un corrispettivo di un cambiamento persistente che in qualche modo può essere considerato un **substrato della memoria**, un substrato di qualcosa che rende ragione del fatto che un animale (noi) possiamo memorizzare delle cose e tenerle per anche 80 anni. 90 anni, meno, dipende quando uno tira le cuoia.

La Legge di Hebb: Causalità e Correlazione

Una cosa molto importante nel contesto, diciamo, e alla fine se volete una specie di principio guida che è venuto fuori, è quello della proposta, della teoria di **Donald Hebb**, al fine degli anni '40 (o '50). Era uno psicologo, però aveva ben chiara la fisiologia del sistema nervoso, che allora all'epoca non era completa (non è nemmeno completa oggi, però non era così completa come adesso).

E Donald Hebb è ricordato per un principio che alla fine è distillato in questo modo (in parte orribile, perché non rende ragione di quello che poi poteva essere sia la sua intuizione, sia quello che poi è stata l'istanza delle cose). Lui aveva esattamente a che fare, aveva in mente parlare di concetti, di memoria, di cognizione; aveva idea che dovesse esserci un correlato neuronale, e in qualche modo concluse: **“Cells that fire together, wire together”**. Questo non funziona in italiano, cioè “se sparano assieme, si... spagan... spaghettono”, non viene in italiano. Cioè: **se spari assieme, ti connetti assieme**.

E quel discorso che ho fatto prima: potrebbe essere che ci siano dei meccanismi per cui se due neuroni (che per i fatti loro non sono neppure connessi, oppure sono connessi ma non necessariamente l'efficacia sinaptica di un neurone è tale da reclutare o influenzare, eccitandolo e inibendolo, l'altro neurone)... Se per caso c'è una qualche dinamica temporale in cui c'è una correlazione, una co-attivazione (magari in una certa relazione temporale, perché se io mi attivo adesso e un altro si attiva mezz'ora dopo, forse il legame causale nel nostro universo potrebbe non essere utile da ricordare), e questo potrebbe essere un modo per creare dei ricordi notando delle co-attivazioni, delle correlazioni che potrebbero diventare, come detto, **causazione**.

Lui non parlava necessariamente di concetti, nonostante fosse uno psicologo cognitivo, ma era letteralmente legato [alla biologia]: parlava dell'assone della

cellula A. Quando questo assone è vicino abbastanza alla soglia per far eccitare il neurone B e in modo ripetuto, persistente è coinvolto nel processo che porta la cellula B a sparare, deve succedere un qualche processo di crescita. Quello che vi ho fatto vedere prima: per esempio un inserimento di nuovi recettori post-sinaptici (alla fine sono proteine, sono legate all'espressione: i geni vengono espressi, le proteine vengono trafficate, *trafficked*, vengono portate nel posto giusto). Oppure ha qualcosa che ha a che fare con un cambio persistente, un altro tipo di meccanismo di processo di crescita del numero di vescicole. Oppure ancora un effetto metabolico, un cambiamento, come può essere la fosforilazione di un recettore, di un canale di membrana che cambia la sua conduttanza, la aumenta, la diminuisce.

Stati Discreti e Analogia con l'AI La cosa interessante è che: ma se cambia con questa storia della fosforilazione? Cambia in modo graduale? Sto di nuovo pensando al **machine learning** in cui avete i pesi sinaptici che in teoria (magari chi di voi è più competente saprà che non è così), in teoria sono dei numeri reali, possono cambiare con continuità. Adesso ti potenzio un pochino, ti potenzio ancora di più. La storia della fosforilazione potrebbe essere qualcosa di binario: o la sinapsi è non potenziata o è potenziata. Oppure di recettori post-sinaptici alla fine ne posso integrare un numero intero, quindi dal punto di vista dell'efficacia potrebbe non valere una continuità.

Forse voi sapete che con i **Large Language Models** c'è un problema di memoria. Se avete provato a giocare scaricando alcuni pesi, scaricate centinaia di gigabyte sul vostro computer e si sta esplorando il fatto di cambiarne la risoluzione numerica. Sono numeri normalmente rappresentati con *floating point* a 64 bit (o 32). Cosa succede se invece di avere quel tipo di risoluzione numerica che mi permette di rappresentare il valore 51.68462... ok, numeri interi? 51 o 50, non hai il valore intermedio, arrangiati. Sembra che sia possibile. E potrebbe essere esattamente quello che succede nel sistema nervoso, in cui le sinapsi in questi cambiamenti persistenti non è che "io ti potenzio sinapsi, ti potenzio in modo analogico"; può essere che ci siano degli stati **discreti**.

Memoria e Cancellazione (Upload del Kung Fu?)

Comunque, quello che è, questo tizio ci è andato molto vicino. A tutt'oggi non sappiamo esattamente... non sappiamo per esempio alterare i ricordi. Qualche tempo fa (e credo di dover fare un talk per il grande pubblico fra qualche... forse la settimana prossima) mi è stato chiesto: "Potremmo imparare quindi nuovi concetti tipo **Matrix** quando si fa l'upload del Kung Fu?". È un problema fondamentale che la rappresentazione delle memorie o rappresentazione dell'informazione è distribuita: non ho *qui* il giorno della mia laurea, *qui* il matrimonio e *qui* non ce l'ho. È tutto distribuito. Questo l'ho detto perché non sappiamo creare nuovi ricordi sintetici o cancellare altri ricordi.

Detto questo ci sono (e se volete vi do i riferimenti) diversi articoli scientifici in cui, nel particolare caso del sistema limbico (ippocampo e particolarmente amigdala), un ratto, un topo che è stato esposto a quello che viene chiamato **fear conditioning** (condizionamento tipo pavloviano della paura)... ovviamente questo ha un impatto notevolissimo per sindrome PTSD, post stress traumatic, *whatever*, quindi disturbi dell'ansia, panico e traumi. La possibilità di cancellare,

di mitigare l'attivazione, la co-attivazione di un particolare ambiente (io mi viene panico in una particolare situazione, sono in quella situazione e sopprimo l'amigdala) e in quel modo tendo a sfavorire, o tendo a fare *reversing* di quello che è stato invece un consolidamento di una plasticità. Siamo molto distanti dal fare l'upload del Kung Fu, forse meno dal curare disturbi d'ansia in quel modo.

L'Esperimento di Lømo (1973): Il Tetano nell'Ippocampo

Negli anni '70 ci fu un esperimento chiave (non so esattamente se sia stato per caso oppure no). Dei ricercatori norvegesi (**Bliss e Lømo**) hanno preso delle fettine di corteccia... se non mi ricordo male, l'hanno fatto anche sull'animale intatto, un coniglio, ma tipicamente hanno preso una fettina di **ippocampo**. E in una particolare combinazione dell'ippocampo voi avete fondamentalmente un circuito che è **feed-forward**: avete delle fibre che proiettano a una popolazione di neuroni post-sinaptici e non c'è particolare ricorrenza, riverberazione, eccetera.

Quindi se voi piazzate un elettrodo brutto (non una pipetta: due fili intrecciati, due fili microscopici intrecciati, però sempre due fili sono) e applicate (qui c'è una specie di simbolo di una bobina, perché in effetti è quello che viene chiamato accoppiamento induttivo, è uno stimolatore galvanico in cui non c'è un continuo, perché porterebbe dentro un rumore; non c'è un continuo fra la sorgente del segnale e l'elettrodo, c'è un trasformatore in mezzo, questo disaccoppia la continua per chi sa di che parlo) e date, iniziate a dare uno stimolo. Di fatto state attivando, e questi tizi l'hanno fatto ad alta frequenza.

Normalmente se lo attivate una volta sola (di nuovo questo non è una pipetta nello stomaco con quegli esperimenti molto fini di coppie, di *pairs*, di coppie che vi ho fatto vedere; qui è: piazza un elettrodo che registra da una **popolazione** di neuroni; oggi lo facciamo nella pancia del neurone, si fa anche al di fuori, sarebbe come un microfono che è messo qui e se voi vi attivate il microfono sente la versione integrata, sommata di tutte le vostre voci). Quindi se io con questa "schicchera", un piccolo elettroshock, inizio a fare una volta al secondo, misuro nella vostra reazione di popolazione l'effetto di questo stimolo elettrico che genera attivazione delle sinapsi e questa attivazione delle sinapsi in alcuni casi genera anche degli spike, ma prevalentemente riesco a leggere dal punto di vista extracellulare i cosiddetti **Local Field Potential**, che sono un'attività sinaptica integrata.

E quindi vedo che per 15 minuti, ogni secondo, ogni due secondi, do una schicchera e vedo un'ampiezza. Qui è normalizzato, è millivolt o quello che è. Normalizzo, vedo che è sempre uguale. Poi a un certo punto, al tempo zero, inizio a dare uno stimolo sempre esattamente con lo stesso canale. Questo per me è stato un pochino complicato immediatamente da realizzare, ma che vuol dire? Allora è un qualcosa di omosinaptico, perché se prima attivavo con lo stesso canale le sinapsi, adesso inizio ad attivare all'alta frequenza: sto scaricando magari una facilitazione o una depressione, ma è sicuramente una roba a breve termine. Per la particolare anatomia dell'ippocampo tuttavia, stimolando queste fibre, uno attiva sia alcuni neuroni sia altri neuroni post-sinaptici e crea delle correlazioni temporali.

Quello che si vede è che istantaneamente dopo aver dato questo **High Fre-**

quency Stimulation (questo stimolo ad alta frequenza, viene anche chiamato **tetano**; credo venga chiamato tetano perché tetano ha a che fare con la malattia del tetano... adesso non mi ricordo più il disturbo nervoso, forse mi potete aiutare voi, dovrebbe essere una qualche attivazione tonica. Non mi ricordo da dove viene tetano, cercatelo su Wikipedia così potete saperlo). Quindi dopodiché io riprendo a dare uno stimolo per leggere il sistema (qui alla fine è sempre: scrivo e leggo, quindi stimolo e vedo, stimolo e vedo). Però il tetano qua è stato una botta di frequenza elevato e poi dopo riprendo a uno ogni secondo, uno ogni due secondi, ogni dieci secondi.

Post-Tetanic Potentiation (PTP) vs Long Term Potentiation (LTP)

Quello che vedo è che istantaneamente c'è una specie di... quella che voi chiamereste facilitazione. Dice: "Ok grazie, qui le sinapsi si sono facilitate e tu con questo impulso di lettura stai continuando a vedere l'effetto di questo calcio accumulato". E non ci andreste troppo lontani, viene chiamato in gergo **potenziamento post-tetanico** (*Post-Tetanic Potentiation*). Quindi questo sparisce in modo molto rapido, nell'arco di minuti o decine o centinaia di secondi.

La cosa interessante è che questo potenziamento, questa facilitazione, **persiste**. E persiste ore. Ora qui è fino a 60 minuti, quindi un'ora circa dopo (in effetti potreste obiettare: "Io lo voglio vedere che dopo tre ore è ancora qui"). E significativamente, l'ampiezza delle risposte sinaptiche è significativamente maggiore rispetto alla *baseline*, a quello che era prima di iniziare. Quindi in modo causativo ho scritto in un pezzo di cervello e questa informazione persiste.

Questa cosa qua è stata fatta anche in vivo ed è stata il primo, negli anni '70, la prima dimostrazione che esiste una plasticità dipendente dall'attività (perché qui sono io che ho indotto dell'attività) e viene mantenuto un cambiamento mnemonico... probabilmente non strutturato... pardon, mnemonico no, viene mantenuto un cambiamento persistente fisiologico, di un osservabile fisiologico, che potrebbe essere correlato a un tipo di memoria.

Se io vi dico un numero di telefono, voi non ve lo state a riverberare nella testa, ma semplicemente dopo un po' lo sapete: probabilmente nel vostro ippocampo si è creato un **LTP** (*Long Term Potentiation*). Ci sono meccanismi, adesso si sa, di consolidamento che coinvolgono anche la corteccia (e fra parentesi lo *slow wave sleep*, il sonno, e l'attività di scambio di informazioni fra ippocampo e corteccia durante le fasi del sonno, durante alcuni episodi del sonno, è proprio per consolidare e trasferire a memoria ancora più a lungo termine la memoria episodica di cui l'ippocampo sembra essere sede).

Spike-Timing Dependent Plasticity (STDP)

Quindi è stata trovata questa plasticità dappertutto. E in anni più recenti (e di nuovo ha coinvolto questo ricercatore **Henry Markram** e anche un ricercatore cinese che era negli Stati Uniti da anni a Berkeley, **Mu-ming Poo**), sono più o meno allo stesso momento, hanno pubblicato degli articoli, uno su *Science* e uno su *Nature*, di nuovo riprendendo la storia della plasticità sinaptica, però in modo estremamente più fine. Hanno utilizzato coppie di elettrodi. Quindi nel modo migliore, quindi ovviamente solo pochi musicisti, esperti, persone talentuose dal punto di vista anche motorio, anche di pazienza, di attitudine agli esperimenti

(che non è banale, lo potete fare con quella che è l'attitudine a cucinare: forse qualcuno di voi avrà la ricetta, però magari è scarso, oppure viceversa eccelle, è intuitivo, magari mette il sale... e questi magari mettevano le pipette in modo: "Secondo me questa cellula non la prendo, prendo quella accanto perché mi sembra più vitale". Come fare a saperlo? E ok, sono Henry Markram).

E hanno trovato che questa caratteristica di scrittura dipende da un'**informazione temporale**, un'informazione temporale su una finestra temporale di millisecondi (adesso vi argomento meglio e vi dico che cos'è). Ed era stata in parte anticipata da un teorico, da un fisico, che diceva: "Secondo me la plasticità sinaptica, anche rivelata in questo LTP ipocampale con il tetano, deve avere un qualche tipo di correlato basato sul tempo, perché altrimenti non spiego il perché io posso imparare delle sequenze motorie, delle sequenze sensoriali, perché riesco a imparare un linguaggio, perché riesco a imparare ad ascoltare la musica e interpretarla, quando l'informazione è temporale".

E questo viene chiamato **STDP, Spike-Timing Dependent Plasticity**, ed è sia un potenziamento che una depressione, e adesso vi faccio vedere perché. È stato trovato in tantissimi, quindi nella neocorteccia, nell'ippocampo, nel bulbo olfattivo e in altre parti, e sorprendentemente dipende dalla **relazione causale** fra attività presinaptica e postsinaptica.

Di nuovo, io sono un neurone piramidale allo strato 5, sono eccitatorio, rilascio glutammato, ho la mia sinapsi proiettata lì (è una plasticità eterosinaptica, quindi conta quello che sta facendo anche il ricevente, indipendentemente dal fatto che lui abbia un suo assone che forse ritorna a me, non importa, è solo la sinapsi, il mio bottone sinaptico è qua) e dipende, in un modo che vi accenno ai possibili correlati biofisici, dipende dalla temporizzazione precisa di quando il mio spike è stato emesso (nota: lo spike è stato emesso però impiega qualche frazione di millisecondo a propagarsi fino al bottone sinaptico, però chiusa parentesi). Il *timing* esatto del mio spike e il *timing* esatto dell'altro spike, che di nuovo può essere causato da me (perché io ho una bella sinapsi efficace, cioè ogni volta che sparo lui pure spara) oppure lui spara per i cavoli suoi.

Causalità (Pre-before-Post) e Anti-Causalità (Post-before-Pre)

1. **Potenziamento (LTP):** Se questi due spike sono ravvicinati, e sono ravvicinati non... ok, l'ho detto prima, è come i recettori NMDA sono delle coincidenze, no, devono essere ravvicinati in una particolare relazione di causalità temporale. **Prima pre e poi post:** allora la sinapsi si potenzia. Non so se si potenzia dal lato presinaptico o post-sinaptico, però si potenzia.
2. **Depressione (LTD):** Se invece arriva **prima lo spike post-sinaptico e dopo arriva il presinaptico**, c'è una specie di relazione di anti-causalità. Perché anatomicamente se uno guardasse il circuito, se Ramón y Cajal vedesse il circuito, direbbe: "L'informazione viaggia in una direzione, quindi quando il presinaptico si attiva, forse il post-sinaptico si attiva dopo". Se invece si attiva prima, la sinapsi si deprime.

Come se ci fosse una ricetta per dire: la causalità (la causalità che vuol dire causa-effetto, la causa deve precedere l'effetto) sia intrinsecamente incardinata nella biologia. Che è una figata.

E questo è un grafico preso dall'articolo di Mu-ming Poo nel '98 (l'ho conosciuto, stavo per andare a fare il post-doc da lui a Berkeley, però... gli errori della vita, diversi errori della vita). Quello che hanno fatto è: avevano due pipette, una nel soma dell'neurone presinaptico e una nel soma dell'neurone post-sinaptico, e hanno dato delle schicchere per far sparare il neurone. Quindi alla fine avevano due modi di utilizzare il sistema. Dando una schicchera nell'neurone presinaptico, potevano vedere quello che era l'eco nell'neurone post-sinaptico, misuravano l'EPSP (il potenziale eccitatore post-sinaptico). Però aveva anche l'elettrodo lì, pertanto che lo usavano per leggere. Quindi in una fase di induzione della plasticità, si dice, potevano iniettare una corrente molto intensa sia nel pre che nel post e lo potevano fare ad arbitrio. Potevano fare "tac-tac" o viceversa fare "tac-tac" con una risoluzione temporale di diversi decine o centinaia di millisecondi.

Cioè si sono messi di buzzo buono su tanti esperimenti (non solo un esperimento: ogni pallino, se non ricordo male, è una coppia, è un esperimento a parte) e per quella sinapsi, fra due neuroni connessi, quindi parecchio complicato, hanno fatto quella stessa particolare relazione temporale. Pre prima del post, che è qui, oppure post prima del pre (vedete che il post precede il pre) e l'hanno fatto con "aspetta, fai 200 millisecondi prima, fai 150 millisecondi prima".

La figata è che si ha un'inversione attorno a zero con una... diciamo, queste curve che vedete, questi tratti continui sono un fit di fatto esponenziale (non ha importanza che sia esponenziale perché in questo caso qui non è una variabile tempo, è una variabile intervallo). Se l'intervallo è in qualche modo negativo, avete un **LTD**, una depressione. Qui è il cambiamento che si esprimeva dopo aver fatto l'induzione per tante volte pre-post, pre-post oppure post-pre, post-pre, determinava in termini normalizzati una successiva espressione dell'EPSP che era più piccolo, all'80%, 70%, anche al 40%. Mentre semplicemente cambiando il segno di questo intervallo (quindi anziché post-pre, pre-post), era invece un potenziamento. Di nuovo, la cosa interessante è che a cavallo dello zero, nell'arco di pochissimi millisecondi, avete un enorme LTP o un enorme LTD.

Meccanismo di Sicurezza (LTD > LTP) La cosa che potreste notare è che sembra esserci più LTD piuttosto che LTP. Di nuovo questa è una cosa forse legata all'evoluzione, è una specie di meccanismo di sicurezza. Non voglio che per qualche motivo i neuroni sparino treni di spike pre-post e che prevalga in modo del tutto casuale. Se voi immaginate di far sparare i neuroni in modo del tutto casuale, potete immaginare che sia... è equiprobabile che sia pre-post oppure post-pre. Quindi in quel caso lì potrebbe essere: "Guarda che se però ti va male, vince il potenziamento; e se c'è più potenziamento ci sono probabilmente più spike, e se ci sono più spike c'è più potenziamento e finisce in una seizure".

Quindi il fatto che qui l'area sottesa da questi punti nella curva del lato depressione sia più ampia forse è un meccanismo di sicurezza per dire: "Spara anche in modo casuale; ti dico che in media ti faccio spegnere un pochino le sinapsi, non te le faccio potenziare ad arbitrio, in modo tale che ci sia una specie di forse controllo omeostatico che sia piuttosto sicuro".

Meccanismi della Plasticità a Lungo Termine (LTP)

Durante la lezione di oggi e della volta scorsa, fondamentalmente abbiamo tirato in ballo, anche dal punto di vista quantitativo, diversi concetti. L'ultimo di questi era la **probabilità di rilascio**, che è quello più etereo. Che cosa vuol dire la probabilità di rilascio? Sì, ok, la posso definire matematicamente, ma a che cosa la attribuisco? Questo è più complicato.

Sicuramente ho parlato delle vescicole, ho parlato del numero di, o comunque ho parlato della quantità di neurotrasmettitore che viene rilasciato (quindi in qualche modo quante molecole di neurotrasmettitore sono all'interno di ciascuna vescicola) e ho parlato di recettori post-sinaptici.

Nel caso di **plasticità a lungo termine** è concepibile che possano cambiare in modo persistente (non dinamico, non attività-dipendente come la storia della plasticità a breve termine, omosinaptica, in cui in qualche modo vi ho detto che c'è un qualche tipo di relazione fra la frequenza, la richiesta di uso e la quantità di neurotrasmettitore che è pronto per essere rilasciato). Ci può essere invece un cambiamento persistente, drammatico, strutturale, che potrebbe avere a che fare con:

1. **Numero di Recettori (N_{post}):** Per esempio, passando da 1 a 2, il numero di recettori post-sinaptici. Questo porterebbe a un cambiamento dell'efficacia sinaptica, un cambiamento della corrente massima sinaptica, perché cambierebbe \bar{G} (G-bar), cambierebbe il numero totale dei recettori post-sinaptici che è incapsulato dentro quel \bar{G} .
2. **Numero di Vescicole (N_{pre}):** Un'altra cosa che potrebbe cambiare è, passando per esempio da qui a qui, è il numero di vescicole contenenti neurotrasmettitore. Quindi potrebbe essere che c'è un cambiamento strutturale in cui di fatto sarà T_{max} a cambiare. Vero, T_{max} è una quantità dinamica che dipende (in termini di plasticità a breve termine) dalla storia pregressa, però ok, ne avreste di più. Cambierebbe la quantità, un fattore di scala. Cambierebbe quindi la quantità o, se volete, potremmo dire potrebbe cambiare la probabilità di rilascio; ne avete di più vescicole quindi potrebbe cambiare.
3. **Conduttanza di Singolo Canale (γ):** Un'altra cosa che potrebbe cambiare (che qui non mi ricordo più in questa review... credo che sia, non mi ricordo da dove ho preso questo grafico qua, non mi ricordo chi è chi, qual era il passaggio, era molto elegante), potete anche avere un cambiamento non del numero di recettori, non del numero di vescicole, ma della conduttanza di singolo canale, per quella che viene per esempio chiamata **fosforilazione**. Quindi un qualche cambiamento strutturale persistente dei recettori che fa sì che in qualche modo il poro sia più largo.

In tutti questi casi questo cambiamento ha un corrispettivo di un cambiamento persistente che in qualche modo può essere considerato un **substrato della memoria**, un substrato di qualcosa che rende ragione del fatto che un animale (noi) possiamo memorizzare delle cose e tenerle per anche 80 anni. 90 anni, meno, dipende quando uno tira le cuoia.

La Legge di Hebb: Causalità e Correlazione

Una cosa molto importante nel contesto, diciamo, e alla fine se volete una specie di principio guida che è venuto fuori, è quello della proposta, della teoria di **Donald Hebb**, al fine degli anni '40 (o '50). Era uno psicologo, però aveva ben chiara la fisiologia del sistema nervoso, che allora all'epoca non era completa (non è nemmeno completa oggi, però non era così completa come adesso).

E Donald Hebb è ricordato per un principio che alla fine è distillato in questo modo (in parte orribile, perché non rende ragione di quello che poi poteva essere sia la sua intuizione, sia quello che poi è stata l'istanza delle cose). Lui aveva esattamente a che fare, aveva in mente parlare di concetti, di memoria, di cognizione; aveva idea che dovesse esserci un correlato neuronale, e in qualche modo concluse: **“Cells that fire together, wire together”**. Questo non funziona in italiano, cioè “se sparano assieme, si... spagan... spaghettono”, non viene in italiano. Cioè: **se spari assieme, ti connetti assieme**.

E quel discorso che ho fatto prima: potrebbe essere che ci siano dei meccanismi per cui se due neuroni (che per i fatti loro non sono neppure connessi, oppure sono connessi ma non necessariamente l'efficacia sinaptica di un neurone è tale da reclutare o influenzare, eccitandolo e inibendolo, l'altro neurone)... Se per caso c'è una qualche dinamica temporale in cui c'è una correlazione, una co-attivazione (magari in una certa relazione temporale, perché se io mi attivo adesso e un altro si attiva mezz'ora dopo, forse il legame causale nel nostro universo potrebbe non essere utile da ricordare), e questo potrebbe essere un modo per creare dei ricordi notando delle co-attivazioni, delle correlazioni che potrebbero diventare, come detto, **causazione**.

Lui non parlava necessariamente di concetti, nonostante fosse uno psicologo cognitivo, ma era letteralmente legato [alla biologia]: parlava dell'assone della cellula A. Quando questo assone è vicino abbastanza alla soglia per far eccitare il neurone B e in modo ripetuto, persistente è coinvolto nel processo che porta la cellula B a sparare, deve succedere un qualche processo di crescita. Quello che vi ho fatto vedere prima: per esempio un inserimento di nuovi recettori post-sinaptici (alla fine sono proteine, sono legate all'espressione: i geni vengono espressi, le proteine vengono trafficate, *trafficked*, vengono portate nel posto giusto). Oppure ha qualcosa che ha a che fare con un cambio persistente, un altro tipo di meccanismo di processo di crescita del numero di vescicole. Oppure ancora un effetto metabolico, un cambiamento, come può essere la fosforilazione di un recettore, di un canale di membrana che cambia la sua conduttanza, la aumenta, la diminuisce.

Stati Discreti e Analogia con l'AI La cosa interessante è che: ma se cambia con questa storia della fosforilazione? Cambia in modo graduale? Sto di nuovo pensando al **machine learning** in cui avete i pesi sinaptici che in teoria (magari chi di voi è più competente saprà che non è così), in teoria sono dei numeri reali, possono cambiare con continuità. Adesso ti potenzio un pochino, ti potenzio ancora di più. La storia della fosforilazione potrebbe essere qualcosa di binario: o la sinapsi è non potenziata o è potenziata. Oppure di recettori post-sinaptici alla fine ne posso integrare un numero intero, quindi dal punto di vista dell'efficacia potrebbe non valere una continuità.

Forse voi sapete che con i **Large Language Models** c'è un problema di memoria. Se avete provato a giocare scaricando alcuni pesi, scaricate centinaia di gigabyte sul vostro computer e si sta esplorando il fatto di cambiarne la risoluzione numerica. Sono numeri normalmente rappresentati con *floating point* a 64 bit (o 32). Cosa succede se invece di avere quel tipo di risoluzione numerica che mi permette di rappresentare il valore 51.68462... ok, numeri interi? 51 o 50, non hai il valore intermedio, arrangiati. Sembra che sia possibile. E potrebbe essere esattamente quello che succede nel sistema nervoso, in cui le sinapsi in questi cambiamenti persistenti non è che “io ti potenzio sinapsi, ti potenzio in modo analogico”; può essere che ci siano degli stati **discreti**.

Memoria e Cancellazione (Upload del Kung Fu?)

Comunque, quello che è, questo tizio ci è andato molto vicino. A tutt'oggi non sappiamo esattamente... non sappiamo per esempio alterare i ricordi. Qualche tempo fa (e credo di dover fare un talk per il grande pubblico fra qualche... forse la settimana prossima) mi è stato chiesto: “Potremmo imparare quindi nuovi concetti tipo **Matrix** quando si fa l'upload del Kung Fu?”. È un problema fondamentale che la rappresentazione delle memorie o rappresentazione dell'informazione è distribuita: non ho *qui* il giorno della mia laurea, *qui* il matrimonio e *qui* non ce l'ho. È tutto distribuito. Questo l'ho detto perché non sappiamo creare nuovi ricordi sintetici o cancellare altri ricordi.

Detto questo ci sono (e se volete vi do i riferimenti) diversi articoli scientifici in cui, nel particolare caso del sistema limbico (ippocampo e particolarmente amigdala), un ratto, un topo che è stato esposto a quello che viene chiamato **fear conditioning** (condizionamento tipo pavloviano della paura)... ovviamente questo ha un impatto notevolissimo per sindrome PTSD, post stress traumatic, *whatever*, quindi disturbi dell'ansia, panico e traumi. La possibilità di cancellare, di mitigare l'attivazione, la co-attivazione di un particolare ambiente (io mi viene panico in una particolare situazione, sono in quella situazione e sopprimo l'amigdala) e in quel modo tendo a sfavorire, o tendo a fare *reversing* di quello che è stato invece un consolidamento di una plasticità. Siamo molto distanti dal fare l'upload del Kung Fu, forse meno dal curare disturbi d'ansia in quel modo.

L'Esperimento di Lømo (1973): Il Tetano nell'Ippocampo

Negli anni '70 ci fu un esperimento chiave (non so esattamente se sia stato per caso oppure no). Dei ricercatori norvegesi (**Bliss e Lømo**) hanno preso delle fettine di corteccia... se non mi ricordo male, l'hanno fatto anche sull'animale intatto, un coniglio, ma tipicamente hanno preso una fettina di **ippocampo**. E in una particolare combinazione dell'ippocampo voi avete fondamentalmente un circuito che è **feed-forward**: avete delle fibre che proiettano a una popolazione di neuroni post-sinaptici e non c'è particolare ricorrenza, riverberazione, eccetera.

Quindi se voi piazzate un elettrodo brutto (non una pipetta: due fili intrecciati, due fili microscopici intrecciati, però sempre due fili sono) e applicate (qui c'è una specie di simbolo di una bobina, perché in effetti è quello che viene chiamato accoppiamento induttivo, è uno stimolatore galvanico in cui non c'è un continuo, perché porterebbe dentro un rumore; non c'è un continuo fra la

sorgente del segnale e l'elettrodo, c'è un trasformatore in mezzo, questo disaccoppia la continua per chi sa di che parlo) e date, iniziate a dare uno stimolo. Di fatto state attivando, e questi tizi l'hanno fatto ad alta frequenza.

Normalmente se lo attivate una volta sola (di nuovo questo non è una pipetta nello stomaco con quegli esperimenti molto fini di coppie, di *pairs*, di coppie che vi ho fatto vedere; qui è: piazzato un elettrodo che registra da una **popolazione** di neuroni; oggi lo facciamo nella pancia del neurone, si fa anche al di fuori, sarebbe come un microfono che è messo qui e se voi vi attivate il microfono sente la versione integrata, sommata di tutte le vostre voci). Quindi se io con questa "schicchiera", un piccolo elettroshock, inizio a fare una volta al secondo, misuro nella vostra reazione di popolazione l'effetto di questo stimolo elettrico che genera attivazione delle sinapsi e questa attivazione delle sinapsi in alcuni casi genera anche degli spike, ma prevalentemente riesco a leggere dal punto di vista extracellulare i cosiddetti **Local Field Potential**, che sono un'attività sinaptica integrata.

E quindi vedo che per 15 minuti, ogni secondo, ogni due secondi, do una schicchiera e vedo un'ampiezza. Qui è normalizzato, è millivolt o quello che è. Normalizzo, vedo che è sempre uguale. Poi a un certo punto, al tempo zero, inizio a dare uno stimolo sempre esattamente con lo stesso canale. Questo per me è stato un pochino complicato immediatamente da realizzare, ma che vuol dire? Allora è un qualcosa di omosinaptico, perché se prima attivavo con lo stesso canale le sinapsi, adesso inizio ad attivare all'alta frequenza: sto scaricando magari una facilitazione o una depressione, ma è sicuramente una roba a breve termine. Per la particolare anatomia dell'ippocampo tuttavia, stimolando queste fibre, uno attiva sia alcuni neuroni sia altri neuroni post-sinaptici e crea delle correlazioni temporali.

Quello che si vede è che istantaneamente dopo aver dato questo **High Frequency Stimulation** (questo stimolo ad alta frequenza, viene anche chiamato **tetano**; credo venga chiamato tetano perché tetano ha a che fare con la malattia del tetano... adesso non mi ricordo più il disturbo nervoso, forse mi potete aiutare voi, dovrebbe essere una qualche attivazione tonica. Non mi ricordo da dove viene tetano, cercatelo su Wikipedia così potete saperlo). Quindi dopodiché io riprendo a dare uno stimolo per leggere il sistema (qui alla fine è sempre: scrivo e leggo, quindi stimolo e vedo, stimolo e vedo). Però il tetano qua è stato una botta di frequenza elevato e poi dopo riprendo a uno ogni secondo, uno ogni due secondi, ogni dieci secondi.

Post-Tetanic Potentiation (PTP) vs Long Term Potentiation (LTP)

Quello che vedo è che istantaneamente c'è una specie di... quella che voi chiamereste facilitazione. Dice: "Ok grazie, qui le sinapsi si sono facilitate e tu con questo impulso di lettura stai continuando a vedere l'effetto di questo calcio accumulato". E non ci andreste troppo lontani, viene chiamato in gergo **potenziamento post-tetanico** (*Post-Tetanic Potentiation*). Quindi questo sparisce in modo molto rapido, nell'arco di minuti o decine o centinaia di secondi.

La cosa interessante è che questo potenziamento, questa facilitazione, **persiste**. E persiste ore. Ora qui è fino a 60 minuti, quindi un'ora circa dopo (in effetti potreste obiettare: "Io lo voglio vedere che dopo tre ore è ancora qui"). E

significativamente, l'ampiezza delle risposte sinaptiche è significativamente maggiore rispetto alla *baseline*, a quello che era prima di iniziare. Quindi in modo causativo ho scritto in un pezzo di cervello e questa informazione persiste.

Questa cosa qua è stata fatta anche in vivo ed è stata il primo, negli anni '70, la prima dimostrazione che esiste una plasticità dipendente dall'attività (perché qui sono io che ho indotto dell'attività) e viene mantenuto un cambiamento mnemonico... probabilmente non strutturato... pardon, mnemonico no, viene mantenuto un cambiamento persistente fisiologico, di un osservabile fisiologico, che potrebbe essere correlato a un tipo di memoria.

Se io vi dico un numero di telefono, voi non ve lo state a riverberare nella testa, ma semplicemente dopo un po' lo sapete: probabilmente nel vostro ippocampo si è creato un **LTP** (*Long Term Potentiation*). Ci sono meccanismi, adesso si sa, di consolidamento che coinvolgono anche la corteccia (e fra parentesi lo *slow wave sleep*, il sonno, e l'attività di scambio di informazioni fra ippocampo e corteccia durante le fasi del sonno, durante alcuni episodi del sonno, è proprio per consolidare e trasferire a memoria ancora più a lungo termine la memoria episodica di cui l'ippocampo sembra essere sede).

Spike-Timing Dependent Plasticity (STDP)

Quindi è stata trovata questa plasticità dappertutto. E in anni più recenti (e di nuovo ha coinvolto questo ricercatore **Henry Markram** e anche un ricercatore cinese che era negli Stati Uniti da anni a Berkeley, **Mu-ming Poo**), sono più o meno allo stesso momento, hanno pubblicato degli articoli, uno su *Science* e uno su *Nature*, di nuovo riprendendo la storia della plasticità sinaptica, però in modo estremamente più fine. Hanno utilizzato coppie di elettrodi. Quindi nel modo migliore, quindi ovviamente solo pochi musicisti, esperti, persone talentuose dal punto di vista anche motorio, anche di pazienza, di attitudine agli esperimenti (che non è banale, lo potete fare con quella che è l'attitudine a cucinare: forse qualcuno di voi avrà la ricetta, però magari è scarso, oppure viceversa eccelle, è intuitivo, magari mette il sale... e questi magari mettevano le pipette in modo: "Secondo me questa cellula non la prendo, prendo quella accanto perché mi sembra più vitale". Come fare a saperlo? E ok, sono Henry Markram).

E hanno trovato che questa caratteristica di scrittura dipende da un'**informazione temporale**, un'informazione temporale su una finestra temporale di millisecondi (adesso vi argomento meglio e vi dico che cos'è). Ed era stata in parte anticipata da un teorico, da un fisico, che diceva: "Secondo me la plasticità sinaptica, anche rivelata in questo LTP ipocampale con il tetano, deve avere un qualche tipo di correlato basato sul tempo, perché altrimenti non spiego il perché io posso imparare delle sequenze motorie, delle sequenze sensoriali, perché riesco a imparare un linguaggio, perché riesco a imparare ad ascoltare la musica e interpretarla, quando l'informazione è temporale".

E questo viene chiamato **STDP, Spike-Timing Dependent Plasticity**, ed è sia un potenziamento che una depressione, e adesso vi faccio vedere perché. È stato trovato in tantissimi, quindi nella neocorteccia, nell'ippocampo, nel bulbo olfattivo e in altre parti, e sorprendentemente dipende dalla **relazione causale** fra attività presinaptica e postsinaptica.

Di nuovo, io sono un neurone piramidale allo strato 5, sono eccitatorio, rilascio glutammato, ho la mia sinapsi proiettata lì (è una plasticità eterosinaptica, quindi conta quello che sta facendo anche il ricevente, indipendentemente dal fatto che lui abbia un suo assone che forse ritorna a me, non importa, è solo la sinapsi, il mio bottone sinaptico è qua) e dipende, in un modo che vi accenno ai possibili correlati biofisici, dipende dalla temporizzazione precisa di quando il mio spike è stato emesso (nota: lo spike è stato emesso però impiega qualche frazione di millisecondo a propagarsi fino al bottone sinaptico, però chiusa parentesi). Il *timing* esatto del mio spike e il *timing* esatto dell'altro spike, che di nuovo può essere causato da me (perché io ho una bella sinapsi efficace, cioè ogni volta che sparo lui pure spara) oppure lui spara per i cavoli suoi.

Causalità (Pre-before-Post) e Anti-Causalità (Post-before-Pre)

1. **Potenziamento (LTP):** Se questi due spike sono ravvicinati, e sono ravvicinati non... ok, l'ho detto prima, è come i recettori NMDA sono delle coincidenze, no, devono essere ravvicinati in una particolare relazione di causalità temporale. **Prima pre e poi post:** allora la sinapsi si potenzia. Non so se si potenzia dal lato presinaptico o post-sinaptico, però si potenzia.
2. **Depressione (LTD):** Se invece arriva **prima lo spike post-sinaptico e dopo arriva il presinaptico**, c'è una specie di relazione di anti-causalità. Perché anatomicamente se uno guardasse il circuito, se Ramón y Cajal vedesse il circuito, direbbe: "L'informazione viaggia in una direzione, quindi quando il presinaptico si attiva, forse il post-sinaptico si attiva dopo". Se invece si attiva prima, la sinapsi si deprime.

Come se ci fosse una ricetta per dire: la causalità (la causalità che vuol dire causa-effetto, la causa deve precedere l'effetto) sia intrinsecamente incardinata nella biologia. Che è una figata.

E questo è un grafico preso dall'articolo di Mu-ming Poo nel '98 (l'ho conosciuto, stavo per andare a fare il post-doc da lui a Berkeley, però... gli errori della vita, diversi errori della vita). Quello che hanno fatto è: avevano due pipette, una nel soma dell'neurone presinaptico e una nel soma dell'neurone post-sinaptico, e hanno dato delle schicchere per far sparare il neurone. Quindi alla fine avevano due modi di utilizzare il sistema. Dando una schicchera nell'neurone presinaptico, potevano vedere quello che era l'eco nell'neurone post-sinaptico, misuravano l'EPSP (il potenziale eccitatore post-sinaptico). Però aveva anche l'elettrodo lì, pertanto che lo usavano per leggere. Quindi in una fase di induzione della plasticità, si dice, potevano iniettare una corrente molto intensa sia nel pre che nel post e lo potevano fare ad arbitrio. Potevano fare "tac-tac" o viceversa fare "tac-tac" con una risoluzione temporale di diversi decine o centinaia di millisecondi.

Cioè si sono messi di buzzo buono su tanti esperimenti (non solo un esperimento: ogni pallino, se non ricordo male, è una coppia, è un esperimento a parte) e per quella sinapsi, fra due neuroni connessi, quindi parecchio complicato, hanno fatto quella stessa particolare relazione temporale. Pre prima del post, che è qui, oppure post prima del pre (vedete che il post precede il pre) e l'hanno fatto con "aspetta, fai 200 millisecondi prima, fai 150 millisecondi prima".

La figura è che si ha un'inversione attorno a zero con una... diciamo, queste curve che vedete, questi tratti continui sono un fit di fatto esponenziale (non ha importanza che sia esponenziale perché in questo caso qui non è una variabile tempo, è una variabile intervallo). Se l'intervallo è in qualche modo negativo, avete un **LTD**, una depressione. Qui è il cambiamento che si esprimeva dopo aver fatto l'induzione per tante volte pre-post, pre-post oppure post-pre, post-pre, determinava in termini normalizzati una successiva espressione dell'EPSP che era più piccolo, all'80%, 70%, anche al 40%. Mentre semplicemente cambiando il segno di questo intervallo (quindi anziché post-pre, pre-post), era invece un potenziamento. Di nuovo, la cosa interessante è che a cavallo dello zero, nell'arco di pochissimi millisecondi, avete un enorme LTP o un enorme LTD.

Meccanismo di Sicurezza (LTD > LTP) La cosa che potreste notare è che sembra esserci più LTD piuttosto che LTP. Di nuovo questa è una cosa forse legata all'evoluzione, è una specie di meccanismo di sicurezza. Non voglio che per qualche motivo i neuroni sparino treni di spike pre-post e che prevalga in modo del tutto casuale. Se voi immaginate di far sparare i neuroni in modo del tutto casuale, potete immaginare che sia... è equiprobabile che sia pre-post oppure post-pre. Quindi in quel caso lì potrebbe essere: "Guarda che se però ti va male, vince il potenziamento; e se c'è più potenziamento ci sono probabilmente più spike, e se ci sono più spike c'è più potenziamento e finisce in una seizure".

Quindi il fatto che qui l'area sottesa da questi punti nella curva del lato depressione sia più ampia forse è un meccanismo di sicurezza per dire: "Spara anche in modo casuale; ti dico che in media ti faccio spegnere un pochino le sinapsi, non te le faccio potenziare ad arbitrio, in modo tale che ci sia una specie di forse controllo omeostatico che sia piuttosto sicuro".

Variabilità della STDP: Neuromodulazione e Sviluppo

Quindi la sorpresa è che ci sia una relazione causale e che sia il timing, e che l'LTP e l'LTD siano due facce della stessa medaglia: quindi cambia pochissimo nell'induzione della plasticità.

Ci sono negli anni (questo è un articolo di *review* di qualche anno fa in cui viene chiamato "canonico"), in altre parti del sistema nervoso viene trovato che queste curve, questa dipendenza dalla temporizzazione (di nuovo questo asse orizzontale è sempre l'intervallo pre-post: quindi se pre-post è positivo vuol dire che il pre... scusate, se è post-pre, perché post-pre se il tempo del post è maggiore del tempo del pre, quindi è successivo, allora ho il potenziamento; se invece è negativo ho la depressione)... Se però degli studi hanno utilizzato la **neuromodulazione**, hanno semplicemente versato della dopamina o degli antagonisti del recettore dopaminergico, il tipo di profilo si è completamente scombinato: è diventato più largo e non sembra avere più la componente di LTD. Adesso non ho la slide, ma non mi ricordo se è nel cervelletto, c'è un STDP all'opposto: cioè in questa parte dove dovrebbe essere l'LTP c'è l'LTD e nella parte di sinistra c'è l'LTP. Quindi c'è uno zoo anche qui.

E una cosa interessante è che durante le fasi dello sviluppo non è che questa curva appare quando i primi neuroni si formano durante lo sviluppo embrionale. All'inizio (anche questi P13, P21 sta per giorni dopo la nascita, *post-natal days*;

si parla di un ratto)... tipicamente i ratti aprono gli occhi e raggiungono quindi maturità del sistema visivo attorno a P14, due settimane dopo la nascita. P13 e P21 sono quello che viene chiamato dei ratti molto giovani, 21-30 sono *juvenile*, 35-42 sono anche a che fare con l'insorgenza della pubertà e quindi dell'effetto ormonale. Di nuovo neurotrasmettitori, neuromodulazione: il profilo cambia da essere prevalentemente LTD a diventare LTP, in modo anche indipendente dalla temporizzazione. Quindi sembra che ci sia qualcosa, ci sia qualcosa di molto interessante.

La Freccia del Tempo e la Traccia di Eleggibilità E quindi la plasticità sinaptica non è semplicemente la conseguenza di una co-attivazione. Dipende come, dipende dalla direzione della causalità. Anni fa ho letto un libro intitolato "*La freccia del tempo*", scritto da fisici; aveva a che fare con l'irreversibilità delle leggi della fisica. Non dico che ci siano spunti per pensare, però il fatto che ci sia una direzione del tempo qui sembrerebbe essere catturato da un meccanismo biologico.

Quindi come funziona? Funziona che se avete due neuroni (questo è presinaptico e questo è post-sinaptico), se c'è un'attività di *firing* di questo tipo, in qualche modo la sinapsi fra i due deve poter leggere. Legge qualche informazione forse legata al calcio residuo, forse legata in parte alla coincidenza fra potenziali d'azione (che, ora in questo caso non c'è una struttura morfologica, ma dal Soma i potenziali d'azione si *back-propagano*, si retro-propagano nei dendriti dove ci sono le sinapsi). Però, comunque lo faccia, la sinapsi in qualche modo legge che "pre prima di post" deve essere un potenziamento.

Quindi è come se ogni spike presinaptico avesse una specie di traccia temporale che viene chiamata **traccia di eleggibilità** (*eligibility trace*) che a un certo punto perde memoria. Questo è veramente un'ipotesi: è un'esponenziale decrescente, la cui costante di tempo qui è la stessa costante di tempo di questa curva (di questa curva qua). Quindi questo arco di esponenziale cambia perché è una dipendenza dall'intervallo. Stessa cosa se io lo prendo e assumo che ci debba essere un qualche meccanismo biofisico: è come se la sinapsi, arrivato lo spike post-sinaptico (quindi questo neurone qui), la sinapsi riesca a leggere e dice: "Ok, ma era ancora in tempo per questa finestra di leggibilità?". Se sì, allora potenziati (infatti la freccia dovrebbe diventare più cicciotta).

Se invece il rapporto di causalità è invertito, la traccia di leggibilità deve essere forse associata invece al neurone post-sinaptico. E quando arriva lo spike pre-sinaptico alla sinapsi, guarda alla traccia di leggibilità che ha il neurone post-sinaptico e vede che sì, sono ancora leggibili, però è un'altra dinamica, un'altra tecnica. Quindi in questo caso si verifica la depressione e la freccia diventa più smilza, più sottile, perché l'efficacia della sinapsi (per esempio \bar{G} , oppure la probabilità di rilascio, oppure la fosforilazione dei recettori, non mi interessa, uno di quei fenomeni) viene attivato o depresso o potenziato.

Oltre le Coppie: La Regola delle Triplette

Quindi le interazioni sono per le coppie di spike. Se io vi chiedo quando (e questa è la situazione più consona) quando i neuroni hanno uno *spike train*, un treno di spike di questo tipo, io così a occhio non so capire chi è pre e chi avviene

prima. Allora, so chi è presinaptico e chi è post-sinaptico, questo sì. Il blu è sempre presinaptico (anatomicamente ha un bottone sinaptico proiettato e tocca il neurone post-sinaptico, quindi questo non si scappa). Quello che non so è se, per esempio, questo spike qui, il terzo, avviene prima o dopo... devo considerarlo come avvenuto prima o dopo questi spike dell'neurone presinaptico.

Quindi, in questo caso, la gente facendo esperimenti (facendo l'esperimento) ha visto che, per esempio, in questa circostanza, la sinapsi si potenzia. E ovviamente la domanda è: com'è? Prima sembrava essere una interazione di coppie di potenziali d'azione e adesso una delle proposte (semplicemente ve la racconto così, brevemente, senza entrare nel dettaglio) ha ipotizzato che in realtà la sinapsi non si basi soltanto su due spike e su due tracce di leggibilità, ma conti **triplette**.

Quindi se voi pensate che ogni spike post-sinaptico in qualche modo interagisca con una coppia di spike presinaptici (e rappresentate in modo matematico questa frase e la mettete dentro una simulazione), riuscireste a esprimere, a spiegare l'esperimento.

Dipendenza dalla Frequenza di Sparo (Firing Rate) L'inghippo in effetti viene risolto perché le cose non stanno così semplicemente su un aspetto di causalità soltanto temporale. C'è anche un'influenza del **firing rate**. Adesso vorrei arrivarci. Quindi, quando siete in questo tipo di regime, anziché in un tipo di regime in cui la frequenza è molto più bassa... e in un regime in cui la frequenza è molto più bassa, probabilmente l'informazione temporale ha un senso, perché c'è sufficientemente silenzio per dire: "Questo è arrivato prima e questo è arrivato dopo, e questo è in particolare riferito a questo, perché è troppo distante da quest'altro spike". Se invece la frequenza è più elevata, non lo è.

Questo meccanismo è stato (quindi o il timing o il *firing rate*) è stato di nuovo espresso non in parole, ma in una descrizione matematica da due ricercatori, **Pfister e Gerstner**, anni fa. E hanno fatto vedere (questo è un grafico che ho plottato io qualche tempo fa) che la dipendenza del tempo... le due curve sono ottenute tenendo fissato l'intervallo pre-post (questo lo tengo sempre fissato, supponete un millisecondo, oppure post precede il pre). Quindi qui c'è l'informazione temporale. E a frequenza bassa (alla frequenza bassa vuol dire che io faccio questo evento pre-post, lo faccio raramente)... però lo posso fare anche a velocità più elevata, mantenendo la stessa fase fra i due stimoli.

Se lo faccio e vado piano, attorno a qualche coppia di spike al secondo, il nero e il tratteggiato restano diversi. Uno è potenziamento e l'altro è depressione. La cosa interessante è che a un certo punto, a frequenze non particolarmente così elevate (attorno a 30-40 spike al secondo), quello che doveva essere un LTP inizia a sperimentare una dipendenza dalla frequenza; quindi alla frequenza di *pairing*, anche l'LTP inizia a sperimentare una dipendenza dalla frequenza di *pairing*. Però alla fine, superata una certa frequenza critica, **tutto fa LTP**.

Quindi, in alcuni casi, se le sinapsi sono di questo tipo, quando i neuroni sparano (per esempio nella corteccia visiva), se l'attività di sparo è molto elevata, avete che sia dal punto di vista presinaptico che dal punto di vista post-sinaptico, ho sempre un potenziamento. Quindi se per caso anatomicamente ci sono entrambe

le sinapsi in entrambe le direzioni, entrambe si potenziano e avete un *motif* bidirezionale. Viceversa, in altre aree della corteccia dove il codice si dice è più sparso (in altri termini i neuroni sparano a frequenze molto più basse), continuate a lavorare in un regime in cui conta il timing.

Questa cosa qua, che si chiama **regola delle triplette**, ha in parte riconciliato (e ce n'è ancora un pezzo di cui non vi dico, che ulteriormente riconcilia con un sacco di esperimenti) in cui la gente ha iniziato a dire: “Ma aspetta, non mi basta il timing, deve essere la frequenza pure... ma come?”. Semplicemente considerare le triplette cattura sia il timing che la frequenza in un modo che *fitta* gli esperimenti. Quindi è una descrizione molto potente. Di nuovo, qui è un caso (di cui però non entriamo nel dettaglio matematico) in cui aver sistematizzato, formalizzato, modellato il fenomeno, ha permesso di dire: “Guarda che però non funziona... però se aggiungo questo inizia a funzionare e vedo e spiego gli esperimenti”. Poi con lo stesso modello posso dire: “Aspetta, io non l'ho mai provato con quell'altro protocollo di stimolazione, per esempio norvegese, con il tetano ad alta frequenza... fammelo provare”. È venuto fuori che *fitta* e funziona anche in un contesto che non è mai stato quello su cui i parametri di questo modello sono stati identificati.

Interazione tra LTP e Plasticità a Breve Termine (STD)

Quindi, ora, le interazioni fra plasticità a lungo termine e a breve termine sono particolarmente interessanti perché finora, diciamo nell'ultima ora, focalizzandomi sulla plasticità a lungo termine, fondamentalmente vi ho detto: “Boh, questo è cambiato, cambia questo... è cambiato \bar{G} (G-bar)”. Quindi, quale che sia il treno di potenziale di azione presinaptici e la dinamica temporale, comunque cambiando questo (dimezzandolo, raddoppiandolo), io cambio l'ampiezza di tutti i picchi di un treno di spike, di un treno di PSP. Non cambio la struttura temporale, non cambio come se si stanca, se si facilita: sto scalando. Questo è letteralmente un fattore di scala.

Quindi se questo mi dice: “Ok guarda che hai inserito altri 100 recettori postsinaptici in quella sinapsi che si è dovuta potenziare”, quindi ho cambiato, oppure viceversa la conduttanza del singolo recettore è aumentata perché c'è stata fosforilazione, io cambio qui e cambio un fattore di scala.

Cosa diversa è se cambio la concentrazione massima di neurotrasmettitori, in realtà se cambio la U (la probabilità di rilascio). Perché vi ricordate che U determinava quanto io durante uno spike sottraevo a questo contenitore R di vescicole pronte per essere rilasciate, di neurotrasmettitore in una specie di stato pronto all'azione. E se U mi cambia, e io ho un treno di 10 spike... mentre prima era piccolo (sì, fra il primo... dipendentemente dalla frequenza ovviamente, la depressione sarebbe stata un pochino più dolce, quasi intercettabile), se invece U mi diventa dieci volte tanto, al primo utilizzo io quasi non ho più neurotrasmettitore a disposizione. Quindi mi cambia completamente il profilo temporale, alterando quello che è, di nuovo, nel *machine learning*, non è un cambiamento di scala, è un cambiamento addirittura del *processing* nel tempo.

Esperimenti di Dean Buonomano: Ippocampo vs Neocorteccia

Questi sono degli esperimenti che ha fatto un ricercatore americano, che

è un grande, ha scritto anche un libro divulgativo molto interessante sulla rappresentazione del tempo nel cervello (non mi ricordo come si chiama), e non è italiano, è di origini portoghesi: **Dean Buonomano**. Diverse volte l'ho incontrato e un paio di volte ho detto: "Ma tu hai...". No, non è italiano.

Questo ha fatto quel tipo di esperimenti di *paired recordings*, e l'ha fatto lui sia su fettine di ippocampo, sia su fettine di corteccia (quindi alla fine è sempre su ratto, ma su parti diverse della corteccia), e ha applicato un particolare protocollo, lo stesso protocollo di induzione di plasticità. E quello che ha visto è che, paragonando quello che si otteneva prima dell'induzione e dopo l'induzione (prima è questa traccia tratteggiata e dopo la traccia [continua]), differiva notevolmente se era nell'ippocampo o se era nella neocorteccia.

1. **Nell'Ippocampo:** Se riuscite a vedere (purtroppo sarebbe dovuto essere a colori), vedete che fondamentalmente dalla parte tratteggiata alla parte più scura c'è un fattore di scala. Ho raddoppiato tutto. Quindi l'ampiezza di questo evento qua, che era più piccolo del secondo, comunque è raddoppiata; e l'ampiezza del secondo, che era un po' più [grande], è raddoppiata. Quindi alla fine tutti questi IPSP (che sono conseguenza della risposta di un treno di 10 potenziali... 3, 6, 9, quello che sono) è cambiato in modo uniforme nel tempo. Per esempio, se io fossi in grado di potenziare sufficientemente, tanto da, a un certo punto, far sparare il neurone, avrei che prima questo treno, questa eco di IPSP non è in grado di fare sparare il neurone (vedete che non va sopra soglia). Dopo però può essere che vada sopra soglia. Quindi qui c'è una piccola **sommazione temporale**: per farla breve io aumento, induco il potenziamento, non solo la sinapsi si potenzia, si potenzia in modo temporalmente indiscriminato, ma mi fa sparare in modo in corrispondenza degli spike presinaptici verso la fine del treno degli spike.
2. **Nella Corteccia:** Se faccio la stessa cosa in corteccia, dove c'è questa depressione a breve termine molto più spiccata, apparentemente non cambio \bar{G} , nella corteccia cambio U . E cambiando U vedete che anziché scalare tutti allo stesso modo, io ho scalato il primo: il primo è diventato una bella quantità, ma il secondo in proporzione (dato che non c'erano più risorse o ce ne erano molte meno disponibili) non è aumentato della stessa quantità, di fatto è indistinguibile da quello che era prima, e così via. Quindi quello che prima era un treno in cui non c'erano gli effetti della depressione, adesso ci sono: visto che il primo è stato una bella botta, una sottrazione notevole di quantità di neurotrasmettitore, l'ampiezza degli IPSC successivi è addirittura più piccola. E se per caso fossi in un regime tale in cui queste ampiezze fossero sufficienti a fare sparare il neurone post-sinaptico, vedrei che il primo, forse il secondo spike presinaptico, darebbero luogo a una eccitazione per fare sparare il neurone post-sinaptico.

Questo e questo sono molto diversi. In termini di codifica del segnale, di una qualche informazione codificata nel tempo, qui forse sto dicendo: "Voglio aumentare il guadagno di tutta l'informazione temporale". Qui voglio dire, forse: "Voglio far diventare il sistema un sistema che mi segnala solo il cambiamento, solo nella transizione". La transizione è quando accendo e poi voglio che il sistema si scordi, si stanchi, si svuoti.

Redistribuzione dell'Efficacia Sinaptica

Questi sono altri esempi (pardon, quello di prima era un cartone), questi sono esempi in cui questa (e abbiamo finito, e vi lascio) in cui nell'ippocampo c'è questo scalamento che si rivela prima e dopo normalizzando. Quindi quello che vedete qui, *scaled* e *subtracted*, sono versioni in cui io fondamentalmente dimostro che se moltiplico o divido per una certa quantità due treni, le due tracce diventano uguali. Questo non viene, non funziona quando faccio lo stesso scalamento, la stessa normalizzazione [nella corteccia], perché? Perché è cambiata l'efficacia sinaptica dei singoli.

Questo fenomeno qua è stato (e vi saluto) è stato per la prima volta descritto da **Markram**, che non lo ha chiamato potenziamento sinaptico per via dell'interazione con la depressione: l'ha chiamata **redistribuzione dell'efficacia**. Perché nella sua mente lui vedeva che prima l'efficacia era sul primo e adesso, cambiando, è come se questa efficacia distribuita su questo treno di eventi si sia ridistribuita, si sia spostata. Si era immaginata una specie di conservazione delle ampiezze e semplicemente una redistribuzione: adesso non ce l'hai più qui ma ce l'hai in mezzo (o all'inizio). E ha un sacco di implicazioni notevoli.

Alla settimana prossima! Grazie.

Introduzione

Prima di iniziare faccio un brevissimo cenno a un notebook che vi ho messo a disposizione sulla parte della lezione pregressa. Comunque, con oggi avviciniamo il problema della generazione e caratterizzazione dei **segnali extracellulari**. Per il momento vi ho fatto vedere, e abbiamo discusso ampiamente, le basi biofisiche della generazione di segnali intracellulari, o registrati dal punto di vista intracellulare. Oggi di fatto iniziamo a vedere che cosa occorre per capire i segnali extracellulari.

Analisi del Notebook: *Short Term Synaptic Depression* Prima di fare questo, vado sul solito GitHub e c'è un notebook che si chiama **Short Term Synaptic Depression**. Di fatto ricalca e riprende la descrizione del modello marcoviano cinetico della depressione a breve termine, quindi della dinamica temporale delle vescicole, delle risorse per la neurotrasmissione che abbiamo visto la volta scorsa. Oltre ad avere il testo e le formulette, avete in teoria il codice Python per generare alcune figure che vi ho mostrato a lezione. Alcune sono così, non sono interattive. Se siete curiosi potreste voler guardare il come è fatto, dove sono le equazioni.

Questa cosa che non dovrebbe particolarmente turbarvi è per ciascuno di quegli stati, per ciascuna di quelle variabili che descrivono la frazione di vescicole in uno stato *R* (*recovered* ed efficace) o *I* (*inattivo*), è stato usato **Eulero**, il metodo numerico di Eulero, per cui la derivata temporale viene approssimata con il rapporto incrementale. Non è particolarmente complicato. La parte potenzialmente interessante era per farvi vedere dal punto di vista interattivo, particolarmente per la combinazione fra plasticità a breve termine e a lungo termine.

Quello che faccio qua è, di nuovo, simulare esattamente la stessa cosa, però

posso cambiare la frequenza. Posso cambiare la frequenza di arrivo di questo treno di potenziali d'azione presinaptici con frequenza uniforme, quindi sono intervalli fra un evento e l'altro che sono identici (di nuovo l'università che mi paga lo stipendio ogni mese). Posso cambiare la frequenza e posso cambiare altri due parametri. Vedete che se rallento, se aumento la distanza fra uno spike e l'altro, il cosiddetto **inter-spike interval** presinaptico, cambia un pochino la dinamica dell'ampiezza delle correnti eccitatorie post-sinaptiche.

Ma qui ho altri due parametri. Il primo si chiama τ_{d2} ; non mi ricordo perché l'ho chiamato τ_{d2} , o meglio lo ricordo ed è un altro contesto, ma è il tempo, la costante di tempo di recupero dalla depressione. È la costante di tempo che dallo stato I ritorna allo stato R e adesso è 290 millisecondi. Se io lo rendo molto, molto rapido — pensate al lama che sputa, “sputacchia”, e adesso ha una capacità di ripristino delle vescicole contenenti il neurotrasmettitore rapidissima — vedete che sebbene io stia chiedendo alla sinapsi di rilasciare, rilasciare, rilasciare a una frequenza di 47 spike al secondo, l'ampiezza non è così drammaticamente diversa dal primo rispetto alle risposte agli altri eventi.

E se la metto ancora più breve, ancora più rapida, di fatto è una sinapsi... qui magari si incavola, mi dà errore perché a un certo punto potrebbe esserci da qualche parte una divisione per zero, da qualche parte c'è un $e^{-\dots t/\tau_{rec}}$. Quindi in una simulazione numerica se io metto τ_{rec} a zero qualcuno si deve inalberare, si deve arrabbiare. Comunque, quando non c'è un fenomeno, quando il *recovery* è istantaneo, vedete che l'ampiezza di EPSCs successivi praticamente non cambia. Invece quando c'è una certa inerzia, una certa dinamica, per esempio 190 millisecondi (100 – 150 sono i valori tipici biologici, perlomeno nelle sinapsi corticali), c'è questa attenuazione delle risposte.

Il terzo parametro che potete cambiare è U , che era la **probabilità di rilascio**, o la quantità di vescicole che vengono rilasciate a ogni istante, a ogni evento. E se io la abbasso drammaticamente, vedete ovviamente che l'ampiezza diminuisce: sto rilasciando molto meno neurotrasmettitore, vero. Quello che succede è che però, visto che ne ho rilasciato meno, poco, ne ho intaccato poco le riserve. Infatti vedete che qui le ampiezze non sono così diverse. Per vedere un effetto con questo valore di U devo andarci proprio a una frequenza molto, molto rapida e forse quasi non si vede, si inizia a vedere qua. Se vedete qui lo vedo dalla coda, che qui la prima e la seconda sono tutte interrotte, ma sembra un pochino più alto e poi tende a decrescere.

Questo vi può magari sviluppare l'intuito sull'interazione fra i parametri, quindi quello che è la frequenza presinaptica, la richiesta di uso, la costante di tempo di recupero, la scala temporale su cui avviene il recupero e la probabilità di rilascio. Quello che per esempio si vede è che una particolare interazione fra plasticità a lungo termine e breve termine potrebbe cambiare proprio U , potrebbe potenziare proprio il parametro U . Questo sarebbe il comportamento prima di un potenziamento a lungo termine e, se U la cambio, ho di nuovo una specie... quella che viene chiamata una **ridistribuzione dell'efficacia sinaptica**. È vero che alcuni eventi sono potenziati, ma altri sono molto più depressi. Per recuperare esattamente le tracce che vi ho fatto vedere nella presentazione della volta scorsa, nelle slide della volta scorsa, dovrei metterci dentro anche la facilitazione sinaptica e tutte le sinapsi probabilmente mostrano sia depressione che facilitazione allo stesso momento, però hanno parametri diversi. Comunque

spero che qualcuno possa trovare questo notebook interessante e utile.

Segnali Extracellulari: Panoramica e Tecniche

Allora, per questa parte di segnali extracellulari il testo di riferimento è di nuovo questo qui, *“Electric Brain Signals”*. Spero ci siano altri testi, come ho credo detto durante il weekend o quando è stato nei giorni scorsi in risposta a una vostra collega: potete trovare parte delle informazioni (che comunque è in maniera molto, molto ridotta rispetto a questo libro) anche in questo capitolo su altri testi.

Inizio col dirvi che, per motivare la storia dei segnali extracellulari, non tutto è intracellulare, nel senso che non tutte le tecnologie attuali permettono di misurare l'attività elettrica di un neurone alla volta e su scale temporali che sono quelle dei millisecondi, per cui ci permetterebbero di vedere i singoli potenziali d'azione. Nonostante questo sia un obiettivo, il Santo Graal del campo di ricerca, per cui io vorrei poter ascoltare le voci delle singole unità che compongono una rete e ascoltare le voci con buona risoluzione temporale, quindi avere una risoluzione temporale e spaziale molto bassa. Quindi in questo grafico, che è una descrizione della risoluzione della scala spaziale con cui tecniche diverse sono risolte, il desiderio sarebbe essere qui.

Limiti delle Registrazioni Intracellulari Infatti le *intracellular recording*, registrazioni intracellulari con un elettrodo che si chiama *sharp* (appuntito) oppure elettrodo da *patch*, che non necessariamente va dentro la pancia come un coltello ma si ferma nella membrana (vi ricordate, poi si applica una pressione negativa, eccetera, eccetera), sono in questa parte di questo grafico. Infatti permettono di misurare eventi che sono molto rapidi, dell'ordine della frazione di millisecondo.

Vi chiederò all'esame, grosso modo, quant'è la durata di un potenziale d'azione? Qual è la durata di un potenziale d'azione, a spanne? Quanto è la larghezza? L'ampiezza la sapete più o meno tutti. Dal potenziale di riposo al picco quanto c'è? Quanto? 100... 100, scusi? 100 volt? 1000 volt, ok. E più o meno quanto dura? Secondi, giorni, mesi, microsecondi, millisecondi, nanosecondi? Millisecondi. E a spanne? Quattro, uno... circa uno. Dipende dalla cellula, però tipicamente è un millisecondo.

Quindi idealmente vorrei essere qua e vorrei essere qua anche per vederne uno. Quanto è grande grossomodo la pancia di un neurone, il soma, il corpo cellulare di un neurone? Sono micrometri, ma più o meno quanto può essere? L'ordine di grandezza? Decine di micrometri, sì. Cellule diverse possono essere diverse e sicuramente, e oggi inizieremo a guardarlo, l'albero dendritico può cambiare drammaticamente le cose. Nell'uomo una cellula piramidale dello strato 5 della corteccia ha un dendrite apicale quasi un millimetro. In un progetto di ricerca che si è concluso qualche anno fa e di cui collaboravo, in cui ero coinvolto, vedeva perlomeno nei roditori delle cellule che dal talamo proiettavano alla corteccia per diversi millimetri, perché avevano un assone che era lunghissimo, però il soma grosso modo è quello indicato.

Quindi a me piacerebbe poter suonare la tastiera o sentire le singole note e il momento in cui sono scandite, quindi mi piacerebbe stare qua, sia nello spazio

che nel tempo, però potrebbe non essere possibile. Un elettrodo intracellulare o da patch nel soma di un neurone, a parte essere una cosa che richiede un laboratorio di ricerca, un tavolo antivibrazioni, una gabbia di Faraday, un micromanipolatore piezoelettrico, ok, è improbabile che questo sia mai estrapolabile a un contesto clinico. Ma soprattutto, una volta che un neurone ha una pipetta dentro la pancia, si verifica — l'ho detto altre volte — una diluizione del citoplasma, una dialisi del citoplasma, perché la pipetta è un volume enorme: dovete immaginarvi come il volume di uno stadio da calcio a paragone di una palla, per esempio. La palla potrebbe essere il volume intracellulare, lo stadio da calcio è l'intero volume [della pipetta]. Quindi esiste sicuramente una diffusione e un *washout*, un cambiamento drammatico del citoplasma e quindi dopo una mezz'ora, un'ora la cellula è morta. Sicuramente anche se io ritraggo la pipetta la cellula non è che stia particolarmente bene, anzi muore, dopo un po' muore.

Quindi è necessario muoversi anche perché se voi dovete avere un qualche quesito diagnostico non potete pensare di avere ogni volta un'operazione di neurochirurgia, di esporre una parte della vostra corpo; non è fattibile. Quindi tipicamente purtroppo si sta in questa parte: sto pensando all'EEG, alla risonanza magnetica, sono scale temporali [spaziali] di centimetri, se non decine di centimetri e quindi è una roba estremamente macroscopica.

Tecniche Macroscopiche e Risoluzione Temporale/Spaziale Dal punto di vista della risoluzione temporale io potrei avere una risoluzione macroscopica come qualcuno potrebbe essere al solito al di fuori di questa stanza, potrebbe sentirvi parlare, potrebbe... ora voi siete silenziosi, se voi faceste casino si sentirebbe un vociare generico e uno potrebbe, ok, non distinguere le singole voci, però potrebbe tracciarlo nel tempo con grande accuratezza. E questo è vero per l'EEG: l'EEG è scarso nello spazio ma buono nel tempo. Poi interpretare i segnali dell'EEG — iniziamo in qualche modo a giocarci — è un altro paio di maniche, è complicato interpretare, dare senso a quello, alle voci, al vociare confuso di un grosso gruppo di persone, di neuroni. Potrebbe essere confuso, però io lo posso sentire.

Ci sono altre tecniche come la risonanza magnetica funzionale (fMRI) che hanno una risoluzione temporale molto scarsa, delle decine di secondi, quindi scordatevi che ci sia un qualche correlato con l'emissione di potenziali d'azione; è più un qualcosa, come nel caso dell'fMRI, metabolico, particolarmente dovuto all'ossigeno.

Ci sono altre tecniche qui indicate come l'**imaging ottico intrinseco**, che vuol dire che senza fare nulla, per proprietà del tessuto ossigenato o non ossigenato, se voi illuminate con una sorgente luminosa una parte del tessuto corticale, vedreste che ha una caratteristica ottica di riflessione diversa. Sono stati studi pionieristici diversi anni fa.

In altri casi ci sono delle sostanze organiche che cambiano la loro conformazione e iniziano a diventare fluorescenti quando il potenziale di membrana in cui questi sono intercalati cambia. Si chiamano **voltage sensitive dyes** e all'interno di una membrana plasmatica hanno un dominio lipofilo, quindi ama stare fra i lipidi, quindi si intercala nella membrana e sente il potenziale transmembrana e cambia la propria conformazione a seconda del potenziale elettrico. Quindi

in teoria potreste, facendo con una tecnica di imaging, vedere come correlato ottico delle lucette che si accendono correlate con il potenziale di membrana.

Un'altra cosa che avviene, non so se c'è qui, sì, c'è l'**imaging basato sul calcio**. Di nuovo, delle sostanze che possono essere o messe dall'esterno oppure geneticamente ingegnerizzate, così che sia la cellula che se le esprime direttamente come fossero delle proprie proteine di membrana, che non sono sensibili al voltaggio ma sensibili al calcio. Quando c'è calcio si legano, cambiano e florescono. Però è difficile che dal punto di vista clinico la gente inietti di queste molecole di coloranti *calcium imaging*, *calcium dye*, *calcium sensitive dye* o *voltage sensitive dye*. Quello che è molto più comune è la parte di elettrofisiologia, anche invasiva, però senza l'utilizzo di questi composti.

In questo caso avreste con il *calcium imaging* o l'*intrinsic optical imaging* avreste una risoluzione spaziale molto bassa, nel senso buona, del micrometro (potreste guardare anche un singolo compartimento di un neurone molto complicato), e una risoluzione temporale però di qualche ordine di grandezza più lenta rispetto all'elettrofisiologia, perché questi oggetti qui sono lenti a reagire, oppure perché il calcio intracellulare — adesso lo sappiamo perché in particolare per la storia dell'adattamento frequenza-dipendente, il conto bancario, eccetera, ho fatto quell'esempio anche in quel caso — impiega del tempo una molecola di calcio libero intracellulare a andarsene via, a essere estrusa o internalizzata nel reticolo endoplasmatico. Quindi tutto questo porta ad avere una scala temporale lenta.

Local Field Potential (LFP) A metà ci sono i cosiddetti **Local Field Potential**, di cui ci occuperemo, che sono una tecnica, una misura invasiva ed è in qualche modo elettrofisiologica, con un elettrodo, e a seconda del tipo di posizionamento, anche tecnologia, forma, hanno una risoluzione temporale che varia da qualche millisecondo fino a qualche decina di millisecondi, o pardon, decine di secondi o minuti. Sono parenti dell'EEG e capiremo che cosa sono. Solo per farla breve, non tutti i metodi di registrazione sono gli stessi. Ci sono alcuni metodi che sono per esempio basati sui campi magnetici o sulla emissione di positroni, topografia emissione di positroni (PET), e hanno vantaggi e svantaggi, ma soprattutto purtroppo sono collocati in una parte di questo grafico che potrebbe essere sfavorevole alla caratterizzazione nel dettaglio dei fenomeni elettrici del sistema nervoso. Inoltre queste scale temporali sono multiple, sono eterogenee e sono multiple.

Comunque, io desidero soffermarmi su questa parte qui, che sono i Local Field Potential, chiamati anche *low frequency part*, anche se è sbagliato, in letteratura non lo trovate ancora. Vuol dire che rispetto agli spike — sono indicati qui come *sodium spike*, sono quelli che conosciamo, questi sono gli spike extracellulari, si chiamano anche **multi-unit activity** — sono in grado di... quindi Spikes e Local Field Potential sono il tipo di segnale, sono due facce dello stesso segnale che potete misurare se inserite un elettrodo in profondità, oppure in superficie come l'elettrocorticogramma, oppure sullo scalpo come l'EEG. Comunque, quello che è richiede una descrizione a scale spaziali diverse e resta ovviamente la domanda su che cosa significhi che gli spike hanno una caratteristica in frequenza dell'ordine delle centinaia o migliaia di cicli al secondo mentre i Local Field Potential hanno qualcosa di più lento. Al di là della definizione che dico io, che il Local Field Potential è la parte a bassa frequenza, che cosa mi dicono

del fenomeno biologico? Forse se questi sono lenti mi stanno parlando di attività sinaptica, mentre questi che sono veloci mi stanno parlando dei potenziali d'azione? Tutto molto bello ma occorre in qualche modo poterlo capire, poter verificare se questo è il caso.

Relazione tra Segnale Intracellulare ed Extracellulare

Questo è un esempio di quello che è, in modo estremamente intuitivo, la situazione delle tecniche che abbiamo visto finora. Normalmente possiamo, con un accesso intracellulare, accedere a tutto quello che può... allora in effetti non è neppure tutto, comunque [accediamo] con la massima risoluzione temporale registrando l'attività cosiddetta **sotto-soglia** e **sopra-soglia**. Vuol dire l'attività sinaptica, che io vedo qui sotto-soglia perché il neurone la sta integrando, e vedo anche l'attività cosiddetta sopra-soglia perché il neurone spara in alcune condizioni e io vedo questi segnali che sono molto più grandi in termini di rapporto segnale-rumore.

Quello che ho detto comunque — questo elettrodo intracellulare non è la fine della storia in teoria, andando nella direzione della massima accuratezza — è vero perché il neurone non è una pallina, non è una sfera. Ha un incredibile, in alcuni casi incredibile, albero dendritico e albero assonico; quello che genericamente viene detto **neuriti** (vuol dire dendriti e/o assoni, è un termine generico). Queste arborizzazioni hanno — e lo vedremo oggi — non sono **isopotenziali**, non sono allo stesso potenziale elettrico. Se lo fossero, e lo fosse pure il soma, potrebbe avere senso che io registro nel soma: “Ok, quello che fa laggiù la sinapsi, il compartimento del dendrite dove la sinapsi sta insistendo, è la stessa cosa”. Il potenziale invece no [non è lo stesso].

Come potete immaginare, anche per esempio l'assone è una struttura morfologicamente, elettricamente distribuita — si dice **elettrotonicamente distribuita** — e richiederebbe di avere un modo di registrazione con tante pipette intracellulari simultanee, oppure con tanti di questi coloranti voltaggio-dipendenti che sono distribuiti su tutta la membrana del neurone. Quindi in teoria potrei vederlo come un albero di Natale, potrei vederlo in punti diversi, potrei vedere l'attivazione, l'onda di quello che è l'attività elettrica che si propaga nella stessa cellula.

Il problema è che quegli oggetti lì potrebbero essere tossici. Potreste fare un esperimento che dura qualche minuto e poi c'è un fenomeno di tossicità che ammazza le cellule; potrebbe esserci una tossicità indotta dalla luce (dovete avere una forte sorgente di luce e avviene una progressiva inattivazione di questi oggetti che si chiama *bleaching*, come la candeggina, sbiancamento, si chiama **photo-bleaching**). Quindi quello che potrebbe sembrare senza problemi, in realtà comunque è una tecnica sperimentale che magari vi fa vedere, vi dà la possibilità di vedere pochi secondi e poi non vedete più nulla.

Registrazioni Extracellulari: Multi-Unit vs Single-Unit La cosa che si è evoluta prima, in effetti più semplice ancora delle registrazioni intracellulari, è la tecnica delle **registrazioni extracellulari**, in cui [si parla di] misura dell'attività **multi-unit**, multi-unità. Le unità quali? Unità neuronali. “Multi”

perché evidentemente, come questo microfono — voi non state parlando, ma se voi steste parlando, questo microfono sentirebbe più voci simultaneamente — perché nello spazio extracellulare, per sentire la voce solo di una persona, ve lo dovrei mettere in gola, e allora lì sentireste solo la mia voce, la voce di un'unica unità (**single unit**). Che potrebbe essere possibile, di sicuro lo è con un elettrodo intracellulare; con un elettrodo extracellulare è più complicato.

Associato a questa tecnica extracellulare ci sono altri termini — di nuovo lo ripeto — questi **Local Field Potential**, corticogrammi, elettroencefalogramma. E alla fine potreste pensare che dal punto di vista extracellulare, in modo molto banale, voi sentite soltanto l'eco dall'esterno e dei segnali più forti. Una cosa molto semplice a cui potreste pensare è che quando un neurone, dentro rispetto a fuori, emette un potenziale d'azione, vuol dire che l'interno diventa più positivo dell'esterno. Quindi è come se delle cariche positive qua, che sono per esempio ioni sodio, entrassero di botto perché si aprono i canali sodio e quindi lasciassero un vuoto di ioni positivi all'esterno.

Quindi all'esterno voi vedreste che il potenziale localmente potrebbe drammaticamente cambiare: cambierebbe in negativo. Quindi il duale, l'opposto rispetto al potenziale d'azione intracellulare che invece è una deflessione positiva. Ma per farla breve, vedreste soltanto gli eventi drammatici. Perché sì, è vero, le sinapsi quando si attivano il neurotrasmettitore si lega al recettore post-sinaptico, c'è un flusso di carica (nel caso di AMPA/NMDA è un mix fra sodio e calcio; potrebbe essere invece per GABA-A il cloro, GABA-B il potassio; per i recettori metabotropici credo che sia di nuovo sodio e calcio eccetera), però queste correnti potrebbero essere molto piccole e quindi io, dal punto di vista extracellulare, potrei semplicemente non essere in grado di misurarle, o meglio le misuro ma sono coperte dal rumore.

Filtraggio del Segnale: Spike vs LFP Viene fuori che un elettrodo extracellulare sì “funzionicchia”, però vi fa vedere soltanto gli spike; quello che perdete è tutto il mondo della integrazione dei segnali sinaptici sotto-soglia. E quindi la domanda è: è così? Se un neurone non spara mai potrei non vedere nulla? Nella realtà le cose sono ancora più complicate.

Nel senso che se voi prendete un elettrodo extracellulare e lo mettete in punti distinti della morfologia di un neurone — adesso la morfologia è importante, ed è importante perché è qualcosa che è estesa per decine di micrometri, fino a centinaia di micrometri nel caso delle cellule più grandi e delle cortecce di mammiferi più grandi — avreste in un caso come questo (che è una simulazione, e ci arriviamo a vedere come questa è stata fatta, del potenziale elettrostatico extracellulare... lo continuo a chiamare elettrostatico perché non siamo in un regime... le quantità cambiano nel tempo, ma non siamo in un regime di radiofrequenza, non siamo in un regime in cui le equazioni di Maxwell prevederebbero la generazione di un campo magnetico concatenato al campo elettrico; per questo si continua a chiamare caso elettrostatico. Non è che statico vuol dire per forza lo *steady state*, vuol dire a basse frequenze e lo vedremo: le cose più rapide che sono sono i potenziali d'azione, hanno un contenuto in Fourier di frequenze fino a 1000–2000 cicli al secondo e sebbene possiate avere emissione di radiofrequenza a 1000 Hz, un kilohertz, difficilmente questa è un'attività elettromagnetica, una vera propagazione elettromagnetica).

Per farla breve, in questa simulazione si vuole rappresentare quello che è un elettrodo **ECoG**, quindi di elettrocorticogramma (quindi che è messo sulla superficie, quindi sulla pia, una membrana che isola sotto le ossa il tessuto cerebrale dal resto), oppure al di sopra dello scalpo, un elettrodo da **EEG**. Che cosa vedrebbe quando un neurone — e in questo caso non sto indicando questo neurone che sta facendo dal punto di vista degli input sinaptici; io so solo che intracellularmente questo neurone sembra ricevere degli input sinaptici, integra e fa uno spike.

Se metto un elettrodo vicino, extracellulare, vicino al soma, vedo quello che vi ho detto: vedo una forte deflessione negativa. Però occhio con forte o debole. Qui, come diceva il vostro collega, lì è una botta di 100 millivolt, che è una cosa notevole. Fuori, nonostante durante queste botte enormi, io prima di tutto vedo soltanto... sembra quasi che io non veda il comportamento sottosoglia, come vi ho anticipato prima. Quindi è come se ci fosse una specie di **filtraggio pass-alto**, come una specie di **derivata**. Cioè è come se io, se faccio la derivata qui, magari gli cambio segno... chiaramente la derivata di qualcosa che è molto molto ripido è grande, una velocità grande. Voi sapete che se prendo la derivata di una certa quantità il valore assoluto ha a che fare con il cambiamento nell'unità di tempo, quindi tanto più una cosa è rapida, tanto più è ampia nel mondo della derivata.

Infatti qui queste transizioni, questa dinamica [sottosoglia] è piuttosto lenta, è di qualche decina, centinaia di millisecondi; qui [nello spike] è una frazione di millisecondi. Per questo a spanne dico: dovete sapere che grosso modo uno spike si esaurisce nell'arco di un millisecondo, così se vi chiedo “ma qual è la *upstroke phase*?”, voi potreste dire: “Ok, mezzo millisecondo, 0.25 millisecondi, una frazione di millisecondi”. Quindi fuori io vedo un segnale che è negativo e fondamentalmente non vedo nulla dell'attività sotto-soglia.

Se però sposto lo stesso elettrodo in punti diversi, per esempio qui, dove presumibilmente stavano arrivando degli input sinaptici... pardon c'è una cosa che volevo dire, occhio a parlare di forte o non forte. Qui è millivolt; qui è vero sono 100, ma sono **microvolt** (μV), quindi 10^{-6} , quindi mille volte più piccolo per un neurone. Quindi decine o centinaia di microvolt, che è la situazione attuale che per esempio vediamo in laboratorio quando utilizziamo degli elettrodi extracellulari sopra i quali facciamo crescere i neuroni: al massimo vediamo qualche centinaio di microvolt questi segnali.

Se spostate l'elettrodo altrove (trascurate l'aspetto magnetico, questo è solo per dire che in teoria con i principi primi potrei anche derivare e capire, dal punto di vista non soltanto elettrico, quello che succede), spostandomi qui, comunque la scala non è particolarmente cambiata. Addirittura questo è diventato una frazione di microvolt, una roba che è cento o mille volte più piccolo di quello che era l'ampiezza dello spike extracellulare che vedevo qui. Qui però vedo qualcosa che sembra essere una specie di segnale strano, che diventa prima negativo e poi positivo. Forse questa cosa qua ha a che fare, sebbene sia estremamente piccola, praticamente quasi impossibile da registrare... forse è l'eco extracellulare dell'apertura di un canale AMPA, un recettore AMPA. Fa entrare degli ioni carichi positivamente, quindi lascia una negatività dall'esterno. Io probabilmente la vedo questa negatività. Qui nell'albero dendritico, al top dell'albero dendritico, vedo un segnale simile.

Local Field Potential e EEG Nota: nell'EEG posso fare la stessa cosa immaginando che, dal punto di vista elettrostatico, di modellare lo scalpo, modellare non solo la distanza... qui alla fine siamo nel mondo dell'elettrostatica dove conta se io mi allontano dalla sorgente: i segnali cambiano come $1/R$, $1/R^2$, contano le distanze. Se ho un elettrodo nella pancia del neurone no, perché registro quello che tutto il soma dal punto di vista elettrico sta facendo. Qui conta. E se vedete qui siamo a una frazione di **nanovolt**. Ed è... non riuscirei a fare come avrei voluto durante la prima lezione (per tanto tempo ho provato con degli elettrodi, gli stessi elettrodi, a mettermeli in fronte), semplicemente è impossibile: c'è troppo rumore elettromagnetico. Vi ho raccontato la 50 Hz famosa e altri rumori intrinseci dell'amplificatore, per cui segnali che sono nanovolt... è vero, non ho un unico neurone, ne ho qualche miliardo, tant'è non conta, i segnali sono oscurati dal rumore. Questo sarebbe il correlato di un unico neurone.

Sembrerebbe interessante quindi che l'estensione spaziale debba essere presa in conto e qualche cosa del tipo: adesso che so il comportamento elettrico eccitabile del singolo neurone, forse lo posso combinare con quello che è una trattazione elettrostatica più classica. Se ho una distribuzione di cariche nello spazio, allora posso calcolare qual è il potenziale in questo punto, per esempio vedendo tutte le distanze. Vi ricordate il potenziale elettrico? Era la somma pesata, pesata dalla distanza, delle singole cariche, andava come $1/R$, cariche puntiformi. Qui non sono proprio cariche puntiformi perché io me lo sto immaginando proprio come qui ci sono dei buchi, dei pori, dei canali ionici che si attivano succhiando... sono come dei pozzi in cui se ho una carica scompare lì dentro, oppure sono delle sorgenti, sputano, hanno un soffio di ioni, di particelle cariche, cioè sono delle correnti. Quindi forse la trattazione deve essere leggermente più complicata, più raffinata, ma mi fa pensare che se io di questo neurone so tutto, allora posso predire quello che è dal punto di vista extracellulare in punti diversi il potenziale elettrico all'esterno.

E questo può essere cruciale per dire: guarda che se tu dal punto di vista sull'EEG, sullo scalpo, stai registrando dei segnali così, guarda che non vuol dire che i neuroni si sono attivati a questo momento. Qui addirittura si vede l'eco dello spike, ma di nuovo è una frazione di nanovolt e se voi anche avete un miliardo di queste cellule, qualche milione magari sotto (anche perché la corteccia umana è convoluta, quindi è difficile che ci sia una parte piatta... questo è in scala più o meno, quindi questo neurone potrebbe essere accompagnato da qualche milione di altri neuroni vicini), è improbabile che sparino allo stesso identico microsecondo. In quel caso sì, avreste una sommazione di questi picchetti e li vedreste sull'EEG. E, *by the way*, si vede durante stati patologici di epilessia, dove si vedono alle volte degli spike... si chiamano spike, non necessariamente sono spike [intracellulari]. Convenzionalmente questo si chiama potenziale d'azione e dal punto di vista extracellulare si chiama spike. Comunque si vedono degli spike perché c'è una sincronizzazione patologica.

Interpretazione del Segnale Grezzo: Filtri Passa-Alto e Passa-Basso

Quindi come facciamo a estrarre del senso da questa cosa del extracellulare? Vi faccio vedere prima di partire due caratteristiche. Noi ci concentriamo su questa parte qui, quindi il **segnale grezzo** che voi vedreste da un elettrodo metallico di qualche frazione di micrometro, quindi c'è una parte metallica di qualche

micrometro quadro di superficie esposta all'ambiente extracellulare messa vicina a qualche neurone. Questa è la traccia grezza. Notate qui non c'è l'unità di misura ma sono microvolt e vedete che ci sono delle deflessioni lente e poi ogni tanto ci sono dei picchetti. Lasciate perdere ora che questi picchetti vanno in su anziché andare in giù come vi ho fatto vedere, non è così cruciale, qui è la tecnica, semplicemente la tecnica di registrazione che è diversa.

Qui è solo per dire che se prendete questa traccia e fate un **filtraggio passa-alto**, cioè di fatto prendete una componente frequenziale (probabilmente qualcosa che state... ditemelo se è qualcosa che non state vedendo con Gibertoni e Gibaldi... questo potrebbe essere cruciale), dovrete fare qualcosa del tipo del filtraggio. Qui non voglio buttare via il rumore, non voglio fare un filtraggio passa-basso o passa-alto per buttare via del rumore; voglio isolare delle caratteristiche diverse.

Se infatti butto le componenti lente gratis ho che questa *baseline* che oscilla non ce l'ho più. Infatti la traccia filtrata non è esattamente la stessa (questa comunque è una traccia registrata nel nostro laboratorio): è piatta per definizione perché io ho tolto la continua, io ho tolto le componenti di Fourier a frequenza molto bassa. Infatti la traccia non... quello che restano sono queste depressioni molto molto rapide, sono negative, sono spike. Sono fenomeni che se io zoomassi (e lo farò nel prosieguo) hanno una durata che è molto simile, un po' più piccola di quella che è la durata di uno spike intracellulare. Beh, grazie, sono il correlato extracellulare, adesso io lo so. Però se io guardo, se io... allora questa è la teoria, se io registro un segnale e lo vedo così, devo giocarmela per poter in modo convincente dire: "No no, questi sono degli spike di un neurone".

È un neurone solo? Perché io qui vedo che ci sono degli eventi che sono grandi uguali e poi ce ne sono altri che sono un po' più piccoli. Forse l'elettrodo è qui e ho un neurone più vicino e un neurone più lontano. Quello più lontano ha senso che possa essere attenuato nel suo effetto che ha sull'elettrodo. Mentre, quindi queste alte frequenze vuol dire fra 100 e 100 Hz o 100 cicli al secondo e 5000 cicli al secondo, quindi fra 100 Hz e 5 kHz.

E invece se prendo con un **filtraggio passa-basso** soltanto la componente lenta non ho più i picchetti, sono troppo veloci, li ho tolti e un filtraggio passa-basso passano solo quelli i segnali lenti. E vedete che ho un segnale che per definizione, avendo filtrato fra 0 e 100 Hz, 100 cicli al secondo (dico cicli al secondo perché Hertz alle volte vi può far pensare a spike al secondo e qui è un altro mondo, qui è il mondo dei segnali analogici in cui sto parlando in effetti di una componente di frequenza nel senso del dominio delle frequenze, nel senso di Fourier), e se lo faccio qui per definizione ho dei segnali che hanno delle frequenze che sono più basse del mio *cut off*, della mia frequenza di taglio che è tipicamente attorno a 100 Hz.

Fra parentesi se voi vi andate magari a un epsilon a guardare la parte introduttiva di questo corso vi ho raccontato qualcosa sull'EEG e vi ho detto se non mi ricordo male che nell'EEG in modo fenomenologico, in modo del tutto descrittivo si descrivono oscillazioni più lente, oscillazioni un po' più veloci, si danno dei nomi convenzionali: frequenze gamma, frequenze alfa, frequenze beta. Avete... vi ricordate qualcosa? Per esempio **gamma** era fra 50 e 70 e 100 hertz, **alfa** e **beta** sono associate con alcuni stati del sonno, **delta** e ulteriori sono

lente, sono fra 0 e 100 hertz, se non altro perché vengono fuori da un filtraggio del genere e quindi grazie, il segnale non può comunque essere, visto che ho buttato via la parte a più alta frequenza non contiene altre oscillazioni.

Questo è quello che viene chiamato il **Local Field Potential** e queste fluttuazioni, queste frequenze, questi parlano di attività comunque neurale, solo che non so... mentre gli spike sono semplici da capire, ok, deve esserci il soma da qualche parte e io sto osservando il risultato dell'integrazione sinaptica, l'emissione di uno spike. Qui ho l'impressione che debba essere qualcosa in modo molto più rozzo, probabilmente a livello di popolazione, non di singola unità, di attività magari sinaptica, però devo cercare di capirlo.

E *that's it*, qui la parte su cui volevo insistere è che LFP spesso, adesso si sta iniziando a vedere, particolarmente dal punto di vista didattico, per definizione si parla di componente a bassa frequenza, perché Local Field Potential ha implicitamente il concetto che sia un campo elettrico, un potenziale di un campo elettrico che io sto misurando e che sia locale. Locale dove? Locale nel senso di qualche decina, centinaia di micrometri attorno all'elettrodo. Sì, ma dipende dall'elettrodo e forse, di nuovo, è più corretto parlare dell'azione che uno ha avuto sul segnale, piuttosto che già saltare su quello che eventualmente potrebbe non esserlo, la scala spaziale.

Qui per l'attività **multi-unit** o **single unit**... ripeto, credo che questo sia multi-unit perché qui le unità sono più di uno, queste e queste hanno ampiezze distinte. È vero che, lo vedevate anche con la simulazione del modello di Hodgkin e Huxley, lo stesso neurone poteva sparare dei potenziali d'azione che erano i primi del treno, potevano essere molto ripidi, gli altri potevano essere un po' degenerati. Questa *slope* tendeva a piegare quando chiedevo al neurone di sparare in modo molto rapido. E se di mezzo fra V intracellulare e V extracellulare c'è una qualche derivata rispetto al tempo (ve lo devo far vedere perché questo non è...), se questa è una derivata potrebbe anche essere che lo stesso neurone abbia degli spike più ripidi, altri meno ripidi e io lo veda con delle ampiezze più basse o più alte a seconda della ripidità. Quindi c'è intrinsecamente un'ambiguità: è la stessa unità che magari ha sparato due volte di fila per cui il secondo spike è leggermente meno *steep*, meno ripido, più *sloppy*, più scarso? Lì non è che me ne accorgo, l'ampiezza potrebbe essere uguale ma la salita è un pochino più bassa perché le correnti sodio-voltaggio-dipendenti non sono così intense, perché i canali voltaggio-dipendenti, sodio-voltaggio-dipendenti non sono al 100% pronti e disponibili, alcuni sono inattivi e se di mezzo c'è una derivata, sì l'ampiezza mi fa [conta], però mi conta anche la *slope*, la pendenza. Quindi tutto è: posso estrarre un qualche senso su quello che io vedo extracellularmente? Perché così è un gran casino, diventa euristico: "questi segnali sono veloci, quindi sono potenziali d'azione", ma quanti sono? Ok, diventa un pochino complicato.

L'Esperimento di Joao Couto: Patch-Clamp ed Extracellulare Simultaneo Questo è un esempio eroico, e lo tengo perché ci sono affezionato, di uno studente di dottorato che adesso è ricercatore all'Università della California a San Diego mi pare, o a San Francisco, non mi ricordo San Francisco, **Joao Couto**. Quando eravamo in Belgio, eroicamente ha messo nella corteccia prefrontale di un ratto anestetizzato non soltanto una serie di elettrodi extracellulari, ma ha pure infilato una pipetta, grosso modo — non ha beccato

esattamente la stessa, però grosso modo con un angolo per cui la punta della pipetta di vetro, un elettrodo da *patch* in vivo, quindi ulteriormente eroico — era grossomodo nella stessa regione dove c'erano gli elettrodi extracellulari.

E quello che vedete è che qui sono più tracce e hanno degli artefatti perché non ho la traccia giusta, quindi questa è un'immagine e l'ho voluta strecciare per poterla allineare in modo autentico con quello che lui ha registrato allo stesso momento, simultaneamente, dal soma di un neurone. Il soma di quel neurone in qualche modo faceva d'antenna rispetto all'attività di rete. E io qui... lui, io non facevo nulla, con gli elettrodi 1, 2, 3, 4 (in realtà ne aveva 8, qui sono 1, 2, 3, 4, sono delle metallizzazioni su una specie di forchetta) registrava soltanto gli eventi veloci, perché i Local Field Potential qui non erano particolarmente indicativi. Quindi ha filtrato soltanto la parte ad alta frequenza per far vedere la multi unit activity.

E vedete che l'attività extracellulare sembra essere organizzata a pacchetti. Non so se a voi o ai vostri colleghi del secondo anno qualche settimana fa ho raccontato del sonno, *slow wave sleep*, in cui durante il sonno o l'anestesia la corteccia ha una modalità di oscillazione fra attività **UP** e attività **DOWN**: up, down, up, down. Dipende dall'anestetico però nel caso della ketamina-xilazina che viene usata in questo esperimento è mantenuta come nel sonno.

Quindi questa attività sembra essere sincrona e sembra essere a pacchetti e intracellularmente il neurone ha questa attività sottosoglia che non la vedete, vedete soltanto forse qui l'eco di quello che è l'occorrenza dell'attività che si vede extracellularmente. Quando il neurone spara, questo neurone spara, non è che ne spara tanti di spike in uno di questi *up state* (lo chiamo up perché il potenziale sembra essere stabilmente per qualche decina o centinaia di millisecondi, sembra essere più depolarizzato, sembra essere bistabile, come se ci sia un bombardamento sinaptico che qui è spento, qui è acceso, qui è spento e qui è acceso). Però qui per esempio il neurone non spara, lui non spara ma qualcun altro evidentemente lì vicino ha sparato.

Quindi, alla fine — e ora facciamo il break di 10 minuti — sarebbe bello poter correlare l'attività intracellulare (questa era il soma), addirittura l'attività intracellulare in tutto l'albero dendritico, e dare senso a quello che è l'attività extracellulare. In questo caso probabilmente sono altri quattro neuroni che erano nella periferia che più o meno facevano la stessa cosa perché tutti quanti avevano attività spiking grossomodo all'occorrenza di questi *upstate*. Mi fermo per dieci minuti.

Relazione Derivativa tra Segnale Intra ed Extracellulare

Ok. Ok. Riprendiamo piano piano. Ok allora qui è un altro esempio in cui di nuovo in modo eroico, ma un po' meno eroico di quello che è stato fatto in vivo da Joao Couto, due ricercatrici del laboratorio quando ero in Belgio e prima ancora a Berna hanno fatto però *in vitro*, quindi non *in vivo* ma *in vitro* su una coltura di neuroni dissociati che crescono su una matrice di microelettrodi planari (**MEA**). Come le vostre sedie, forse l'ho menzionato e vi ho fatto vedere già una registrazione, come le vostre sedie dove voi poggiate il vostro fondoschiena, così i neuroni si appoggiano a una superficie e si appoggiano in alcuni punti su un elettrodo. Elettrodo che è stato microfabbricato con gli stessi principi e

tecnologie della microfabbricazione tramite microfotolitografia. Se sapete come vengono [fatti], che cosa sono i circuiti stampati o anche PCB, *Printed Circuit Board*, o i chip, i microprocessori o comunque i sistemi ad altissima integrazione sono di fatto con la stessa metodica. Qui in qualche modo, nonostante sia piccolo, sono comunque a un ordine di grandezza più grande. Ciascuno di questi elettrodi è dell'ordine dei 50 o 30 micrometri e la distanza fra due elettrodi è 200 micrometri.

E qui vedete un grande casino nel senso che ci sono... quello che si dice per altri tipi di cellule si chiama confluenza, le cellule sono impaccate così tanto che si toccano, il loro soma si tocca, non si vedono i processi neuritici, assoni e dendriti non sono visibili, sono immersi. Dopo un po' che stanno in coltura, dopo circa due o tre settimane, queste colture, queste reti bidimensionali, sono molto interessanti perché permettono di studiare il comportamento emergente dovuto alle connessioni. Hanno ogni tanto questa attività che se volete è uno zoom di quella che *in vivo* vi ho descritto in modo molto breve, *up state*, quindi questo è probabilmente... cazzo non c'è la scala del tempo... Questo deve essere attorno a 200 millisecondi.

Di nuovo qui vedete la registrazione extracellulare. Vedete che il segnale è leggerissimamente diverso da prima. Prima in qualche modo sembrava che il segnale extracellulare fosse una deflessione totalmente negativa. Adesso sembra essere qualcosa che è fatto così. Oppure qualcosa che potrebbe essere fatto così. Scusate, questo va giù dritto con queste gobbetto che seguono o precedono. Questa è una registrazione non simultanea, in questo caso, fatta dalla dottoressa Anastasia Moskaliuk, che insisteva dicendo "no, secondo me questo non è il comportamento di un singolo neurone, questa è la rete". Allora, per convincermi che stessimo sbagliando, ha fatto la registrazione intracellulare e ha riscoperto che effettivamente anche le singole cellule, i singoli neuroni che sono attorno a questo elettrodo, hanno lo stesso comportamento di *up state* e *down state*.

La cosa interessante è che il comportamento sembra essere non solo un'emissione irregolare di potenziale d'azione, quindi molto diverso rispetto a quello che abbiamo visto nelle simulazioni in cui applicando una corrente il neurone si comporta come una specie di pacemaker; qui sembra essere un comportamento disordinato, disorganizzato, e poi il potenziale di membrana sotto soglia sembra essere un **random walk**, una specie di processo stocastico, una realizzazione di un processo stocastico che fa pensare che sia l'integrazione di tanti input sinaptici che però non arrivano in istanti sincroni, istanti allo stesso momento, arrivano in modo asincrono, in modo disordinato.

Per farla breve, ovviamente, di nuovo, ci sono differenze enormi. Io qui vedo soltanto l'attività sopra soglia, nel senso che vedo soltanto in corrispondenza degli spike. Qui sono 100 millivolt di segnale, qui sono qualche decina di microvolt purtroppo. Quello che si vede qua è che l'ampiezza di questi segnali extracellulari sembra cambiare, particolarmente durante questa fase iniziale. Quindi qui potrebbe essere che sia qualcosa che abbia a che fare con l'adattamento frequenza-corrente. E poi ci sono questi due puntini che vi ho evidenziato dove chiaramente ci sono dei segnali che hanno un'ampiezza completamente diversa. Poteva essere un neurone che era leggermente più a destra, più lontano dall'elettrodo e che ha sparato per conto suo durante questa epoca, si chiama epoca di attività sincrona. Però era più distante, lo vedo anche qui.

Quindi questo segnale, allora lo dovrei chiamare un segnale **multi-unit**, è semplicemente la parte filtrata ad alta frequenza, di cui Local Field Potential non hanno particolarmente senso, non hanno un particolare contenuto. Probabilmente perché è un monostrato cellulare; nel caso del cervello un blocco di tessuto, qualunque cosa sia il Local Field Potential, probabilmente è l'effetto di sommazione in 3D. Qui in 2D il Local Field Potential non contiene particolari, non avete particolari eventi, lo avete nella parte ad alta frequenza e in questo caso è multi unit activity perché sicuramente sono più di una unità. Quindi di nuovo qui è filtrato da 100 Hz o 100 cicli al secondo fino a 5.000 cicli al secondo o 5 kHz, mentre questa, la parte intracellulare, non è filtrato se non a 5 kHz. E in entrambi i casi la frequenza di campionamento è dell'ordine dei 20 kHz, 20.000 campioni al secondo, che è un'informazione che c'entra e non c'entra col contenuto frequenziale, sto pensando al teorema di campionamento di Nyquist.

Questo è un altro esempio, uno zoom della forma del singolo evento, che qui è — visto che la traccia è zoomata per far vedere, ripeto, qui saranno 200 — 300 millisecondi, l'evento è troppo veloce — qui è uno zoom delle singole tracce. Questo elettrodo registra questi eventi, quest'elettrodo qua invece vedete che ne registra un altro la cui forma ha una gobetta successiva come stavo dicendo. Quindi la domanda è perché uno ha una gobetta e l'altro non ce l'ha? Che cosa significa? Questi sono 10 microvolt, di nuovo questi sono 100 millivolt.

Elettrodi Extracellulari e Derivata del Potenziale Intracellulare E questo è un ulteriore esempio nella letteratura di un articolo che riprendiamo adesso fra un paio di slide in cui il potenziale intracellulare è stato misurato e lo stesso neurone aveva un elettrodo extracellulare simultaneamente nella sua prossimità. E sembrerebbe quindi esserci una relazione temporale fra quando il potenziale intracellulare smette di crescere, quindi il punto in cui la derivata prima diventa zero, e il segnale extracellulare non è proprio andato a zero, però è diventato molto piccolo. Prima era negativo — a parte deve esserci un meno — questo era una crescita e poi una decrescita, qui il segnale diventa negativo e poi positivo. Se c'è questa cosa che i segnali extracellulari sono la **derivata** dei segnali intracellulari... di nuovo non capisco perché dovrebbero essere la derivata. L'unica cosa che fa la derivata è il condensatore, la capacità, quindi è possibile che qui questo condensatore sia responsabile in qualche modo del fatto che da fuori io sento un segnale che non è l'accoppiamento diretto DC ma è un accoppiamento AC. In effetti in elettronica quando uno accoppia un sistema con un condensatore di fatto taglia la continua, sta facendo un'operazione di derivata.

Quindi l'idea è: come faccio a dare un senso a questo comportamento? La chiave di tutto è che i dendriti, non è una grande scoperta, probabilmente ve l'ho ripetuto altre volte durante le settimane pregresse, **i dendriti non sono isopotenziali**, non sono porzioni isopotenziali dello stesso neurone. Il fatto che i neuroni si siano evoluti per essere spazialmente distribuiti può essere letto come che abbia un significato, un motivo evolutivo per cui è necessario che il potenziale elettrico qui, al Soma, sia diverso da lassù dove ho i dendriti, dove pescano gli input, e magari anche diverso dal mio assone che sta proiettando da qualche parte. Potrebbe aver senso che ci sia la necessità di avere dei segnali che si propagano nel tempo. Ritardi? Forse è necessario per fare un processing

dell'informazione che ci siano delle linee di ritardo accoppiate come in alcuni paradigmi di computazione? Un'altra possibilità è che questo sia semplicemente un epifenomeno, nessuno ancora lo sa con certezza, il fatto che una rete possa essere cablata in modo efficace.

Tenete conto che in un pezzettino di corteccia di un centimetro di lato ci sono, credo, milioni di chilometri di cavi, di fili. Se i neuroni fossero puntiformi sarebbe potuto essere molto molto complicato per tutte le connessioni, semplicemente dal punto di vista del volume, attaccarsi, attaccare un neurone a un altro. Se io ho invece una struttura morfologicamente, geometricamente, spazialmente distribuita, ho tanti punti diversi per accettare degli input. Di nuovo, questo mi fa pensare... qui non ci sono gli alberi all'esterno... gli alberi hanno pure questo comportamento, infatti sono arborizzati, si chiamano arborizzazioni dendritiche (per questo anche dendrite vuol dire dal greco albero), sono probabilmente così perché devono competere con gli alberi vicini per beccare la luce, hanno le foglie e i rami che si estendono in alto per prendere, massimizzare la superficie, prendere luce. Qui forse devono massimizzare e prendere input sinaptici, oppure entrambe le cose. Può essere che questo sia sì un *leftover*, un qualcosa che l'evoluzione ha lasciato come effetto collaterale, però già che il neurone c'è potrebbe essere importante che abbia una superficie elettrica, elettricamente attiva, che possa integrare le informazioni.

Immaginatevi, e lo vedremo, se degli input sinaptici arrivano in modo lontano o in modo vicino. Forse hanno un effetto diverso nel reclutare il neurone. Alcuni potrebbero essere la famosa tigre che entra a lezione, i neuroni sensoriali potrebbero voler proiettare vicino al soma, perché magari il loro effetto potrebbe essere integrato molto più rapidamente in modo molto più efficace. Se sono lontani, alla fine se si comportano come dei cavi, i cavi con la distanza attenuano, alla fine sono dei pezzi di resistenza, può essere che abbiano forse meno senso, ci sono delle informazioni che vale la pena avere subito e altre che possono essere trascurate.

Il Paradosso del Neurone Puntiforme e la Necessità di Modelli Distribuiti Comunque il punto fondamentale è che non sono isopotenziali. Quindi questo è un'animazione, uno stupido *sketch* che vi ho fatto già vedere in cui la parte intracellulare, la parte extracellulare era descritta come un continuum resistivo e ancora lo teniamo questo che è un continuum resistivo. Adesso se mi date la possibilità di fare un'eccezione: nella parte extracellulare, che pure è un continuum resistivo, non è tutto allo stesso potenziale elettrico, però per il momento qui metterò dei cortocircuiti, cioè delle resistenze zero, dopo le ripesco queste resistenze. Qui ci sono le proprietà capacitive della membrana, del doppio strato lipidico e ogni tanto ci sono dei canali. Qui, ok, ci starebbe il potenziale di reversal di Nernst, però adesso non è così cruciale. Quello che ho fatto l'altra volta è dire, visto che la resistenza di questo poro è molto maggiore rispetto alla resistenza citosolica ed extracellulare, ignoro le altre, le metto a zero.

Stavolta non lo posso fare. Fuori lo faccio, ripeto, poi lo rimedio a questo, ma per il momento mi preme dire che non è una così buona idea, visto che questi cavi hanno una sezione di passaggio piuttosto piccola, forse con un lume di una frazione di micrometro o un micrometro (dipende dall'albero dendritico e

dalle varie diramazioni, può essere che con varie diramazioni il diametro diventi sempre più piccolo, fino a una frazione considerevole di micrometro). E quindi potrebbe essere che perlomeno in questo tipo di **resistenza longitudinale**, che è esattamente quello, non è transmembrana ma è longitudinale, conti se ho un pezzo di dendrite che è lungo qualche decina o centinaia di micrometri.

Quindi se io lascio queste resistenze, vedete bene che se c'è un resistore per la legge di Ohm, probabilmente se passa una corrente il potenziale qui è diverso dal potenziale qui. Quindi se questi sono due punti della membrana e indico, tocco il condensatore perché il condensatore è quello che dà la variabile di stato, dà la memoria, sono una specie di riserva, di carica, di *reservoir*, non riserva, di contenitore, di accumulatore, ecco. E visto che il potenziale in questo punto e in questo punto potrebbe non essere lo stesso, ecco che qui e qui sono due pezzi dello stesso neurone che hanno un potenziale transmembrana diverso. Questo non è un problema, è una complicazione, ed è fondamentale prendere questa complicazione per capire questa cosa dei potenziali extracellulari.

L'Esperimento di Buzsáki: Relazione tra Potenziale Intra ed Extracellulare

Questo è un altro esempio, di nuovo in una serie eroica di lavori pubblicati da **György Buzsáki**, ricercatore di fama internazionale, ungherese che lavora a New York da tantissimi anni. In particolare nell'ippocampo, già più di vent'anni fa, venticinque anni fa, aveva provato ad approcciare lo stesso problema. Qui, lo vedete, questa linea sottilissima è la punta, è la sezione laterale di un cono: è una pipetta, un elettrodo cosiddetto *sharp*. Io ve lo indico sempre così, ma in realtà è parecchio lungo, è una roba che può essere di diversi centimetri, la cui parte finale passa da un millimetro di diametro a un micrometro, ancora più piccolo di diametro.

Se lo mettete in un tessuto — credo che questo sia uno *sketch* in scala però opportuna — qui vedete una cellulina, che è una cellula piramidale dell'ippocampo, di CA1 dell'ippocampo (si chiama una zona anatomica che si chiama *Cornu Ammonis* 1). In questo caso la punta di questa pipetta sottilissima — che è quella pipetta lì, però messa in scala, in scala su qualcosa che è di qualche millimetro, 2-3 mm (questi sono 250 micrometri, quindi quattro di questi fanno un millimetro) — è praticamente invisibile, ma era dentro al soma di questa cellula. E nelle sue vicinanze, in modo eroico, questi hanno messo un **tetrodo**.

Un tetodo è un elettrodo extracellulare composto da quattro fili (qui ne dice tre, ma *tetra* sta per quattro) che sono più o meno come quando fate la treccia: sono intercalati e avvolti l'un l'altro fino ad avere la parte finale senza l'isolante. Quindi la punta di questo tetodo — che vi avrei dovuto far vedere ma non ve lo faccio vedere, che qui è paragonata a un cilindretto — in effetti ha una o più metallizzazioni vicine. Si comportano come, di nuovo, elettrodi extracellulari attaccati a un amplificatore e permettono di misurare il potenziale elettrostatico in quel punto.

Il che è di nuovo questo evento molto rapido. Questi sono due millisecondi, quindi questo è più rapido di un secondo... scusate, di un millisecondo. Questo

è 2 millisecondi. Qui è... ok, questo forse dovrei definire quando prendo la larghezza: una possibilità è prendere la **half width**, che vuol dire *half amplitude width*, cioè prendo il massimo, prendo questa distanza qua, la divido per 2 e a questa distanza misuro la larghezza dello spike. E grosso modo se questo è 2, sarà un pochino meno di un millisecondo.

Al di là di questa cosa qua della scala temporale che è utile, di nuovo, questa è qui la calibrazione spaziale... scusate, verticale: è 15 millivolt per questo grafico qui, mentre diventa 30 microvolt per il grafico in basso. Ma questo lo sapevamo, questi segnali sono molto, molto, molto piccoli. Ed è così pulito perché il neurone, visto che aveva una pipetta dentro alla pancia, è stato fatto sparare diverse volte in modo tale che loro potessero fare una media aritmetica di più ripetizioni; per questo è così pulito.

La Derivata del Potenziale Intracellulare La cosa che hanno fatto questi, che ha fatto Buzsáki per la prima volta, ha detto: che succede se io prendo questa traccia qui [intracellulare] e ne faccio la **derivata prima**? Fare la derivata prima di una traccia così è facilissimo, non è una funzione matematica per cui dovete applicare delle regole. Se avete un vettore su Python o su quello che è, e avete tanti numeri in tante caselline (tutti questi sono i campioni, per esempio: -65, -65, -64, -64, -63, -5, +20... sto drammatizzando), avete questi numeri messi qui.

Quindi se questo è v ed è un vettore, in qualche linguaggio di programmazione tipo Python si indica così, $v[i]$, e si mette qui un indice e questo indice è una variabile intera che dice dove vi trovate. Per fare la derivata basta che voi facciate:

$$\frac{v[i+1] - v[i]}{\Delta t}$$

E se volete potete dividere per il Δt , per il tempo, per l'intervallo di campionamento. Vi ho detto che grossomodo questi segnali sono per esempio campionati a 10, 15, 20 kHz, quindi potreste dividere anche per avere millivolt al millisecondo, ma se anche non dividete alla fine è solamente un fattore di scala.

Mi pare che in MATLAB ci sia un comando che si chiami **diff**, quindi se voi fate **diff(v)** avete automaticamente quest'operazione, punto per punto. E un altro modo per farlo è quindi fare $v[2:n] - v[1:n-1]$ (con MATLAB, in cui fondamentalmente usate questo che viene chiamato **slicing** in gergo, cioè vi permette di prendere un sottoinsieme del vettore). Qui dal punto 2, immaginando che partano da 1 come in MATLAB (anche se è una pratica non granché), da 2 a n meno lo stesso vettore però *shiftato*, che infatti parte da 1 a $n-1$, così che abbia questa differenza sempre, la differenza fra punti vicini.

Ottingo un segnale, la derivata. La derivata è questa tratteggiata, questa *dotted*, che non è così distante [dalla traccia extracellulare misurata]. Qui è un pochino... sembra un po' anticipata, però sembra che ci prenda parecchio. Quindi questa è una delle prime volte negli anni 2000 in cui la gente ha detto: andiamolo a capire qual è l'origine del potenziale extracellulare, focalizzandoci sullo spike, perché è un segnale grande, perché è facile (facile relativamente, però sicuramente è più facile avere una pipetta nel soma, che è relativamente grande, anche se qui è stato messo a caso ed è facile da registrare in prossimità).

Relazione Fisica: Correnti e Legge di Kirchhoff Quindi sembrerebbe esserci una relazione con il segno meno fra il potenziale extracellulare (V_{ext}) e il potenziale intracellulare (V_{soma}), col meno. Di nuovo questo ha senso intuitivo perché, ripeto, durante uno spike il sodio da fuori entra rapidamente dentro lasciando una negatività all'esterno, lasciando quindi... sparendo gli ioni positivi all'interno [dell'esterno].

Qualcuno di voi potrebbe sentirsi un po' risentito per dire: "Ma come, caspita, io sono un ingegnere e se amate i circuiti dite: ok, ma qui questa corrente entra dentro, però da qualche parte deve uscire, non è che i circuiti sono appesi". Quindi il circuito si chiama circuito appunto perché è chiuso. Quindi se qui ho una corrente sodio che entra, da qualche parte [deve uscire], perché altrimenti non è un circuito, non chiudo il circuito, non può scorrere una corrente che resti appesa. Per definizione di **legge di Kirchhoff**, se io ho un filo così, la corrente è zero, perché se prendo una superficie attorno a questo filo, la sommatoria delle correnti è nulla; l'unica corrente che entra o esce è una, però è quella lì uguale a zero.

Questo è anche il motivo per cui gli uccellini non muoiono su un cavo di alta tensione. Questo è un uccellino e se io faccio Kirchhoff, la somma delle correnti, I uguale a zero. Sì, è vero, hanno due zampe, ma questa la vediamo un'altra volta.

Variazioni della Forma dello Spike nel Treno Questa è la stessa traccia in cui fanno vedere che, quello che dicevo, se per caso la forma del potenziale d'azione per caso cambia in un treno di più spike... Vedete che qui sono potenziali intracellulari: il primo è questo che è il più iperpolarizzato, il più polarizzato e il più rapido; gli altri che siedono su questo *plateau* di depolarizzazione sono un pochino diversi, sono in particolare diversi sia nella fase di salita che nella fase di discesa. Quindi se c'è qualcosa che ha a che fare con la fase di salita e la fase di discesa, forse ha senso che nel grafico precedente la traccia vera del potenziale extracellulare risulti un po' *shiftata*, visto che qui sembra che questa parte qua sia pure *shiftata* nel tempo.

Per farla breve, qui hanno continuato a sostenere il fatto che anche non soltanto in uno spike isolato, ma in un treno di spike in cui si sa che il potenziale di membrana cambia, il potenziale d'azione cambia un pochino la forma... Il primo spike, il secondo spike, il terzo e il quarto sembrano essere molto correlati — qui è l'ampiezza, pardon, questa è ancora un'altra cosa — sembrano essere correlati con quello che è la **derivata** del potenziale intracellulare.

La derivata, se io la scrivo così, ovviamente questa è una quantità che cresce quanto più è ampia questo potenziale d'azione somatico. Questo lo ricordo: se ho una funzione che chiamo $g(t)$ e la sua derivata la chiamo dg/dt , se io moltiplico questo per 35 oppure per 63 oppure per 121, la derivata di questa nuova funzione che ha questa costante prima è quella che avevate prima per 35 o per 63 o per 121.

Quindi il fatto che questi ricercatori vedano che quando lo spike intracellulare è più o meno ampio, anche lo spike extracellulare sia più o meno ampio... quindi c'è, quando ogni puntino è un potenziale d'azione, e se io lo metto in un *plot* del genere: questa è la misura del potenziale d'azione registrato extracellularmente e

prendo questa come ampiezza (chiaramente microvolt... ok qui è millivolt perché 0.04, sono decine di microvolt in realtà), qui invece l'ampiezza intracellulare (infatti sono decine di millivolt), qui i punti si allineano in una nuvola. Per cui non è necessariamente che ci sia un determinismo, una relazione perfetta e non rumorosa, ma sembra che ci sia una correlazione, proprio come mi aspetterei se fosse una derivata. Quindi la derivata di una costante per una funzione è la costante per la derivata della funzione.

Poi ovviamente c'è una questione della **slope** (pendenza), perché la derivata... questo si vede bene per esempio se ricordate il grafico di una retta che cresce. Per esempio se io ho questa funzione del tempo $g(t)$ che è $\alpha \cdot t$. Se io... quindi questo α è il coefficiente angolare: quanto più è grande (se è positivo), tanto più questa retta passante per l'origine tende a essere più pendente. Io so che quando faccio la derivata di g rispetto al tempo ottengo α . Quindi non è sorprendente questa cosa che quando questi oggetti, queste forme d'onda, siano più ripidi — lì la ripidità l'ho semplificata, l'ho estratta al massimo, ed è addirittura il coefficiente angolare di quella retta — però rette più pendenti hanno derivate più grosse. Qui di nuovo, spike che hanno potenziale d'azione, che hanno la fase di salita più ripida come il primo, hanno un'ampiezza extracellulare più ampia. Quindi sembrerebbe che questa cosa della derivata torni.

Limiti del Neurone Puntiforme e Introduzione alla Teoria del Cavo

Tuttavia questo discorso, se uno lo vuole fare leggerissimamente più quantitativo, non sta in piedi se abbiamo, se consideriamo neuroni descritti con un formalismo puntuale. Questo è il modello tipo equivalente circuitale di Thévenin che abbiamo visto, in cui per semplicità, per far vedere e iniziare a insistere sul ruolo di quello che è l'input sinaptico, ho messo un arco ulteriore dovuto per esempio a delle sinapsi AMPA. Quindi qui hanno di nuovo il loro potenziale di equilibrio Nernstiano, qui hanno la conduttanza, la permeabilità di quel recettore post-sinaptico e quando questo si apre lascia passare una corrente in accordo con quello che è il potenziale elettrochimico della specie ionica a cui quel recettore post-sinaptico è permeabile.

Tuttavia, se io considero anche questa struttura e dico: “Ok, qui lo vedo che questa cosa ve l'ho descritta prima”, mi immagino la superficie del neurone come una membrana con tanti pori e questi pori si possono comportare come delle sorgenti o dei pozzi. Mi “sputacchiano” degli ioni, lo vedo di più come un flusso di ioni — l'abbiamo chiamato flusso, una corrente, una corrente ionica — però se faccio così per motivi elettrotecnici, di fatto qui nello spazio extracellulare l'uscita e l'ingresso di queste correnti è allo stesso identico punto: il circuito è chiuso qui nello spazio extracellulare.

Un **point neuron** (neurone puntiforme) ha i pori, ha i pozzi e le sorgenti praticamente coincidenti; non avrebbe qui... io fra questi due punti non ho alcuna caduta di potenziale, ho zero. Mi piacerebbe che fosse il potenziale extracellulare. Penso che debba avere a che fare con questa corrente che esce e magari poi rientra, perché deve rientrare a un certo punto, ma nel *point neuron* non c'è

modo, non c'è possibilità, perché queste correnti si cancellano, sì, ma allo stesso punto nello spazio, quindi non c'è verso.

Se inizio però a considerare una struttura spazialmente allungata, distribuita, sto pensando a un modello che sia una specie di quello che viene chiamato **Ball and Stick** (“palla e bastone”). Quindi ovviamente è una roba estremamente cruda, e addirittura non solo è cruda. Adesso vedremo che qui questo dendrite io lo posso descrivere in modo accurato.

La Teoria del Cavo: Da Lord Kelvin a Wilfrid Rall Forse l'ho menzionato durante la lezione introduttiva: lo faremo con un'equazione che è la stessa equazione dei cavi elettrici o delle linee di trasmissione. E mi colpisce perché è lo stesso formalismo matematico che nell'Ottocento **Lord Kelvin** ha utilizzato per i cavi oceanici, transoceanici per le comunicazioni telegrafiche. Ed è sorprendente: ma come, siamo nel 2025, sono 200 anni dopo e tant'è quella matematica funziona. Qui non vedete alcun cavo, sto semplicemente immaginando che ci sia un compartimento, come il grafico che vi ho fatto vedere prima, in cui vi ho chiesto... perdonatemi, per il momento fatemi semplicemente dire che esiste una resistenza assiale, citosolica, fra un pezzo e l'altro della membrana.

Qui questo è il soma e questo è il dendrite. Se volete è molto simile a quello che abbiamo fatto quando abbiamo visto le sinapsi elettriche. Lì erano due cellule diverse, qui è la stessa cellula e non c'è nessuna connessina, qui c'è semplicemente un buco: cioè questo soma è in diretto contatto elettrico, gli ioni possono muoversi e possono entrare e uscire da quest'altro compartimento. E quest'altro compartimento è fatto di membrana e quindi da qui all'esterno — dentro, fuori — ci sono le proprietà capacitive, ci sono le proprietà resistive (perché evidentemente ci sono canali di membrana), solo ripeto che qui è sufficientemente lungo per non poter più assumere che sia isopotenziale.

Qui se gli ioni si muovono incontrano una resistenza; la distanza è sufficientemente grande da non poter essere ignorata con un fatto di proporzione: “questo in funzione di questo, questa è una [resistenza] molto maggiore e quindi quella la trascuro”. No, non la posso più trascurare perché l'oggetto è grande, è grande e lungo qualche decina di micrometri, qualche centinaia di micrometri. Deve esserci una qualche proprietà che mi dice se una cosa è lunga o non è lunga e la vedremo dopo: viene fuori dall'equazione del cavo.

Modelli Distribuiti e Resistenza Assiale E così facendo io posso scrivere... al di là del fatto che qui dovrei scrivere in teoria un'equazione differenziale scrivendo $C \frac{dV}{dt} = \dots$, e poi quindi scriverei un'equazione differenziale probabilmente con due derivate, o una derivata seconda, quindi scriverei un sistema di equazioni differenziali. Non è più così banale come $C \frac{dV}{dt} = \dots$, non è più un'equazione di bilanciamento della carica semplice. Però per semplicità, in questo schema estremamente semplificato — e semplificato, ripeto, perché in realtà qui dovrei descriverlo con un cavo, non con un altro quello che si chiama compartimento — io semplicemente scrivo la conservazione della carica, cioè la **Legge di Kirchhoff** delle correnti, per questo nodo, assumendo che lo spazio extracellulare abbia una sua resistenza. Però non mi basta solo questo, deve esserci anche questo [la resistenza interna] per avere questa diversità fra soma e dendrite.

Per il prosiegua permettetemi di mettere per un attimo da parte questa seconda componente della teoria della conduzione di volume, perché dobbiamo sicuramente sviluppare prima un *insight*, un'intuizione, oppure delle considerazioni quantitative su questa dipendenza dallo spazio, dalla coordinata spaziale, dalla forma, dalla posizione nell'albero dendritico in 3D, di quelli che sono i fenomeni elettrici legati all'eccitabilità — in realtà in generale i fenomeni elettrici nel caso dei neuroni — e infatti approcciamo quello che si chiama **Teoria del Cavo**.

Sorprendentemente non è una cosa così antica, non è così antico l'utilizzo di questo formalismo, di questa similitudine dell'equazione del cavo in un ambito neuroscientifico. Ora, questo **Wilfrid Rall** [trascritto come Rohl], che è il padre di questo formalismo, ha lavorato a questa teoria durante gli anni '50 e '60 (credo che sia mancato pochissimi anni fa ed è un gigante, intuirete il perché), e le sue motivazioni per utilizzare la descrizione della teoria del cavo — in generale di descrivere matematicamente i neuriti, dendriti e assoni come oggetti che sono spazialmente lunghi — non era quello di capire l'origine dei potenziali extracellulari, capire perché hanno una gobbettà su, capire una gobbettà giù o in generale perché... questo non ci arriveremo, ma perché se l'EEG fa così oppure se fa così ha a che fare con l'attività di popolazione sincronizzata o non sincronizzata (quindi *slow wave high amplitude* o *high frequency low amplitude*, ma comunque non importa).

Le sue motivazioni erano che effettivamente la maggior parte delle correnti di input sinaptico non sono al SOMA. Biologicamente i neuroni non ricevono tutti gli input sinaptici al soma; ne ricevono una parte sicuramente, ma non una parte considerevole, a meno di eccezioni. Quindi in qualche modo la possibilità di capire come cambiano le correnti generate da una sinapsi che *impinge*, che insiste in un punto distale e in qualche modo evidentemente si propaga elettricamente fino al soma (io dove ho un elettrodo e vedo un potenziale eccitatore post-sinaptico, inibitore post-sinaptico), vale la pena di capire il come funziona.

E un'altra motivazione è che — questa è più simile, più realistica, più legata all'aspetto di generazione di potenziali extracellulari — è che comunque le correnti, ripeto, debbano essere... per poter essere un circuito, deve essere chiuso, quindi queste correnti devono comunque scorrere al di fuori della membrana di un neurone per poter chiudere il circuito. Quindi in qualche modo, nonostante sia estremamente conveniente, utile, in particolare prezioso in alcuni contesti (in cui lo vedrete chi farà l'indirizzo neuro in un corso con me l'anno venturo, i comportamenti di popolazione hanno un qualche tipo di descrizione molto semplice quando però si butta dalla finestra la complessità dello spazio), però nelle considerazioni attuali, e ve l'ho fatto vedere con semplicemente la generazione dello spike extracellulare, un *point neuron* non porta da nessuna parte.

Attenuazione e Propagazione nel Cavo Dendritico Intuitivamente questo Rall e colleghi avevano idea che se la sinapsi si potesse concepire come una sorgente di corrente (voi sapete che in realtà è un cambio di conduttanza, che cambiando la conduttanza lascia scorrere in accordo con un potenziale elettrochimico per la specie ionica alla quale il recettore post-sinaptico è permeabile, una corrente, ma non è che sia un generatore di corrente), ma immaginando anche che sia in modo semplice una sorgente di corrente: quindi la sinapsi si attiva in qualche modo e qui per magia scorre una corrente elettrica.

Potreste pensare che, sempre per questo motivo della chiusura del circuito, non è che questa membrana sia impermeabile: ci sono un sacco di canali ionici, magari la maggior parte sono passivi (cioè a dire non sono voltaggio-dipendenti oppure ligando-dipendenti).

E quindi se la corrente elettrica è molto intensa qui, man mano che si muove, che scorre lungo la sezione laterale di un cavo, di un dendrite, diventa sempre più piccola perché in punti distinti (qui l'ho drammatizzato e l'ho messo in punti discreti), per la conservazione della carica, per Kirchhoff, se un pochino di corrente scappa fuori, questa che resta deve essere quella originaria meno quella che è scappata fuori. Lo potete pensare come la conservazione della massa nel caso di un flusso di un torrente che ha degli effluenti, quindi che ha delle perdite, oppure un tubo che ha delle perdite. Se il tubo ha delle perdite è chiaro che a valle voi vedrete una quantità, un flusso — devo dire pressione o velocità, non lo so, devo pensarci — comunque una quantità che è ridotta perché parte della massa è stata persa prima.

Quindi qui intuitivamente se la corrente cambia vuol dire che questa struttura spazialmente si comporta in modo diverso. Nota: la corrente che scappa qui potrebbe essere una frazione della corrente che passa e se questa corrente qui è più piccola (la freccetta è più piccola rispetto alla freccetta qui che è bella più spessa), può essere che dal punto di vista elettrico, legge di Ohm attraverso questi canali, il potenziale possa avere una gradazione, possa non essere lo stesso in punti diversi, proprio perché la corrente non è la stessa in punti diversi.

Quindi armati di questo intuito, guardiamo le proprietà spaziali e iniziamo a ragionare del fatto che il mezzo intracellulare, il citoplasma, deve avere una qualche **resistenza assiale**. Quindi non soltanto una resistenza o conducibilità transmembrana, ma anche dentro l'asse della struttura neuritica c'è una certa resistenza o conduttanza (è la stessa cosa), ed è importante che, come detto nei primi modelli, la membrana non sia accorpata in un singolo punto, ma sia una quantità distribuita. Quindi non ho una capacità di membrana: ho una capacità di membrana qui, poi ho un resistore, poi ho un'altra capacità di membrana qui, un resistore, una capacità di membrana. Questa è l'equazione del cavo. La vediamo.

In particolare questo aveva senso soprattutto negli anni '60 e a maggior ragione oggi perché la forma dei dendriti non è così uniforme nel sistema nervoso. Ci sono dei dendriti come quelli delle **cellule del Purkinje**, la cellula inibitoria più importante del cervelletto, che hanno una complessità spaventosa, non soltanto perché è un groviglio di arborizzazione della stessa cellula, ma perché se voi vi poteste mettere nel piano della slide, vedreste che questa arborizzazione sta solo in un piano: è come una mano, la mia mano qui la vedete estesa, ma di taglio la vedete sottile; non è un cespuglio, che è un intricato lavoro di uncinetto che è solo bidimensionale, quindi è come se realmente io mi metto così, di taglio, e la vedo sottile. Altri tipi di neuroni hanno diverse morfologie, quindi in qualche modo mi aspetto che le proprietà spaziali di una cellula del Purkinje qui, qui e qui, siano molto diverse da questa cellula che probabilmente è una cellula stellata della corteccia che invece ha un albero dendritico molto diverso.

Quindi sia il fatto dell'impatto dell'attivazione dendritica remota, è importante per capire qual è l'impatto sul soma. Ripeto, potrebbe essere che in questo

grande casino una sinapsi che sta qui o sta qui o sta qui si comporta molto diversamente di una sinapsi che è invece prossimale, una sinapsi somatica, vicino al soma. E in particolare, che cosa fa un input sinaptico qui? Magari non fa sparare un neurone, magari intuitivamente essendo distante si attenua moltissimo... ma si attenua o non si attenua? Si attenua e cambia forma? Che speranze ho io di capire qualcosa del sistema nervoso se registro sempre dal soma e vedo degli eventi che magari hanno una forma diversa? È l'eco di un filtro: alla fine siamo ingegneri, quindi appena io inizio a parlare di cavo, appena inizio a parlare di condensatore, resistore, condensatore, forse nella mente di qualcuno dice: "Ok, boh, sarà un filtro, sarà un filtro passa-basso, magari distribuito". Però ogni volta che ho un condensatore con un resistore da qualche parte è un filtro, è un filtro passa-basso, magari allungato.

Quello che si vede è — quindi il risultato è — non solo i dendriti non sono isopotenziali, il potenziale elettrico si attenua dalla sinapsi al soma. In realtà è anche interessante che se c'è un potenziale d'azione nel soma questo si può **back-propagare**. Non sto parlando della propagazione attiva che avviene nell'assone e di cui non parliamo, ma del fatto che un potenziale nel soma può propagarsi verso i dendriti attenuandosi. Alla fine un cavo è una cosa bidirezionale: io posso parlare da un lato o posso parlare dall'altro lato, sembrerebbe che possa essere simmetrico. Gli elettrotecnici nella sala chiamerebbero questo principio di dualità? No, **reciprocità**, è una proprietà di reciprocità. Se io inietto in un punto e registro dall'altro dovrei, scambiando il generatore e l'osservatore, avere lo stesso fenomeno. In realtà non è perfettamente reciproco, lo vediamo perché.

Inoltre esiste una specie di tempo di propagazione affinché un potenziale post-sinaptico distale raggiunga il soma. Attenzione, lo chiamo tempo di propagazione, però non è un fenomeno propagativo come sono le onde elettromagnetiche o come la propagazione di un potenziale di azione lungo un assone. In quel caso, quando si dice propagazione, si ha in mente l'equazione delle onde, che non ve ne parlo, ma avete una forma d'onda, un segnale, che è sempre nel tempo, è sempre identico a se stesso; se registrato in un altro punto a un certo intervallo dopo, è ancora un altro punto, è sempre la stessa forma d'onda. Nel caso dell'assone è effettivamente una propagazione, perché esistono canali ionici, voltaggio-dipendenti, sodio e potassio, lungo tutta l'estensione del cavo assone. Questo ha come risultato il fatto che il potenziale continua a auto-rigenerarsi. Però non ne parliamo perché la parte più basica, più elementare, più da comprendere in un modo non necessariamente solo numerico, sono i dendriti passivi in cui non ci sono conduttanze attive, non ci sono conduttanze voltaggio-dipendenti. Però c'è tuttavia una specie di tempo di propagazione, quindi non soltanto l'attività si attenua, un potenziale sinaptico distale si attenua, ma impiega del tempo per interessare, per invadere il soma. E la forma di questo segnale, quindi dal sito dove è stato iniziato fino al soma, cambia e cambia con la distanza. Quindi in teoria se io lo vedo al soma potrei capire da quanto distante è avvenuto a seconda di quanto la sua forma è deformata. Tutte cose che sono di una potenza inaudita, interessantissima, se uno conosce il meccanismo con cui questo cambio di ampiezza, tempo e forma si generano.

Discretizzazione Spaziale e Parametri Specifici

Allora, questo è il primo impatto con l'equazione del cavo che di fatto rappresenta una discretizzazione spaziale di quelle che sono proprietà di un continuum. Lo chiamo continuum in questo caso perché sto pensando semplicemente alle caratteristiche capacitive. La membrana di questo cavo, di questo dendrite, oltre al soma se volete, è una collezione di un doppio strato fosfolipidico. Sì è vero i fosfolipidi sono delle molecole che sono discrete però posso pensare che siano talmente piccole e così numerose che fra due punti... in due punti presi a caso posso continuare ad avere quel paragone, quel parallelo con il condensatore a facce piane parallele. Tuttavia, cosa che per esempio non posso fare con le conduttanze transmembrana (perché lì vi ho già spoilerato, abbiamo già parlato abbondantemente di Neher, Sakmann, della scoperta del fenomeno discreto, lì è un fenomeno discreto, i canali non sono continui, sono qui, qui, qui, magari ce ne sono tantissimi), per farla breve, l'approccio che si fa — e si fa anche con il cavo — è quello prima di passare nel discreto, cioè a dire di pensare, come ho fatto poco fa per un compartimento dendritico e un compartimento somatico, dico che la membrana non è un unico condensatore con in parallelo un resistore (sì ci andrebbe il potenziale di reversal Nernstiano), ma è una combinazione di blocchi, di queste celle.

Scusate, qui la parte intracellulare è in basso, *inside*, citosol intracellulare. Infatti stavo dicendo: “ma perché non ci sono resistenze qua?”. Ok, vabbè, c'è la resistenza fuori, si pensa che il mezzo sia isopotenziale. Poi vedremo che non è così, altrimenti i potenziali extracellulari che vi ho fatto vedere prima, in un punto erano tot, in un altro punto erano un altro valore, un'altra forma d'onda. Però a questo livello quello che mi serve è enfatizzare il fatto che la resistenza intracellulare assiale è non nulla. E vedete che questo blocchetto si ripete.

Qui c'è voluto Lord Kelvin a stabilire qualcosa del genere per un conduttore elettrico, in cui il conduttore elettrico aveva... in realtà aveva un conduttore e aveva una *shield*, una schermatura, e quindi c'erano delle proprietà capacitive fra il conduttore e l'isolante. Come adesso se voi tagliate un pezzo di filo, vedete la maggior parte dei fili isolati hanno una calza metallica attorno, ground, rispetto a cui i segnali sono riferiti (per esempio sto pensando a un cavo USB; in realtà dentro al cavo USB ne avete 5, 6, dipende dal cavo USB, comunque avete più conduttori). Quindi fra il conduttore e la calza attorno avete un effetto capacitivo e anche potenzialmente un effetto conduttivo a una certa frequenza. E dentro avete una cavolata [resistenza trascurabile]. Qui è solo in biologia che avete una resistenza fra dentro e fuori, sennò avreste un cavo elettrico cortocircuitato. Kelvin aveva condensatore e resistore alternati così.

Proprietà Specifiche di Membrana e Assiali Questa struttura la definiremo con accuratezza, in particolare parliamo delle proprietà della capacità, della resistenza transmembrana e assiale, riferendoci alle caratteristiche **specifiche**, perché fa comodo, adesso vedrete in che senso. In generale, io per esempio vi ho detto che un valore che dovete ricordarvi, se no fallite l'esame, è che la **capacità specifica di membrana** (C_m) è $1 \mu F/cm^2$. Quindi mi interessa, perché io non voglio per il momento prendere impegno su quello che è la geometria, voglio avere delle grandezze che sono specifiche, il che vuol dire che sono indipendenti dalla scelta della geometria, per il momento. Fra poco, chiaramente le istanzio,

perché una volta che ho fatto la discretizzazione devo scendere: “ok, ma quanto è grande questa, quanto era lungo questo pezzettino e quanto è la superficie laterale?”. Quindi, il primo elemento è la capacità, un microfarad al centimetro quadro.

Questo è un altro valore, la **resistenza di membrana** (R_m), che io ve l’ho venduta sempre come conduttanza di membrana, ma è la stessa cosa. L’unica cosa da fare attenzione è che se la conduttanza come la capacità tendevano ad aumentare quanto più era grande la superficie (la superficie in questo caso è un cilindro, quindi quanto più è grande la superficie laterale di questo cilindro, tanti più pori ci sono, quindi tanto maggiore la conducibilità, la conduttanza), se io — e adesso vi renderete conto, semplicemente per comodità matematica è meglio ragionare in termini di resistività... perdono, resistenza specifica — vedete che questo non è diviso centimetro quadro, è **per centimetro quadro** ($\Omega \cdot cm^2$). Grazie: la conduttanza era... tendeva ad aumentare, era diviso centimetro quadro [Siemens/cm²]; visto che la resistenza è l’inverso della conduttanza, anche la resistenza specifica è l’inverso della conduttanza specifica. Qui millisiemens diventa kOhm e quello che era diviso centimetro quadro va al numeratore diventa per centimetro quadro. Questa è l’unica cosa che richiede attenzione.

Invece questo numero non ve l’ho mai raccontato, è la **resistenza assiale** (R_i o r_a) e ha come valore, di nuovo, $200 \Omega \cdot cm$ [Ohm per centimetro]. Nota, questa è una resistenza transmembrana, quanto più è grande la superficie, tanto più questa resistenza è piccola; mentre qui quanto più è lungo il cavo, tanto più la resistenza è grande. Questa non ha a che fare con le correnti che attraversano il cavo, ma quelle che scorrono nel citoplasma dentro. Per questo vedete che dipende linearmente... ha come unità di misura... quindi linearmente nella lunghezza, non nella superficie. Però sempre centimetro è l’unità di misura, ma qui centimetro quadro è perché la superficie è laterale, qui è la sezione, la lunghezza longitudinale [la resistività di volume].

Vi faccio tuttavia notare che il famoso RC continua perché le caratteristiche specifiche per unità di superficie si semplificano, ed è giusto che sia così. Se io faccio $C_m \cdot R_m$, centimetro quadro e centimetro quadro si cancellano e numericamente ottengo quella che è la costante di tempo di una membrana che vi ho detto essere attorno a 20 – 50 millisecondi per la maggior parte dei neuroni. Quindi questi numeri non sono campati per aria, sono misure sperimentali che in qualche modo vi do per fissare le idee.

Quello che facciamo è che la morfologia anche complessa di un neurone si può approssimare a una specie di combinazione di pezzi di cavo, pezzi di cavo che hanno una diversa lunghezza e un diverso diametro. Quindi questa parte qui per esempio è relativamente corta ma ha un grande diametro; dove ci sono delle biforcazioni, ok, elettricamente vorrà dire che il pezzo, il punto di inizio di un cavo — ci saranno delle condizioni al contorno, adesso vediamo che cosa sono — coincide per esempio in termini di corrente o in termini di potenziale con la fine del cavo precedente. Quindi una struttura morfologicamente anche complicata — ok questo non è particolarmente complicato — si traduce in una sequenza di cavi. Quindi alla fine questo è interessante perché qui è una roba bidimensionale. Invece nel caso del cavo e di una combinazione di cavi, ok, devo dire su quale ramificazione mi trovo, ma ho solamente una coordinata lineare, una, un unico

valore. Questo vuol dire che le equazioni che tiro fuori sono equazioni monodimensionali. Sì, è una brutta equazione alle derivate parziali, in realtà non è così brutta perché è la stessa equazione della diffusione e della propagazione del calore. Quindi forse qualcuno di voi l'ha già vista: particolarmente gli elettronici fanno nei semiconduttori l'equazione della diffusione dei portatori di carica e nella dissipazione di calore nei dispositivi elettronici fanno l'equazione del calore, della propagazione del calore. Quindi qui mi è comodo perché diventa il caso monodimensionale.

Quindi so quali sono le proprietà specifiche: capacità, resistenza transmembrana e resistenza assiale. Se uno mi dà: “prendi questo blocchetto con questa superficie, con questa lunghezza”, non è un problema. La capacità di quel pezzo la ottengo moltiplicando questa per la superficie. Qui ottengo la resistenza dividendo per la superficie e qui ottengo la resistenza dividendo per la lunghezza... quindi mi devi dare il diametro da cui mi ricavo la superficie laterale. Quindi supponiamo che uno mi dia il raggio, $2\pi r$ per la lunghezza L è la superficie esterna del cilindro e L è la lunghezza; quindi divido qui, divido qui, moltiplico lì. Posso passare in questo modo banalmente da grandezze specifiche a grandezze totali, capacità totale, resistenza totale, eccetera.

Prendo quindi un pezzettino, lo chiamo... per il momento non è infinitesimo, lo faccio diventare infinitesimo perché altrimenti uno non si diverte, non compaiono delle derivate, non ci sono limiti e rapporti incrementali. Perché lì andiamo a parare sempre; per qualche ragione, forse lo dicevo all'inizio di questo corso, la natura ha sempre... le leggi fisiche hanno una struttura per cui è più facile — perlomeno nel caso classico, non conosco la meccanica quantistica — la descrizione è attraverso leggi che dicono come cambiano nel tempo e nello spazio le cose. Vedete Newton, vedete l'elettromagnetismo, eccetera. Qui faccio la stessa cosa. Prendo un pezzettino che è lungo Δx , ha un diametro a (quindi io l'area la so calcolare, perdono, il raggio è a , sì), è $2\pi a \cdot \Delta x$, è la superficie laterale, perché è lì che è il pezzo di membrana con il doppio strato fosfolipidico; anziché essere fatto a sfera è fatto a cilindro. Dentro è cavo. Vedremo che cosa succede ai lati, i tappi, ci saranno dei tappi, ma per il momento è cavo, quindi le proprietà capacitive sono della superficie laterale. Potreste anche pensare che a è molto piccolo rispetto a Δx , quindi effettivamente l'*aspect ratio* — non so come si dice in italiano, il rapporto fra la lunghezza e l'altezza — favorisce la lunghezza; infatti i neuroni sono oggetti che sembrano lunghi, non sembrano cilindri tozzi e grassi. Un'altra cosa che mi serve è la sezione di passaggio, che è semplicemente πr^2 , πa^2 . E a un certo punto dico, visto che cambia con la posizione, non mi basta più chiamarlo potenziale di membrana al tempo t , lo devo chiamare al punto x e al tempo t , nel caso più generale possibile: $V(x, t)$. Perché? Perché è una funzione di x che potenzialmente cambia nello spazio.

Quindi qui mi... scusate ho detto una cavolata, per la parte di resistenza assiale non divido per L , per la lunghezza. Ha l'unità di misura ohm per centimetro perché se la resistenza è resistività per lunghezza diviso superficie o diviso area, ρ diventa ohm per... questo lo porta al numeratore, diventa, supponete, centimetri quadri diviso centimetri. Quindi continua a esserci sia una dipendenza dalla lunghezza e dalla superficie, dalla sezione di passaggio, ma dimensionalmente è per questo che dipende da ohm per centimetro (*Ohm · cm*), perché quindi non è solo quanto sei lungo ma quanto è ampia la sezione di passaggio

ovviamente. Quindi chiedo scusa, qui “ohm per centimetro” mi aveva fatto pensare che contasse solo la lunghezza, no conta anche... questa è la formula corretta. Sì, visto che questi qui hanno la stessa unità di misura, una al quadrato e l’altro no, mi è sparito il quadrato, quindi mi è sembrato che non ci fosse più una dipendenza dalla superficie, ma in realtà c’è. Infatti viene qui quando la resistenza assiale totale è data da esattamente quella formula lì, dove R_i era la resistività per la lunghezza diviso la sezione di passaggio. Mi ricordo questa cosa qua perché intuitivamente quanto più una cosa è lunga, tanto più resiste, mentre viceversa quanto più è larga, la resistenza è più bassa, perché aumento la possibilità della corrente di passare. Penso sempre a un’analogia idraulica, per esempio, o pneumatica. Per la capacità non c’è problema, moltiplico per la superficie e per la resistenza transmembrana divido per la superficie. Ok, qui è semplicemente ricordare come si calcola la superficie laterale di un cilindro e come si calcola l’area di un cerchio di raggio dato, πr^2 . Ok, qui sono i valori numerici.

Discretizzazione del Cavo e Legge di Kirchhoff

Quello che adesso devo fare è considerare che non ho soltanto un piccolo pezzettino, ma ho un pezzettino che precede e un pezzettino che segue. Lo so che a un certo punto ci sarà l’inizio e ci sarà la fine, però lasciatemi immaginare per semplicità di iniziare in mezzo. Se inizio in mezzo è più facile.

Quindi $V(x)$ descrive la tensione transmembrana di un piccolo pezzettino di cavo, ma poi ci sarà $V(x + \Delta x)$ a destra e ci sarà $V(x - \Delta x)$ a sinistra. Visto che le proprietà elettriche sono dipendenti dalla posizione, questo blocchetto qui sicuramente ha una corrente capacitiva e una corrente resistiva che passano all’interno di questo cilindretto. Però, visto che anche il blocchetto precedente e quello successivo hanno la stessa cosa, sarà presumibilmente un bilancio fra una corrente assiale che entra qui ed esce dall’altro lato. Non è così diverso dall’equazione dell’elettrodiffusione, se l’abbiamo fatta (in questo momento non mi ricordo se l’abbiamo fatta), in cui si immagina in quel caso la conservazione della carica.

Qui sono in un puro contesto elettrico, che vi faccio vedere nella prossima slide, e inizio a guardare quel circuito elettrico di poco fa: la parte intracellulare è in alto e qui c’è la parte extracellulare. Infatti qui ci sono... è isopotenziale fuori per il momento, per questo capitolo è fuori. E qui alla fine sto in effetti considerando una cosiddetta struttura, una rete elettrica a scala, a scaletta (**ladder network**, credo che si dica scaletta), in cui in teoria questo oggetto qui è infinito in questa direzione e infinito nell’altra direzione: questi blocchi si ripetono. Quindi in teoria potrei essere giustamente spaventato e dire: “Io non ho gli strumenti teorici per poter trattare un circuito che non ha fine, un circuito che ha parametri distribuiti ed è in qualche modo qui implicitamente un cavo infinito in tutte le due direzioni”.

Però vi faccio vedere che è possibile ragionare prendendo un pezzo in mezzo, il pezzo precedente e il pezzo successivo. Mi bastano questi tre. Mi bastano questi tre perché in qualche modo c’è una qualche simmetria, le cose si ripetono. Per questo pezzo che è precedente, ci sarà un pezzo ancora precedente che gli

fornisce una corrente assiale, che a sua volta per la Legge di Kirchhoff un po' va qui dentro e si dirama in un pezzo capacitivo e in un pezzo resistivo, e qui continua in un'altra componente assiale. Questa componente assiale passa attraverso un resistore che è la resistenza assiale del cavo e di nuovo poi si biforca in una corrente, si ridistribuisce in una corrente capacitiva, resistiva e un altro pezzo di quello che sopravvive.

Già qui potete immaginare che il discorso intuitivo che vi ho fatto — una corrente che scorre, poi sta funzionando — a un certo punto mi immagino che, visto che questo si ridistribuisce in questo più questo più questo, questo qui sarà più basso di quello. Quindi man mano che la coordinata spaziale aumenta, la corrente diventerà sempre più piccola. Solo per dirvi che la corrente sta cambiando: non posso usare la stessa corrente; la corrente qui che entra non è la stessa corrente che entrava qui (a parte che c'è un resistore, ma poi c'è questo ramo qui in cui parte della corrente è andata via).

Comunque, qui in teoria vi potete “tappare”, potete spegnere il cervello e dire: “Ok, mi sta dando da risolvere un circuito, quindi un esercizio di elettrotecnica”. Chiaramente lo faccio, lo sto enfatizzando, drammatizzando per cercare di semplificarlo, perché so che non tutti voi avete [studiato] elettrotecnica così o alcuni di voi non l'hanno nemmeno studiata.

Quindi, visto che sono in fase di chiamare con una coordinata spaziale le quantità, dico che questa — la definisco io — è la corrente assiale $I_a(x, t)$, perché in teoria può cambiare anche nel tempo. Questa la chiamo $x + \Delta x$, quindi è quella che esce. Questo lo chiamo $V(x, t)$, il potenziale transmembrana in quel punto; questo lo chiamo $V(x + \Delta x)$ e questo $V(x - \Delta x)$. Non mi serve altro. Non mi serve altro perché queste C , R_m ed E assumo che siano le stesse. Se fossero spazio-dipendenti, ok, dovrei tenerne conto. Magari sono dei numeri, quindi non sono delle grandezze dinamiche che cambiano nel tempo, però potrebbero cambiare nello spazio: potrebbe essere qualcosa che non è uniforme. Vuol dire “non è lo stesso in tutti i punti dello spazio”. Perché? Boh, perché semplicemente potrebbe essere che il cavo si assottiglia. Se si assottiglia il cavo cambia il raggio, cambia la capacità, cambia la resistenza, cambia anche la resistenza assiale. Però in questo caso stiamo pensando a un cavo uniforme, il caso più semplice.

Quello che faccio è scrivo per questo nodo la conservazione della carica, di nuovo Kirchhoff, la legge delle correnti (la somma algebrica, quindi prendete i segni come diamine volete, purché poi siate consistenti con le equazioni costitutive), e dato questo nodo o “guscio” — quindi questa superficie chiusa che non attraversa alcun componente elettrico ma attraversa solo dei fili — e per convenzione date un segno a quello che entra e a quello che esce. Io l'ho fatto mille volte, quindi intuitivamente vedo che qui entra questa cosa qua ed escono tre altri termini. Quindi sì, avrei dovuto mettere tutto al primo membro, I_a con il più e tutti gli altri col meno, però anche come conservazione della carica mi piace pensare che il bilancio sia che I_a entra ed è uguale a quello che esce: I_c , I_m e l'altra I_a . È solo fastidioso perché adesso dobbiamo scrivere x , $x - \Delta x$ (ok qui non c'è $x - \Delta x$), dobbiamo scrivere $x + \Delta x$ e tutte le quantità in teoria possono cambiare col tempo.

Mi segno da parte quello che è I_m . I_m lo so che cos'è perché quello è il solito, è

la storia della corrente col modello ohmico: $(V - E)/R$. $V(x)$, perché questo è $I_m(x)$, la corrente transmembrana. E la capacità transmembrana, non la scrivo ancora, ma la corrente transmembrana è $I_c = C \cdot dV(x)/dt$. Però la scrivo fra un attimo.

Qui mi sono scritto I_a e me la sono scritta come, per la legge di Ohm, la corrente che scorre in questo resistore data una particolare differenza di potenziale fra questo punto e questo punto, e nota la resistenza. La resistenza la conosco perché è la resistenza totale R_i , quella trans... scusate, quella assiale. E visto che ho preso la corrente così, che va da sinistra a destra, è ΔV diviso R . E questo ΔV è V qui, che è $V(x - \Delta x) - V(x)$. Ok, e questa “pizza” qua la scrivo. Vorrei in altri termini provare a scrivere una relazione che abbia solo V alla fine delle fini, quindi mi porto avanti, visto che so qual è l’equazione costitutiva di un resistore.

Solo che non è finita, perché ho anche questa $I_a(x + \Delta x)$, ed è esattamente la stessa cosa per l’equazione costitutiva, legge di Ohm. Se io prendo la freccia così, vuol dire che questa corrente è un ΔV diviso R : la R è la stessa, è sempre questa resistenza assiale, ed è la differenza fra il potenziale che sta qua meno il potenziale che sta qua. E lo leggo: qui è $V(x) - V(x + \Delta x)$.

Quindi potete anticipare che non me la passerò liscia con la storia dei rapporti incrementali, perché ho sia $V - \Delta x$ che $V + \Delta x$, e il rapporto incrementale voleva solo avere $(V(x + \Delta x) - V(x))/\Delta x$. Qui ho anche il mezzo, insomma è un pochino più complicato, e infatti non basta la derivata prima, alla fine sarà solo quello... ma lo facciamo passo per passo.

Nel frattempo è apparsa la corrente capacitiva, che speravo arrivasse dopo, questa qua: corrente capacitiva è quella che ho recitato prima, $I_c = C \cdot dV/dt$, con la dipendenza dalla posizione. E posso semplicemente riscrivere questa equazione sostituendo i termini. È brutto, ma non è difficile, è algebra, a questo punto è algebra, non ho fatto altro. Quindi posso vedere, posso notare che qui $C \cdot dV/dt$ compare, quindi compare già come una derivata totale. Quello che evidentemente non compare ancora come una derivata — e mi aspetto che debba apparire come una derivata — è la dipendenza dallo spazio, quello che chiamerei un gradiente spaziale. Questo è un cambiamento nel tempo, un cambiamento nello spazio. Io qui lo vedo il cambiamento nello spazio, però è discreto: qui è V , quindi il rapporto incrementale prima, poi c’è il rapporto incrementale dopo, e poi questa è di nuovo la corrente transmembrana.

Derivazione dell’Equazione del Cavo e Taylor

Magari vorrei massaggiare questa equazione, la riscrivo lì. Di nuovo, come tutte le altre derivazioni, provate a farle da soli. Ripeto, l’unica cosa per esempio da ricordare qua è il circuitino. Se vi ricordate il circuitino potete scrivere tutto il resto. Se provate a ricordare a memoria questa espressione qui è più complicato, secondo me non la riuscite a ricordare. Io non la ricordo, me la devo riderivare ogni volta.

La cosa che faccio, se me lo consentite, è cambiare le variabili perché mi scoccia che mi continui a portare dietro $V - E$. Se voi fate questo cambio di variabile, v piccolo uguale V grande meno E ($v = V - E$), scoprite che quando fate la

derivata nel tempo, la derivata nel tempo di v è uguale alla derivata nel tempo di V grande, meno la derivata di E . Però la derivata di E nel tempo è zero perché è costante, quindi qui fondamentalmente viene tale quale con la v piccola. Questo è per definizione v piccolo al numeratore, perché ho fatto questo cambio di variabile.

Qui e qui avete comunque la differenza di due quantità, ciascuna delle quali si porta al seguito un meno E , un offset. Quando avete la differenza — penso ai famosi amplificatori differenziali... no, non si chiamano differenziali, si chiamano? Si chiamano amplificatori differenziali? — in cui i termini comuni vengono cancellati. Alla fine è una cosa simile: ciascuno di questi, ciascuno di questi termini ha v piccolo meno E , poi c'è un meno, v piccolo, meno meno più E ; la E e la E si cancellano. Succede sia qui che qua. Quindi questa espressione diventa un pochino più semplice, semplicemente perché ho tolto questa parte qua ed è solamente una idiosincrasia mia, mi disturba parecchio avere quel $V - E$. Non voglio avere termini costanti, voglio avere termini che siano riferiti al potenziale di riposo. Però è semplicemente un cambio di variabili, è semplicemente un cambiare le etichette su degli assi.

L'altra cosa che ho fatto è portare questo termine qua al primo membro e vedete che compare... però non ho fatto altro. Vedete che compare $V(x-\Delta x)$, $V(x+\Delta x)$ e poi compariva con il segno meno qui, meno $V(x)$ e anche qua c'è meno $V(x)$ perché l'ho portato dall'altro lato, per questo c'è scritto $2 \cdot V(x)$. E questa cosa qua, nonostante sia un pochino strana, sembra esserci una specie di simmetria. La tensione a sinistra, la tensione a destra, meno due volte... sembra una specie di, esattamente, la descrizione discreta della derivata seconda.

Però adesso lo vediamo in modo più semplice, mentre a destra restano le cose invariate, a parte aver fatto il cambio di variabile, quindi v piccolo. Qui ho moltiplicato ambo i membri per R_m , cioè a dire ho portato questa cosa qua, ho fatto il comune denominatore, ma mi è più semplice dire che ho moltiplicato ambo i membri per R_m . Vedete che qui è diventato R_m , qui è $R_m C$ e qui si è semplificato. L'ho voluto fare perché a occhio le cose devono tornare dal punto di vista dimensionale. Qui non c'è niente, è millivolt per questo $v(x, t)$. Questo $R_m C \cdot dV/dt$, è un millivolt rispetto a un tempo, per tempo, per millisecondi, ma RC è un tempo, quindi tempo e tempo si semplifica. Ancora questo è millivolt — sì è un delta, è una differenza, ok va bene però è sempre millivolt — e in questo al primo membro ho resistenza e resistenza che si cancellano, dimensionalmente almeno, e di nuovo ho millivolt. Quindi posso dire: “ok, almeno dal punto di vista dimensionale non ci sono grossi problemi, non ho fatto, non dovrei aver fatto degli errori”.

E quindi invoco Taylor. Taylor e Taylor per una funzione che posso espandere, che penso di stare in vicinanza di un punto x specifico; la posso calcolare sia in $x - \Delta x$, sia in $x + \Delta x$. Adesso vi dico perché. In entrambi i casi Taylor mi dice che il valore della funzione lo possa approssimare con un polinomio. In questo caso lo arresto all'ordine 2. Vedrete perché non vado oltre (perché non sono masochista) ma perché non mi sono fermato all'ordine 1. Vuol dire avere il valore della funzione quando questo delta è 0, quindi è $v(x)$, meno l'incremento Δx per la derivata prima (scusate, è meno perché è meno e il delta è negativo, per questo c'è il meno), derivata prima. Poi c'è $1/n!$ per la derivata n -esima; visto che n è uguale a 2, 2 fattoriale è 2, 2 per 1 è 2, resta un mezzo l'incremento

al quadrato. Quindi anche se era meno, non me ne frega niente, è diventato Δx al quadrato, più Δx al quadrato, e ovviamente devo scrivere la derivata n , n uguale a 2, derivata seconda.

Faccio la stessa identica cosa in un altro punto, quindi calcolo... approssimando la funzione calcolata $v(x + \Delta x)$ nell'intorno di x : di nuovo la funzione che ha a quel punto lì, l'incremento per la derivata prima, un mezzo l'incremento al quadrato per la derivata seconda.

Se le scrivo così, mi viene, diciamo, sono tentato di sommarle. Potrei anche dividerle, ma in questo caso conviene sommarle. Se le sommo, questo termine di derivata prima va via, sparisce, e in questo caso di $v(x, t)$ diventa 2, cioè un 2 per $v(x, t)$, che è esattamente quello che avevamo poco fa. Quindi al primo membro ho $v(x - \Delta x) + v(x + \Delta x)$... circa uguale perché è un'approssimazione, non sto considerando i termini infinitesimi di ordine superiore, mi fermo al secondo ordine e me ne sto lì... due volte $v(x)$ più Δx quadro (perché c'era un mezzo e un mezzo) derivata seconda di $v(x)$.

Qui sto leggendo che posso scrivere la derivata seconda con questo strano comportamento discreto. Se il metodo di Eulero numerico mi diceva "hai un'equazione differenziale del prim'ordine? Hai delle derivate prime? Scrivi la derivata prima come il rapporto incrementale", questo è di fatto la stessa cosa però dicendo "per caso hai la derivata seconda da scrivere?". Se tu vuoi farlo ovviamente Δx deve essere molto piccolo perché se no l'approssimazione che fai di Taylor è sballata, non puoi allontanarti così tanto. Ma visto che Δx fra breve diventerà praticamente infinitesimo, diventa un'uguaglianza, non diventa più un'approssimazione. E la posso fare se ho il valore della funzione a sinistra, il valore della funzione ulteriormente a destra, meno due volte la funzione nel punto in mezzo, perché me lo dice questa formula qua.

Quindi nell'equazione dove ho questa "pizza" $v(x)$ a sinistra, $v(x)$ al centro e $v(x)$ a destra, con il meno e con il 2, è esattamente la quantità che ho prima. Quindi io posso prendere, se volete, questo $2v$ lo porto a sinistra e qui mi resta derivata seconda di v . Quindi ho questa parentesi qui, la scrivo come una derivata seconda. È vero, mi devo portare dietro Δx al quadrato.

E sono in imbarazzo perché io ho sempre detto: "No, aspetta, Δx tende a zero", e quindi qui non ho più il limite perché ho scritto di botto quella che è l'espressione della derivata seconda, con questa discretizzazione. È per questo che vi ho voluto all'inizio scrivere R_m , R_i e C come in termini delle grandezze specifiche, perché lì ho ancora il raggio, ho ancora la lunghezza che era proprio Δx di questo cilindretto infinitesimo, e ho ancora... *that's it*, non ho altro. Quindi ho la superficie, la lunghezza, tutte le quantità che adesso mi vado ad astrarre, perché questa equazione qua vale per il pezzettino di lunghezza Δx .

E ok, mi resta questo Δx al quadrato. Benissimo. Ma io vorrei avere una cosa che non è solo per quel pezzettino, dove cioè io possa far variare V con x da meno 200 micrometri a più 300 micrometri, supponendo che lo zero sia a metà. Vedete che esce fuori fra un attimo, ricordandomi che R_m grande è r_m piccolo diviso $2\pi a \cdot \Delta x$, aha, ho Δx qui; R_i è r_i per Δx diviso πa^2 , ho un altro Δx qui. Mi sa che questi Δx però si semplificano... no, perché non li sto moltiplicando. Se li moltiplicassi sì, perché qui per R_m il Δx è al denominatore e qui per R_i è al denominatore [numeratore?], ma non li sto moltiplicando, quindi

continuo a rimanere. E si cancella. E R_m e C , che quindi entrambi hanno la stessa... dipendono dalla superficie laterale in un modo uno all'inverso dell'altro, quindi moltiplicando R_m per C , l'abbiamo fatto prima, veniva a 20 millisecondi (non veniva a 20 millisecondi al centimetro quadro o moltiplicato al centimetro quadro), ma lo vedete da qui: in questo caso il numeratore, in questo caso il denominatore per il numeratore si cancellano.

Quindi riesco a scrivere un'espressione che non ha più Δx , che è notevole, è potente, perché l'unica cosa complicata è stato capire questa cosa della derivata seconda, ma era solo Taylor, non era una cosa complessa di numeri complessi, integrazione di linea, tripli integrali... no, era una roba di capire qual è l'espressione discreta della derivata seconda e riconoscerla. Questa equazione qua, che è derivata seconda, devo utilizzare il simbolo delle derivate parziali perché queste non sono derivate totali essendo una funzione di due variabili. Questa è una cosa corretta matematicamente, ok, è importante, è importante, non la voglio banalizzare, ma alla fine avete visto da dove è uscita fuori. Io ovviamente facendo questa operazione stavo tenendo t fissato, perché t non volevo che cambiasse, volevo che fosse esattamente lo stesso t in tutti i termini di queste due equazioni che ho sommato, una all'altra, in modo tale da poter scrivere quella derivata seconda totale rispetto a... scusate... questa derivata seconda rispetto a x , anche lì avrei dovuto scrivere derivata parziale. Vabbè, qui lo scrivo e mi riconcilio con i matematici fra di voi. Quest'equazione qua è la stessa equazione della propagazione del calore, in cui ovviamente non è v , sarebbe T , la temperatura nel tempo e nello spazio dipende sia dal gradiente spaziale che dal gradiente temporale.

Vi faccio vedere prima di ulteriormente massaggiare... no, devo fare la pausa, perdonatemi. Quindi ci fermiamo e vediamo cosa succede quando non è solo il cavo ma c'è pure un input sinaptico, un input esterno. Ci fermiamo per 10 minuti.

La Costante di Spazio Lambda (λ)

Bene. Bene. Allora, prima di proseguire, vorrei controllare dal punto di vista dimensionale le cose per essere del tutto tranquillo. Quindi l'abbiamo fatto prima, ma lo faccio adesso di nuovo, perché magari qualche cosa di interessante potrebbe uscire fuori.

Questa quantità al secondo membro è millivolt, è un potenziale $v(x, t)$. Questa quantità è una derivata parziale della funzione $v(x, t)$ rispetto al tempo ed è moltiplicata per r_m per c_m . L'abbiamo già fatto prima, quello al di là del fatto che siano grandezze specifiche, dato che hanno la dipendenza dallo spazio una al numeratore e l'altra al denominatore, indipendentemente dalla scelta dello spazio, della geometria, hanno come unità di misura quella di un tempo. Fra l'altro è RC , a orecchio è sempre la solita cosa, è un tempo. Alla fine è una costante di tempo (τ_m), è la costante di tempo che io riconosco quando non ci sono questi fenomeni spazialmente distribuiti. È la stessa equazione solita. Ricordati che v è V grande meno E , quindi se io quello fosse zero e io portassi questo all'altro lato, avrei la solita equazione del primo ordine, coefficienti costanti, eccetera. Quindi comunque tempo e RC per il Δt si semplificano, quindi anche questo è millivolt.

Questa cosa qua è un po' più interessante perché al numeratore continua a essere millivolt. Non fatevi ingannare dal fatto che qui è la derivata seconda. L'avete qui la scrittura della derivata seconda. Quindi questo è sempre millivolt. Al denominatore c'è una lunghezza al quadrato. Questa quantità qua, che se volete proviamo a guardarla, è r_m su r_i (r_m/r_i). Quindi r_m era ohm per centimetro quadro ($\Omega \cdot cm^2$), r_i era ohm per centimetro ($\Omega \cdot cm$), che era quello che mi aveva tratto in inganno, avevo inizialmente dato un'interpretazione fisica diversa.

Quindi r_m su r_i — scusate, sono piccole, r_m su r_i , sono quantità specifiche — diventa... r_m su r_i dovrebbe diventare centimetro, perché ohm e ohm si semplificano e resta centimetro al numeratore. E quindi non sarebbe sufficiente, ma fortunatamente è premoltiplicato, è moltiplicato per il raggio a , quindi a per r_m su r_i diventa... è una lunghezza al quadrato e quindi torna, si semplifica in qualche modo con il denominatore di questa derivata parziale seconda.

Quindi questa quantità qui è il quadrato di una lunghezza. Se a voi non spiace, a me farebbe piacere chiamarla λ^2 (lambda quadro). Per analogia con quello che r_m per c_m , r piccolo c , la vorrei chiamare τ , costante di tempo. Anticipo che, quindi non per ispezione diretta come stiamo facendo, non per identificazione delle grandezze sulla base solo della dimensione fisica (non potrebbe essere possibile, o io dovrei essere un genio matematico che guardo un'equazione e capisco le cose), ma questa cosa qua, al di là del fatto del quadrato... quindi se mi consentite di togliere il quadrato e prendere la radice quadrata... Quindi questa quantità qui — scusate c'è anche un 2 diviso 2 [nel raggio], il 2 però non ha dimensioni, per questo me lo ero dimenticato prima — quindi la radice del raggio diviso 2 e del rapporto fra la resistività (o la resistenza specifica) transmembrana e la resistenza specifica assiale si chiama **Costante di Spazio** (λ).

Forse è quella che mi dice se un cavo è corto o lungo, dipende dai parametri, allo stesso modo con cui questa τ mi dice se un tempo è corto o lungo. Corto o lungo nel senso che nelle lezioni pregresse, quando avevo delle quantità, per esempio, legate al potenziale di membrana — quindi in un caso con un *point neuron*, un neurone puntuale non esteso nello spazio — se avevo qualche fenomeno per mio sommo gaudio a un certo punto magari il potenziale di membrana avrebbe finalmente dissipato, si sarebbe rilassato al potenziale per esempio di riposo esponenzialmente. Qui, se io vi devo dire è passato tanto o poco tempo, lo faccio sulla base di quello che è la costante di tempo. Se dico che è passato 10τ vuol dire che qui il transitorio è stato esaurito.

Quindi mi piace poter normalizzare la scala dei tempi e la scala dello spazio con una specie di quantità τ di membrana e costante di spazio, che mi dicono qual è l'ordine di grandezza. Potrebbe avere in altri termini un cavo di pochissimi micrometri di lunghezza, ma per via dei parametri, del loro rapporto o del raggio, se il raggio fosse molto molto piccolo, la costante di spazio potrebbe essere addirittura molto molto molto piccola, quindi anche una lunghezza di qualche micrometro potrebbe essere elettrotonicamente lunga, giustificando l'esistenza dell'equazione del cavo. Voi potreste dirmi: “Ma i pochi micrometri... tant'è, dipende da quella lambda, se è piccolo o è lungo, se è corto o è lungo”.

Correnti Esterne e Sinaptiche nel Cavo

La cosa che voglio fare adesso è aggiungere... perché qui adesso dal punto di vista, visto che l'obiettivo è quello di capire cosa succede in punti diversi quando c'è per esempio un input sinaptico distale, io qui non ho semplicemente il comportamento endogeno, autonomo, non ho input esterni. Quindi quello che voglio fare è fare un passo indietro, tornare in questo punto, a questo punto della derivazione e dire: guarda che qui a questo nodo sto mettendo nel bilancio delle correnti — quindi parto esattamente dallo stesso bilancio delle correnti, da Kirchhoff a quel nodo — e vorrei poter io (poi magari lo metto a zero quando non c'è) io vorrei poter iniettare una corrente esterna, una pipetta. Voglio mettere io una pipetta in un punto centrale, magari di un cavo che è infinito, oppure un cavo che è semi-infinito (quindi ha un inizio e non ha una fine), io voglio mettere la pipetta lì, in un punto, e voglio iniettare una corrente totale, I_{ext} grande.

Oppure, questo lo faccio in modo generico qui, in modo tale da dire: “Ok, se non ci sono sinapsi, vabbè, se non ci sono sinapsi tu metti a zero la conduttanza sinaptica”. Quindi qui metto un ulteriore ramo che mi descrive le correnti sinaptiche dovute a dei recettori sinaptici di una qualche sinapsi chimica, AMPA, NMDA mediata o GABA-A, GABA-B, quello che volete. Quindi questo nodo qua si arricchisce: non è solo I_a entrante uguale I_c , I_m , I_a uscente; c'è pure I_{syn} , sinaptica, e c'è pure un'altra quantità, I_{ext} . Nota, queste qui erano tutte uscenti, questa è l'unica che è entrante, come pure questa, quindi avrà un segno meno.

Quindi, ok, I sinaptica la scrivo come la devo scrivere; I esterna anticipando il fatto che a un certo punto, come ho detto prima, ci sono dei Δx impazziti che voglio semplificare. Quindi permettetemi di dire che se la corrente totale che mi esce dal mio amplificatore, dal mio generatore di corrente, è I_{ext} grande, scrivo, definisco — e lo posso sempre fare perché sto cambiando il simbolo, quindi i_{ext} [piccolo], che di fatto è una densità di corrente — come I_{ext} riferito alla superficie laterale $2\pi r \cdot \Delta x$. Lo scrivo così perché a un certo punto questo Δx si semplifica, quindi me lo posso portare dietro. Lo posso anche non fare, ma se non lo faccio poi ho dei termini che avanzano. In questo modo lo identifico, identifico la quantità in un singolo botto.

La somma delle correnti entranti $I_a(x, t)$ più la corrente esterna $I_{ext}(x, t)$ grande è uguale alla somma di tutte le correnti uscenti: I_c , I_m , questa benedetta corrente sinaptica nuova, e l'altro termine $I_a(x + \Delta x)$. Basta, ho finito, devo rifare lo stesso giochino. Nota, l'unica cosa di diverso rispetto a prima è che qui al secondo membro ho questa corrente sinaptica (e vabbè questa è l'espressione). E poi ho questa corrente esterna che porto a destra, al secondo membro dell'equazione e avrà un segno meno. Che è interessante perché io pensavo che a un certo punto tu inietti una corrente, la inietti positiva... ok, per come è scritta questa equazione, quando va nel membro di destra deve avere un segno meno. Quindi questo era quello di prima, posso già a botta dire che qui avrò un termine più il termine sinaptico meno il termine esterno. Ce l'ho vero? Eccolo qua.

Quindi vedete che qui anziché usare la v piccola sono tornato indietro perché per via del termine sinaptico... e qui il suo sinaptico qui è sbagliato, perché questo E deve essere E_{syn} (E-sinaptico). Non è detto che sia... pardon, questo è un

mio errore, quindi questa E qui in questa equazione è E_{syn} . Era giusto qui, era giusto qui, ma ovviamente è sbagliato qua. In generale, se trovate poi, visto che magari molti di voi avranno sicuramente uno studio ancora più approfondito durante le prossime settimane, se beccate un qualche errore nelle slide, parlate, anzi, vi sono grato.

Quindi e... sì però qui allora ok allora l'errore è su questa slide qui... no qui è ancora V grande tutto è perché qui v piccolo ancora non c'è e non lo voglio fare, però volevo farvi vedere come veniva l'equazione senza quell'offset. Perché il fatto di avere un'equazione di derivate parziali, derivata seconda nel tempo... uguale derivata prima nel tempo... scusate, derivata seconda nello spazio uguale derivata prima nel tempo più qualcosa, questa è l'equazione del cavo. Qui per il momento non c'è V è grande e questo è il suo potenziale di inversione che potrebbe essere zero nel caso dell'AMPA e dell'NMDA. Quindi qui non ho ancora fatto quell'operazione dell'offset, perché questi possono essere diversi. Il problema è, questo era normalizzando v piccolo uguale V grande meno E , questo ve l'ho detto prima e l'ho scritto, magari lo enfatizzo ancora un po'.

Quindi questo era quello di prima, però qui questo è un altro, quindi non discende da questa, discende da un'espressione in cui v piccolo non c'è mai stato e purtroppo questo è E sinaptico. Ci penso però ci medito ma dovrebbe essere scritto come E_{syn} . E qui c'è meno i piccolo perché I grande moltiplicato... scusate diviso questo $2\pi a \cdot \Delta x$, che è quello che mi resta dopo aver identificato il termine della derivata seconda, mi porta a dire: "Aspetta, non scrivere I_{ext} diviso, scrivi i_{ext} piccolo, che è una densità di corrente", e sei di nuovo in gioco con un'equazione che in teoria a mano non la risolveremo mai (adesso ci proviamo, forse la prossima volta, in alcuni casi specifici), ma numericamente sì.

Condizioni al Contorno per il Cavo

E vi faccio vedere un notebook su Google Colab in cui vi mostro come utilizzare un simulatore neuronale che si chiama, con grande fantasia, **NEURON**. Ed è un simulatore che c'è dagli anni Ottanta e ha superato diverse generazioni di linguaggi obsoleti e adesso ha un'interfaccia Python ed è abbastanza facile da usare. Basta scrivere `pip install neuron` e voi avete il simulatore installato. Ci sono altre cose, però lo vedete con il Google Colab.

Voglio sottolineare, primo, che c'è questa identificazione della costante di tempo e della costante di spazio. Per il momento non ha senso del perché una si chiama costante di spazio. È analoga alla costante di tempo, quindi qui c'è qualcosa di esponenziale nel tempo, evidentemente ci sarà qualcosa di esponenziale nello spazio, chiaramente in qualche condizione semplificata, in qualche regime semplificato. E, di nuovo, qui mi permette di dire se un cavo è lungo o corto.

Ora, le equazioni differenziali delle derivate parziali, come questa — queste sono derivate parziali, e V , l'incognita, è una funzione sia del punto che del tempo — non sono proprio facilissime, anche dal punto di vista numerico, per questo uso NEURON, un simulatore ad hoc. Non posso usare il metodo di Eulero. Sarei tentato di dire: "Sai cos'è? Questo lo sai scrivere con il termine di rapporto incrementale, con l'incremento nel tempo (quindi nella seconda variabile t); questa quantità, la derivata seconda rispetto allo spazio, ce l'hai la formula discreta, era semplicemente un passaggio prima, quindi in teoria la puoi usare".

Ma la scelta di Δx e Δt è *tricky*, è complicata e ci sono altri metodi numerici molto più accurati perché il sistema rischia di diventare instabile. Instabile vuol dire che non è più accurato, la soluzione che tirate fuori no... quello che tirate fuori dall'iterazione algebrica di questa che è diventata un'equazione algebrica non ha nulla a che fare con la soluzione vera.

Quindi lo fate numericamente, ma ogni volta che avete un'equazione differenziale ordinaria — questo chi di voi ha delle reminiscenze matematiche sa che il **problema di Cauchy**, dato un'equazione differenziale del tipo alle derivate totali, per esempio del primo ordine, sapete che esiste la soluzione ed è unica, il teorema di esistenza e unicità — quando avete la specificata la condizione iniziale, iniziale nel tempo. Qui c'è pure la derivata seconda nello spazio, quindi dovete specificare altre condizioni iniziali. Condizioni iniziali nello spazio si chiamano **condizioni al contorno**, contorno perché si pensa che siano alla frontiera, ma sono condizioni iniziali in X , però si chiamano *boundary conditions*. Dovete specificarne due, perché qui il grado di derivazione della derivata spaziale è l'ordine del secondo, e una condizione iniziale nel tempo, perché qui il grado di derivazione di questo termine derivativo temporale è 1. Senza questo non avete una soluzione, avete una famiglia di soluzioni.

Ed è un po' *tricky*, adesso vediamo alcuni tipi di condizioni iniziali, di *boundary condition* e condizioni iniziali.

Estremità Sigillata (Sealed End) La prima condizione al contorno che vediamo è quella in cui, che viene chiamata **estremità sigillata**, *sealed end*. Nel gergo di un ingegnere elettronico, questo è un **circuito aperto**. Vuol dire che qui la corrente è nulla, non ho una membrana, semplicemente la corrente non ha terminazione. Se la corrente non ha terminazione io dovrei andare... per in quel circuito di cui vi ho fatto vedere solamente un pezzettino e il circuito si estendeva all'infinito, avevate un pezzo a sinistra, un pezzo al centro, un pezzo a sinistra... lo devo istanziare al pezzo finale e il pezzo finale avrà una $I_a(x, t)$ con x uguale a L , per esempio la lunghezza di L . Con questa dizione sto dicendo che $I_a(x, t)$ è una quantità generica e io sto dicendo come varia in quel punto a questa frontiera, a questo valore di X , L , la lunghezza del cavo, l'estremità.

Potrebbe essere un cavo che dall'altro lato è infinito, ma in questo punto è finito, finisce, alla coordinata L (qui X_0 potrebbe essere dove volete, non importa). E il fatto che qui la corrente... non ci sia alcuna chiusura del circuito, se è un circuito aperto, per la legge di Kirchhoff — di nuovo per l'uccellino che sta sul filo dell'elettricità e ha un'unica zampetta sul filo dell'alta tensione, sommatore delle correnti uguale a zero — qui l'unica corrente che c'è è questa corrente laterale: I_a in quel punto uguale a zero. Questa è la condizione al contorno per l'estremità *sealed*.

Quindi se faccio le cose corrette dovrei andare a guardare l'espressione di I_a in quel punto e istanziarla per x uguale a L . Se quella corrente è zero vuol dire che... scusate, se a quel valore la corrente è zero vuol dire che la corrente... questo non ha senso dire la corrente a zero, ok, devo pensare perché questo non è la condizione al contorno... questa è la stessa cosa qui, invece qui sto scrivendo che la corrente in uscita è la derivata prima del potenziale in quel punto. Scusate, devo rivedere l'equivalente circuitale. Non è un circuito aperto, è un'estremità

sigillata in cui qui c'è una membrana e questa membrana è tale per cui non c'è più niente a valle e il termine di corrente per questa definizione è la derivata — facendo tendere Δx a 0 — è la derivata totale del primo ordine calcolata in x uguale a L .

La prossima volta devo pensarci e ve lo dico in modo intuitivo, che qui non è I uguale a 0 per definizione. Questo è un tipo di condizione al contorno. Credo che chi di voi abbia reminiscenze di matematica forse chiama questa una **condizione al contorno di Von Neumann** anziché di **Dirichlet**. Vagamente ho questa reminiscenza: quando la condizione al contorno ha un termine di derivata, si inserisce in una classe generica di condizioni al contorno, di equazioni che i matematici hanno risolto e studiato da millenni, in cui questo si chiama Von Neumann.

Scusate, questo devo rivederlo perché non ve l'ho detto bene. No, ho fatto un gran casino, pardon, pardon. È la corrente uguale a zero! Questa è la corrente uguale a zero, quindi il gergo ingegneristico è corretto, il gergo ingegneristico è corretto: qui la corrente è zero perché è un'estremità vuota, il circuito non è chiuso. Quindi mi sono incartato qui perché fondamentalmente ho scritto quello che è la corrente in quel punto; per metterla a zero, la corrente in quel punto l'ho voluta scrivere secondo la definizione. E la definizione mi ricalca però con un segno meno... quindi questa è la definizione (a parte R_i che l'ho scritto in funzione di r_i piccolo, per questo c'è questo Δx che è apparso, a quadro pi greco, $\Delta x, r_i$). E questo non è $V(x + \Delta x) - V(x)$, ma è $V(x) - V(x + \Delta x)$, quindi questo è meno il rapporto incrementale.

Quindi da questa che è la definizione ho sostituito R_i con la quantità specifica perché sto considerando un compartimento infinitesimo e facendo questo mi accorgo che una volta che il Δx mi appare questo è il rapporto incrementale a parte il segno meno. Quindi lo posso scrivere come una quantità che è la derivata di V , la derivata totale di V rispetto allo spazio, a parte questo termine moltiplicativo e il meno che è importante. Ma visto che la condizione al contorno mi dice che qui la corrente è zero, qual è la corrente? Questa, cioè questa. Vuol dire che la derivata della soluzione è zero. Di nuovo è una condizione di Von Neumann. Chiedo scusa per il casino.

Quindi, qui sto dicendo che è una condizione... è un po' diverso rispetto a una condizione iniziale nel tempo. La condizione iniziale nel tempo mi dice che al tempo t la funzione è uguale a 0, oppure uguale a meno 60 millivolt. Questa potrebbe essere una condizione iniziale nel tempo: lungo tutti gli x al tempo zero, tutto il cavo è allo *steady state*, è a riposo. $V(x)$ per qualunque x , t_0 al tempo zero è uguale a un numero. Qui invece non dico qual è V a quel punto, dico qual è la derivata di V a quel punto e dico che per esempio quella derivata in quel punto è zero. Chiedo bene.

Estremità Cortocircuitata (Killed End) C'è un'altra condizione che si chiama **killed or open end**, in cui il gergo elettrotecnico vorrebbe dire che c'è un **cortocircuito**, quindi qui è come se la tensione fosse esattamente la tensione del *bulk*, del bagno extracellulare. E in questo caso — questo lo dico a botta perché so — quindi questa è una **condizione di Dirichlet** perché è una condizione al contorno del tipo “in quel punto hai quel valore” e quel valore è

zero perché il potenziale extracellulare è zero. Quindi V in quel punto L per qualunque t è uguale a zero.

Un'altra condizione (non le dovremo usare in larga misura e numericamente sono in parte implementate gratis, anche se gli esempi che vi farò vedere sono di cavi semi-infiniti, quindi in qualche modo è più facile rispetto a questo contesto). Un altro esempio, chi ha un background di linee di trasmissione riconosce molte delle stesse condizioni. Anticamente anche i cavi di rete Ethernet dovevano avere una terminazione da 50 ohm per funzionare, oppure se uno le lasciava aperte o le cortocircuitava aveva altri tipi di comportamento, aveva in particolare fenomeni di onde riflesse. Qui è un pochino diverso, ma il contesto è simile, nel senso che il caso di condizione al contorno terminata vuol dire che qui c'è un *patch* di membrana con particolari leggi di Ohm, con particolari condizioni. In questo caso è semplicemente un carico resistivo, quindi nel gergo elettrotecnico qui vuol dire che ho attaccato un carico, e quindi per la legge di Ohm $V = R \cdot I$ alla frontiera a $x = L$, $I = V/R_0$. E per lo stesso discorso di prima questa corrente alla frontiera la posso scrivere come un meno rapporto incrementale, a parte il segno, e questa quantità, quella che era stata messa a zero nella prima condizione al contorno che abbiamo visto, è messa esattamente al valore di L . Di nuovo, questa è un'ulteriore condizione al contorno un po' complicata.

Generatori Ideali di Tensione e Corrente Ci sono altre due condizioni al contorno, semplici. La prima è che esista una estremità in cui c'è — vedete, Hodgkin e Huxley che trattavano di cavi, infatti sono stati loro alla fine a formalizzare questi discorsi sulla base dell'equazione del cavo di Lord Kelvin — il potenziale all'estremità è **clampato** con un qualche amplificatore elettronico che impone una certa tensione, quale che sia la corrente. Questo vuol dire che la tensione a quell'estremità è data, è nota, è quella che ho chiamato come una funzione del comando. Ho un comando sull'amplificatore che dice “adesso metti a meno 30 millivolt” e lui lo tiene, oppure “adesso farlo cambiare in modo sinusoidale nel tempo 30 volte al secondo” e lui mi impone quel potenziale. È un generatore ideale di tensione applicato qui ed è per questo che l'ho scritto così.

Il caso duale è che io qui abbia una pipetta che si comporti come un **generatore ideale di corrente**: quale che sia il potenziale a quell'estremità io inietto una corrente. Questo in particolare è più interessante. Di nuovo, come prima avevamo scritto, quindi qui la corrente non è zero, la corrente è data, nota, fissata, un valore assegnato. E visto che $I_a(x, t)$ all'estremità io la posso scrivere come quel rapporto, meno quel rapporto incrementale, e quel rapporto incrementale lo traduco in dx/dt , dV/dx [scusate], posso scrivere che quella derivata in quel punto a x uguale a L e il valore (a parte r_i per a quadro su pi greco, che premoltiplicavano questa derivata) è uguale alla corrente che voi iniettate. Questo ha senso perché fra un attimo iniettiamo... prendiamo un cavo che è semi-infinito e iniettiamo da un'estremità una corrente costante. Quindi per farlo dovremo utilizzare questa formula.

Soluzione allo Steady State del Cavo Infinito

È l'unico caso, o un paio di casi, che vediamo perché una equazione delle derivate parziali, come detto, è un pochino complicata da maneggiare, in particolare è

complicata da maneggiare nel caso del regime transitorio. Quindi nel transitorio è complicato (non impossibile, come è complicato scrivere la soluzione dell'equazione della diffusione nel regime transitorio).

La prima cosa che proviamo a fare è guardare i regimi allo **steady state**. Steady state vuol dire che le grandezze non cambiano più nel tempo e se non cambiano più nel tempo quell'equazione differenziale alle derivate parziali diventa un'equazione alle derivate totali. Sì, c'è un termine derivato al secondo ordine, magari non vi ricordate come si risolve un'equazione differenziale lineare però del secondo ordine (ora lo rivediamo), ma diventa possibile, diventa facile scrivere la soluzione. E scrivere la soluzione è molto istruttivo perché, per esempio, fa uscire fuori la storia della **costante di spazio**.

Quindi quello che facciamo è considerare un cavo che è **semi-infinito**. Non metto alcune sinapsi per il momento, sto semplicemente dicendo che è un cavo *nature*, senza nulla. Quindi questa è l'equazione del cavo, con la v piccola, in modo tale che mi liquido anche il problema del $V-E$. Non ci sono sinapsi, l'unica cosa che c'è sono io con un generatore di corrente che inietto a un'estremità una corrente nota, che chiamo I_0 , una corrente costante. Quindi implicitamente sto applicando una condizione al contorno e per il resto semplicemente mi chiedo: per caso, questa equazione che sembra complicata si semplifica se io cancello la derivata rispetto al tempo? Ovviamente lo posso fare quando la soluzione perde la sua dipendenza nel tempo, cioè non cambia più nel tempo, cioè è costante, quindi la derivata nel tempo rispetto al tempo è zero.

Quindi questo sto imponendo. Quindi io devo pensare che superati i transitori, se ce ne sono, se io continuo a tenere qui la corrente sempre costante e accesa a I_0 (supponete 200 pA), quindi io sto continuando a 200 pA qui, a un certo punto avrò una qualche distribuzione del potenziale di membrana. E intuitivamente potete pensare che per la legge di Ohm, forse qui, visto che questa è una struttura passiva e vi ricordate la storia che quando iniettate una corrente qui, parte si perde, una parte continua, una parte si perde... alla fine non resta niente, quindi è concepibile che il potenziale tende a diventare sempre più piccolo. Magari cambia con un esponenziale, dato che gli esponenziali sono onnipresenti, però bisogna vedere, qui io non lo vedo ancora che esce fuori un esponenziale.

Adesso forse sì, nel senso che questo termine l'ho messo a zero, le derivate sono diventate da parziali a totali e questa, rispetto a tutte le equazioni differenziali del secondo ordine a coefficienti costanti che vi possono capitare, è una delle più semplici. Voi ricordate vagamente che ogni volta che avevate un'equazione di ordine n , avevate un cosiddetto **polinomio caratteristico**. I famosi autovalori della matrice (non l'avete visto in modo matriciale), avete un polinomio che prende... che non è differenziale, è un polinomio algebrico, che ha un'incognita che per esempio chiamate s (come l'ho chiamata? s), prende i coefficienti quelli che sono e i termini all'esponente, i termini che sono nell'ordine di derivata. Quindi qui sarebbe $\lambda^2 \cdot s^2$. Se ci fosse una derivata prima rispetto a x , avreste s con un qualche coefficiente; se qui ci fosse scritto più 1 $dV(x)/dx$, avreste un'equazione caratteristica che non solo ha $\lambda^2 \cdot s^2$, avrebbe più 1 per s . E qui, al destra dell'uguale, avete il termine che ha una derivata zeresima, che per convenzione vuol dire (si chiama derivata zeresima ma è la funzione stessa) che nel caso dell'algebrico è s^0 , quindi l'ordine di derivazione esteso in questo caso, qui è 0, viene mappata in questo caso algebrico. Dovreste averla fatta in analisi

perché è una delle cose fondamentali, ma qui è molto facile perché di botto io posso scrivere questa equazione. È un'equazione del secondo ordine, ok, ma non devo scrivere la solita storia meno b più o meno radice di $2b$ meno $4ac$... no, qui lo vedo “fra virgolette” a occhio che le soluzioni di questa equazione algebrica sono $1/\lambda$ e $-1/\lambda$. Non sono un genio, ho diviso ambo i membri per λ^2 , lo posso fare perché è una quantità non zero (la quantità che non è 0) e mi resta $s^2 = 1/\lambda^2$. Applico la radice quadrata da ambo i membri, faccio attenzione al fatto che ogni volta che faccio la radice quadrata devo in teoria prendere più o meno. Se non siete convinti potete provare a sostituire qui: anche 1 diviso... anche scusate, anche $-1/\lambda$ funziona e soddisfa quell'equazione.

E una volta che avete questi autovalori, sono i modi, vengono chiamati i **modi** dell'equazione, sono di fatto gli esponenti che vanno a degli esponenziali. Quindi la soluzione di questa equazione è, a parte delle costanti da identificare, è:

$$V(x) = k_1 e^{x/\lambda} + k_2 e^{-x/\lambda}$$

Una delle due ha il segno meno e mi rende felice, l'altra ha il segno più e mi preoccupa un po' perché questa cosa qua vuol dire che, ok, qui non ho il tempo, ma vuol dire che nello spazio ho qualcosa che esplode, ho il potenziale che esplode. Però calma, perché devo ancora identificare le costanti, cioè devo utilizzare le condizioni al contorno, condizioni iniziali o... scusate qui solo condizioni al contorno perché il tempo non c'è più. E qui il ragionamento è il seguente, potrebbe non piacervi ma è un'ipotesi di consistenza fisica in cui dico che quando x è molto grande il potenziale non può esplodere. Qui potreste essere scontenti perché dite: “Grazie, te lo fai venire, sei tu che imponi che non esploda, però esploderebbe”. Sì, però io cerco fra tutte queste soluzioni quelle che rimangono finite perché biologicamente non avrebbe senso, fisicamente non ha senso se io qui inietto una corrente e questo cavo ha delle resistenze, una resistenza transmembrana per unità di superficie e per unità di lunghezza, e quindi a un certo punto le quantità devono dissiparsi, non c'è nulla che accumula.

Quindi se quando x è molto grande, V deve rimanere finita, l'unica possibilità è che k_1 sia 0, perché se k_1 non è 0 questo non avviene. Intanto mi sono identificato una delle due costanti. k_2 la utilizzo con questa condizione al contorno: questa condizione al contorno dice “fai quello che vuoi, devi prendere la soluzione, la devi derivare e questo è uguale a meno I_0 , I_0 dato”. Quindi io ricordandomi che cos'è λ , la derivata rispetto a x è meno k_2 diviso λ per e alla meno x su λ ... scritto così, calcolato in x uguale a 0, quindi e alla 0 fa 1 non c'è più, uguale a I_0 . k_2 lo scrivo in questo modo, perché ho scritto λ come radice quadrata del raggio diviso 2 per r_m diviso r_i , e per farla breve, qualunque cosa schifosa o antipatica possa essere scritta lì, alla fine questa è la **Legge di Ohm**, però per un cavo. Nel senso che V continua a essere uguale a R per I , I è la corrente che sto iniettando io.

L'unico problema è che a un certo punto se io prendo x uguale a 0, se io mi metto a questo punto del cavo e lo guardo, mi ci stampo l'occhio, x uguale a 0, $V(0)$ è uguale a questa quantità, che è una resistenza, la chiamo R_∞ , per I_0 (perché e alla 0 fa 1). Quindi in qualche modo continua a valere la legge di Ohm, in quel punto guardando come in un binocolo il valore del potenziale in quel punto. Chiaramente la resistenza ha una caratteristica strana che non è quella familiare, dipende dalle caratteristiche fisiche, biofisiche del cavo. Tuttavia, quando non

sono miope e voglio solo guardare V di zero (però sperimentalmente lo posso fare, io posso, con una pipetta, posso iniettare una corrente e leggere il potenziale di membrana in quel punto).

Quando invece cerco il caso generico e dico: “Ok, dimmi cosa succede a 10 micrometri di distanza da dove è iniettato la corrente, 100 micrometri, 1000 micrometri, dimmi qual è il valore di V ”, lo leggo qua: è e alla meno x diviso λ . È esattamente simile al comportamento che nel tempo voi avete con le costanti di tempo, è alla meno t su τ , qui è alla meno x su λ . Per questo l’ho chiamata **Costante di Spazio**.

Vi faccio vedere la soluzione e poi finiamo, a parte questa resistenza di ingresso. Ok, qui al cavo vedo un resistore equivalente, non è così importante. Alla fine quello che vedo al variare di x ... notate qui ho scritto, anziché scrivere x , ho scritto x normalizzato alla costante di spazio, così che lo posso usare per qualunque valore di λ . Vuol dire 1, vuol dire che sono a un λ , un po’ come quello che fanno gli smanettoni ingegneri che dicono il tempo in questo caso... qui vuol dire se sono in questo punto, vuol dire che è passato τ , misuro il tempo in unità di τ , così posso dire una τ , due τ , qui è la stessa cosa. E lo faccio per poter fare questo grafico che valga sempre quale che sia λ .

Quindi V , quindi banalmente sta diminuendo. Qui ho normalizzato l’ampiezza a 1, quindi ho scritto... ho diviso per il valore di R_∞ e I_0 (che chiamo R_∞ perché è la resistenza apparente di un cavo lungo) e la funzione è un’esponenziale decrescente nello spazio. È una... diciamo, è molto interessante perché se ci pensate ho un comportamento dissipativo semplice con un esponenziale decrescente del primo ordine, una cosa semplice, che mi dice se tu inietti, stai in qualche modo pompando energia in un punto ed è un regime DC, un regime costante, *steady state*, tu stai continuando a pompare, man mano l’eco di questo input si sente ma a un certo punto non si sente più. Di nuovo, e se questo non fossi io con un elettrodo e fosse una sinapsi, se il soma fosse particolarmente distante, se io mi attivo o non mi attivo, il potenziale di membrana a quella distanza sarebbe trascurabile.

Ovviamente i cavi non sono infiniti. Qui era per dire che se prendete i valori indicati per R_i (qui C non conta più, nella costante di spazio conta solo R_m ed R_i), con quei valori che vi ho dato in una delle prime slide mancava la a , il raggio (qui scusate ho scritto d , il diametro, ok quello che è 2 micrometri di raggio), la costante di spazio diventa 500 micrometri. Questo setta... dice se un cavo è lungo o corto con quel diametro. Se il diametro fosse molto piccolo questa quantità sarebbe molto diversa, questa quantità diventerebbe più piccola perché è al numeratore.

Per finire vi voglio solo far vedere quello che avviene e lo vediamo la prossima volta in un **cavo corto**. Un cavo corto non funziona allo stesso modo. Qui l’ho “strecciato” in modo tale da paragonare con la stessa distanza fra 0 e 2, quello che in realtà è un grafico più complicato. Qui dipende dalla lunghezza, visto che è un cavo finito, dipende dalla lunghezza del cavo quanto rapidamente V diminuisce. Se il cavo è molto lungo, cioè per esempio è due volte λ , allora il comportamento è simile, non troppo dissimile dal caso infinito. Però se il cavo è solamente mezza λ , praticamente è come se non... sì c’è un po’ di attenuazione, ma come se non contasse tanto. Ergo la costante di spazio mi dice se nel

caso di un cavo finito la lunghezza è corta (il che vuol dire posso fregarmene dell'equazione del cavo, tutto è isopotenziale, quasi), oppure se no, altro che il cavo è molto molto lungo. Per esempio se è due volte λ può essere lungo e se è lungo ha una drammatica attenuazione nella sua lunghezza, attenuazione che va dal 100% fino al 20%, quindi il cavo lo dovete tenere, non potete buttarlo.

Introduzione: L'analisi dell'Equazione del Cavo

L'idea di fondo è quella di approcciare il problema di capire quale origine abbiano i segnali extracellulari. E l'unico modo per farlo, come vi ho cercato di dire in modo intuitivo la volta scorsa, è avere la distribuzione nello spazio, oltre che nel tempo, del potenziale transmembrana. In effetti, si ha “gratis” anche la corrente transmembrana, la quale però cambia di punto in punto a seconda della morfologia del neurone, a seconda della distribuzione dei canali di membrana nella morfologia del neurone e a seconda dello stato del neurone.

Per caratterizzare questo, che è un ingrediente fondamentale che ci dice come funziona la caratterizzazione dei segnali dal punto di vista extracellulare, dobbiamo affrontare questo apparente “mostro”: l'equazione del cavo. Questa equazione del cavo è un'equazione alle derivate parziali, differenziale alle derivate parziali, e ha due caratteristiche fondamentali, due parametri che dipendono dalla geometria e dai parametri della biofisica: una è la costante di spazio e una è la costante di tempo.

In questo caso, che ho riscritto alla lavagna, sto considerando anche nel punto generico — quindi in effetti qui dovrei scrivere x e t — il contributo ulteriore di una corrente sinaptica e di una corrente esterna, per esempio iniettata da uno sperimentatore, come abbiamo fatto la volta scorsa e come rifacciamo in questo caso oggi. Va da sé che se non c'è alcuna sinapsi in quel punto, questo valore qui è zero e quindi questo termine qui non c'è. Se non c'è nessuno con una pipetta, o con un elettrodo, o con una qualche opsina attivata dalla luce, o con qualche altro “marchingegno” che inietta in quello stesso punto una corrente esterna, questo termine non c'è in quel punto.

Questa è un'equazione differenziale alle derivate parziali ed è un osso duro dal punto di vista analitico, e quindi il primo modo con cui abbiamo iniziato ad approcciarla per cercare di estrarre qualche informazione utile è quella di studiarne lo *steady state* (stato stazionario). Quando si studia lo *steady state*, significa che si cercano le soluzioni in cui la dipendenza dal tempo non c'è più; quindi, anziché essere la soluzione una funzione dello spazio, del punto nel cavo e del tempo, di fatto questo diventa solamente una funzione del punto perché nel tempo è costante. Se così è, la derivata rispetto al tempo è zero e quella si trasforma in un'equazione differenziale ordinaria. Ok, è del secondo ordine, tuttavia è sempre lineare; dovrebbe essere una cosa che avete visto e vi dovrete “bere facilmente” sulla base delle vostre reminiscenze matematiche.

Quello che abbiamo fatto la volta scorsa è considerare la soluzione nel caso infinito. Uno di voi mi ha fondamentalmente detto alla fine della lezione scorsa: visto che il grado di derivazione nello spazio è due e qui nel tempo è uno, ecco che servono due condizioni iniziali nello spazio — che si chiamano condizioni al contorno — e una condizione iniziale. Io vi ho fatto una lista di tutte le possibili condizioni al contorno che possono verificarsi; non è che sono due sempre. In

questo caso, nel caso che abbiamo visto la volta scorsa, il cavo era infinito, quindi in quel caso era quel problema, quella geometria, che mi generava una particolare condizione al contorno.

Nel caso che facciamo oggi, in cui il cavo non è semi-infinito ma è finito da entrambe le parti, penso che ci sia una condizione, assumo che vista la geometria ci sia una qualche condizione al contorno qui all'estremità dove, per esempio, qui la corrente è nulla, perché c'è un'interruzione del cavo. Quindi tutta la casistica delle condizioni al contorno è un catalogo da cui scegliere di volta in volta, come d'altronde la condizione iniziale è quella che è; non è che esiste *una* condizione iniziale. La condizione iniziale è in qualche modo, anche se non consideriamo per il momento la soluzione tempo-variante, potrebbe essere quella che a un certo istante t_0 per tutti i valori di x questo sia una qualche funzione del punto. Per esempio, potrebbe essere -65 mV per ogni x , quindi potrebbe essere che il cavo è a regime e a riposo lungo tutta la sua geometria e non sarebbe una condizione irrealistica, sarebbe un caso frequente.

Quello su cui volevo dirvi è che ci sono un paio di modi per cercare di esaminare queste equazioni in modo semplice. La prima è togliere la derivata del tempo, la derivata rispetto al tempo, quindi studiare lo *steady state*. Un altro è quello — e lo vedremo dopo — di approssciare il cosiddetto regime sinusoidale permanente, in cui per mezzo di operazioni di trasformata nel dominio delle frequenze (quella che vi piace di più, Laplace o Fourier; lo faremo con Fourier fra una mezz'oretta), di fatto di nuovo la derivata nel tempo sparisce. Sparisce perché nel dominio trasformato le derivate temporali diventano operazioni algebriche, diventano moltiplicazioni per — in particolare in Fourier — $j\omega$, quindi anche lì in quel regime io mi riconduco al caso in cui so risolvere.

Vi farò vedere l'equazione del transitorio in cui non faccio alcuna, diciamo, non c'è alcuna semplificazione, non c'è alcuna ipotesi e la soluzione cambia sia nello spazio che nel tempo, ma ve la do “dall'alto”, non la deriviamo.

La prima cosa che facciamo rispetto alla volta scorsa, di cui vi rammento il risultato era questo, è che nel caso di un cavo semi-infinito — quindi qui a un'estremità c'è una fine e ha come condizione iniziale me che con una pipetta, con un generatore di corrente ideale, gli sto iniettando una corrente data — come era da un certo punto di vista banale attendersi, se io guardo questo cavo semi-infinito, che quindi si estende all'infinito di qua, in questo punto qui io vedo un resistore. Non dovrebbe sorprendere quelli di voi che hanno una reminiscenza sulle cosiddette linee di trasmissione, o elettromagnetismo, o i cavi coassiali: alla fine, quando uno misura l'impedenza in un punto misura 50Ω . Qui a $x = 0$ io misuro, se inietto I , misuro $V = R_\infty \cdot I$, una particolare R_∞ che è un'espressione che dipende dai parametri.

La cosa ovviamente interessante è cosa succede quando considero non V in questo punto, quindi alla porta di accesso, ma lungo tutta la geometria del cavo. Abbiamo visto che questa espressione semplice di un esponenziale decrescente, dove la scala di questo *decaying*, di questo decadimento esponenziale, è nello spazio; non è nel tempo come siamo stati abituati a guardare finora con la soluzione della solita equazione differenziale, eccetera. Qui è un decadimento esponenziale dettato dalla costante di spazio, λ , e di fatto sta dicendo che pur normalizzando per esempio al 100% quello che è V per $x = 0$, dici-

amo decresce molto rapidamente. Di nuovo, è sulla scala di λ , quindi dipende quanto è λ rispetto alla lunghezza dire se rapidamente nello spazio oppure no, ma di fatto indica che una struttura morfologicamente estesa come un dendrite attenua. Ed era alla fine scontato che fosse così, proprio come un sistema dissipativo multicompartimentale distribuito, fatto da elementi dissipativi. Non ci sono transistori, non ci sono generatori di corrente, qui è una roba che è una combinazione di resistori e condensatori.

Nel caso *steady state* i condensatori è come se non ci sono più, anzi non ci sono più, e l'effetto che permane è quello di un comportamento di tanti resistori in serie e in parallelo; quello che intendo è che sono transmembrana e assiali.

Cosa succede quando il cavo non è infinito, semi-infinito, ma è corto, ha una lunghezza L , quindi a un certo punto qui finisce con la sua condizione al contorno? Il grafico cambia notevolmente rispetto a questo. Questo grafico è “strecciato” graficamente perché l’ho preso da un altro libro ma volevo metterlo esattamente nel... visto che l’asse delle x è rappresentato con una variabile normalizzata a λ , in modo tale che possa valere per qualunque scelta di λ , l’ho voluto “strecchiare” in modo tale da poterlo paragonare. E quello che vedete per il cavo semi-infinito è questa curva contraddistinta da $L = \infty$, e vedete quanto è diverso rispetto a L mezza costante di spazio, una costante di spazio, una costante di spazio e mezzo, eccetera.

Quando il cavo è lungo già due costanti di spazio, vuol dire abbastanza lungo. Lungo, corto, e sulla base del... ve ne accorgete se a paragone con il caso infinito. Se è infinito vuol dire che è lunghissimo; lunghissimo vuol dire nel caso di un cavo finito che la sua lunghezza è grande rispetto alla costante di spazio. Quindi se c’è qualcosa o nella geometria, nel diametro — non mi ricordo male, qui dentro c’è il diametro, varia con la radice quadrata perché quello è λ^2 , però λ^2 è proporzionale al diametro, perdono, al raggio è inversamente proporzionale, direttamente proporzionale, ha delle resistività assiale e transmembrana — ma per esempio al raggio, la geometria... quindi se un pezzettino del dendrite di un neurone diventa particolarmente sottile, cambia la sua costante di spazio e un pezzo potrebbe diventare corto o lungo. Corto o lungo, nel senso che se è corto praticamente è come se non ci sia alcun effetto particolare, drammatico di attenuazione; $0,5\lambda$ c’è comunque, ma è molto diverso che a parità di distanza al caso infinito, al caso di 2λ . Se viceversa λ è molto piccolo, quel... potrebbe diventare lungo quel... quindi il valore della costante di spazio mi determina se un pezzo di dendrite è lungo o corto.

Perché ha questa forma? Come si fa a trovare la soluzione? È particolarmente difficile? No. È leggermente fastidioso e noioso perché per evitare di fare calcoli intricati — calcoli intricati vuol dire noiosi dal punto di vista algebrico, non complicati sostanzialmente — c’è una scelta che ora vi dà fastidio.

Allora, la scelta è la seguente: questa è la soluzione, sono quindi nello stesso caso in cui non ho questo termine, qui sto usando il cambiamento di nome della variabile, quindi sto usando v piccolo che non è... diciamo è offset, è riferito a E , il potenziale di riposo. Questa parte non c’è ed è la soluzione di un’equazione differenziale del secondo ordine a coefficienti costanti, le cui soluzioni sono, a parte il termine di costante da identificare, sono le due soluzioni del polinomio caratteristico di quell’equazione, cioè che si ottiene da quella, da paragonare

quell'equazione differenziale a un'equazione algebrica.

Comunque parto da qui, solo che anziché scrivere K_1 e K_2 li scrivo in un modo diverso. Ripeto: così facendo non avete modo di capire il perché di questo se non a un certo punto di dire “vabbè, ok, è equivalente”, è solo per semplificare i calcoli. Lo scrivo così, quindi K_1 e K_2 sono due termini, adesso, completamente arbitrari, sono due gradi di libertà. Io posso sempre definire altri due valori, due numeri, \hat{A} e \hat{B} — sono altri — e definisco K_1 la semisomma e K_2 la semidifferenza.

Voi potreste dire: “Vabbè, fai se devi fare, ma non capisco il perché. Non potevi restare in questo mondo?” Sì. Spero che voi siate d'accordo che se io invece resto in questo, diciamo, vengo in questa descrizione completamente equivalente e arbitraria... perché posso sempre trovare, se voi mi dite “guarda che poi però K_1 e K_2 hanno questi valori”, bene, io posso scrivere $K_1 = K_1$, posso scrivere un sistema di due equazioni algebriche in due incognite, il sistema lineare ha sicuramente soluzione, quindi posso trovare \hat{A} e \hat{B} che mi rendono esattamente queste due cose identiche.

Lo faccio perché nel caso finito escono fuori nella soluzione non soltanto esponenziali decrescenti, ma la loro somma e differenza. Perché io per esempio non li ho così tanto visti nei corsi che ho fatto di analisi 1, 2 eccetera... vengono fuori le funzioni seno e coseno iperbolico, che sembrano incutere particolare timore, ma vi faccio vedere perché si chiamano seno e coseno iperbolico.

Espressione della soluzione con funzioni trigonometriche iperboliche

Quindi, se io scrivo questa cosa in questo modo, come \hat{A} più... di nuovo in modo del tutto arbitrario, posso notare che \hat{A} compare qui, compare qui, \hat{B} compare sia nel primo che nel secondo termine e quindi li posso fattorizzare. Perché mi piace vedere che qui c'è $e^x + e^{-x}$ (al di là del λ) e qui è $e^x - e^{-x}$, e poi c'è un diviso 2.

L'avete mai vista queste differenze di questi esponenziali? Sono consueti perché i matematici definiscono, per pura convenzione — ma adesso capirete perché — il **seno iperbolico** come la funzione che è data da:

$$\sinh(x) = \frac{e^x - e^{-x}}{2}$$

Io ricordo sempre che il seno è un pochino più fastidioso del coseno, è più “cattivo”. Quando lo derivi no... quando lo derivi la derivata del seno è coseno, però il seno non so, mi sta antipatico; è una funzione dispari, non è pari, quindi per qualche motivo associo che ci sia il meno qui. L'esponenziale col più e l'esponenziale col meno ci sono sempre; il “diviso due” c'è perché altrimenti sarebbe troppo semplice da ricordare se fosse normale, e quindi c'è questo meno fastidioso. Quindi questa è la definizione del seno iperbolico.

Il **coseno iperbolico** è un po' più gentile. Di nuovo, il coseno è pari, è una funzione pari, e quindi l'unica differenza è che qui c'è il più anziché il meno:

$$\cosh(x) = \frac{e^x + e^{-x}}{2}$$

E si chiamano funzioni iperboliche, trigonometriche iperboliche, perché se voi provate a derivare, proprio come le funzioni trigonometriche, se fate la derivata del seno iperbolico, ottenete qualcosa che è parente del coseno iperbolico.

Non ci vuole uno scienziato perché se derivate, a parte un mezzo che è una costante, questo esponenziale resta se stesso e quest'altro gli viene il più. La derivata del coseno non è meno seno, come sarebbe nel caso delle funzioni trigonometriche; la derivata del coseno iperbolico è seno iperbolico. Però il fatto che sono una... non il duale dell'altra, ma sono una che si ottiene derivando l'altra in qualche modo, anche per motivi che non so, di natura analitica, di natura matematica, sono state chiamate seno e coseno iperbolico.

Sono chiaramente tabulate, quindi la gente nei decenni o nei 50 anni, 100 anni fa le trovava tabulate, quindi non aveva bisogno necessariamente di avere una risoluzione numerica che insistesse sugli esponenziali. Oggi non è particolarmente problematico, anche se voi sapete che un computer non è che calcola effettivamente l'esponenziale; lo fa attraverso uno sviluppo in serie, ha una certa precisione. E così via. In qualche modo, avere queste funzioni che evidentemente con questo tipo di soluzioni delle equazioni differenziali alle derivate parziali che sono onnipresenti in fisica, biofisica e matematica — di nuovo: l'equazione della trasmissione del calore, della diffusione, della propagazione delle onde con qualche cambiamento — evidentemente la gente ha detto: "Ok, sai cos'è? Mi stufo a scrivere e^x ed e^{-x} , lavoro direttamente con seno e coseno iperbolico".

Quindi a questo punto io non ho fatto assolutamente nulla, non sto neppure cercando di identificare le costanti, però mi sono reso conto che queste soluzioni possono essere pure scritte così:

$$V(x) = \hat{A} \cosh(x/\lambda) + \hat{B} \sinh(x/\lambda)$$

E così mi piace un po' di più. O forse no, a me andava benissimo qui, mi piaceva benissimo qui con gli esponenziali: uno mi faceva piacere, l'altro esplodeva, però potevo starci. Invece no. No, usiamo questa forma, di nuovo perché se non lo fate ottenete esattamente lo stesso risultato, ma è un pochino più laborioso e le espressioni crescono, diventano un po' più fastidiose, diventano alla fine sempre somme e sottrazioni di esponenziali.

Quindi detto questo dico: ok, questo è equivalente, di nuovo K_1 e K_2 arbitrari come \hat{A} e \hat{B} arbitrari.

Dato che, come nel caso semi-infinito, la condizione al contorno a sinistra è che sono io con la pipetta che gli sto iniettando una corrente e aveva questo tipo di forma, cioè la derivata di V calcolata in $x = 0$, la derivata — quindi dovrebbe essere il gradiente di V — la derivata nello spazio di V a $x = 0$ è data, è assegnata. Per esempio, una funzione che cambia arbitrariamente nel tempo oppure una funzione costante nel tempo, visto che sto studiando delle funzioni costanti. Quindi mi serve a un certo punto scrivere, saper scrivere la derivata. Però, al di là del fatto che uno vede che seno e coseno iperbolico sono semplici da derivare, qui è una funzione composta: dentro c'è x/λ all'esponente. Quindi è ovvio che quando faccio la derivata, per il teorema di derivazione delle funzioni composte, mi devo ricordare di mettere $1/\lambda$ sia qui a seno iperbolico di x/λ — premoltiplico $1/\lambda$ — e anche nell'altro termine, \hat{B}/λ per il coseno iperbolico di x/λ .

Questa è l'espressione della derivata di V rispetto a x . La posso volendo calcolare in $x = 0$. Per esempio, il seno iperbolico diventa 0, mentre il coseno iperbolico diventa 1. Ah, sembrano come anche il seno, le funzioni trigonometriche normali: il seno a 0 era 0 mentre il coseno a 0 era 1, quindi un ulteriore motivo di similitudine.

Partendo da questo, provo a vedere di identificare questi \hat{A} e \hat{B} con questa condizione al contorno. La seconda equazione del contorno è, come detto, che qui il tipo di *boundary* è *sealed* (sigillato), la corrente uscente è 0; il che vuol dire che la derivata di V rispetto a x per $x = L$ qui è 0. Visto che ho l'espressione della derivata, mi sembra di avere due condizioni, due costanti da identificare, dovrei essere a cavallo, non dovrei avere problemi.

La prima espressione mi lega — visto che una delle due sparisce per $x = 0$, questa derivata a $x = 0$, questa sparisce — mi permette di identificare \hat{B} . Adesso ve lo scrivo più grande, non è così importante, vorrei però invogliarvi a farlo una volta, a fare tutti questi conti una volta nella vita. Capireste che, ok, è noioso, dovete in questo caso ricordarvi di coseno e seno iperbolico, che potrebbero essere utili in futuro, ma in generale è solo tutto il punto... e questa equazione è come si risolve nel caso in cui si studi lo *steady state*.

Nell'altro caso, questa equazione al contorno, devo mettere $x = L$, ed è quello che è, nel senso che è parecchio brutto. Potete continuare a verificare che dal punto di vista dimensionale le cose tornino, perché qui ho L/λ . λ dimensionalmente ha le dimensioni di una lunghezza, oppure L ha le dimensioni di una lunghezza, quindi se sono micrometri, sono micrometri diviso micrometri o quello che è, quindi l'argomento è adimensionale come dovrebbe essere, però non mi viene da semplificarlo un granché. Vabbè, al massimo posso scrivere qui che \hat{A} è meno questo termine qui che porto a destra:

$$\hat{A} = -\hat{B} \frac{\sinh(L/\lambda)}{\cosh(L/\lambda)}$$

o termini simili. È un numero; al di là del fatto che sia brutto da guardare, è un numero perché L lo conosco, λ lo conosco, seno e coseno iperbolici me li fa la calcolatrice, o Python, o Giulia, Matlab, chi per lui.

Qui ho l'espressione di \hat{B} , che è dato dalla corrente che sto iniettando io. La sto lasciando indicata perché vorrei arrivare a un'espressione come quella precedente, precedente in cui avevo che $V(x)$ allo *steady state* era una $R_\infty \cdot I_0 \cdot e^{-x/\lambda}$. Qui ovviamente sarà più complicata, sarà in termini di questo seno e coseno. Infatti viene una "pizza" del genere e quando pure cambio \hat{B} con questa espressione non migliora particolarmente. Allora non migliora particolarmente, però tuttavia questa quantità qui, R_∞ diviso... [espressione algebrica] e al denominatore continua a moltiplicare seno iperbolico di L , è un numero. È un numero, quindi mi fa pensare che anche in questo caso questa quantità che c'è al denominatore per I ha le dimensioni di una resistenza e quindi, di nuovo dal punto di vista mio che sto iniettando una corrente qui, vedo un resistore. Vedo un grande resistore se inietto una corrente e voglio misurare la tensione in quel punto, che è la cosa che la maggior parte della gente fa.

Ovviamente c'è un termine che di nuovo, ripeto, è un numero, però è un numero che dipende da L , quindi quanto più lungo L questo denominatore cambia. E

la funzione, diciamo, la dipendenza funzionale è data da questo seno iperbolico, che alla fine è parente di quei due esponenziali. Se lo plottate, trovate questa espressione, questo è il grafico giusto, “strecciato”, però non più compresso come era prima.

Quindi di fatto se volete, se pensate che sia particolarmente fastidioso o difficile tutto questo discorso, prendete Python e provate a plottare, a usarlo per plottare una funzione, plottare una funzione con quei valori e vedreste che al variare dei valori — adesso vi faccio vedere un notebook che non fa questo, lo fa per il caso semi-infinito — vedreste come cambia la soluzione. Di nuovo, i dendriti non sono chiaramente strutture isopotenziali, cioè che hanno lo stesso potenziale di membrana lungo tutti i valori di x , e il potenziale, in questo caso, la distribuzione di potenziale è indotta da un’iniezione di corrente.

Ricordatevi che V in questa soluzione, come anche nell’altra, questo è v piccolo ed è ovviamente da considerarsi... se voi volete V grande, dovete semplicemente usare il cambio di variabili: v piccolo uguale V grande meno E , quindi V grande uguale v piccolo più E . Ma non ci vuole uno scienziato perché potete immaginare che, visto che v è riferito a 0, che era il punto di riposo che voi convenzionalmente avete chiamato 0, se lo avete riferito a -65 dovete qui aggiungere E , -65. Quindi il potenziale si attenua. E se per caso questa non fosse la mia iniezione di corrente, ma ci fosse un altro neurone che stabilisce una sinapsi, quindi un bottone sinaptico, nella periferia di un dendrite e il soma di questo neurone fosse per esempio qui... alla periferia, ovviamente l’effetto di quella sinapsi sarebbe estremamente attenuato.

Soluzione allo steady-state di un cavo infinito

Vediamo rapidamente un altro caso. Ho cambiato ieri le slide perché penso che quest’altro modo per spiegarvelo sia più abbordabile, sia più facile. La soluzione alla fine è questa, ed è l’unica cosa che dovete notare — e che mi sono scordato, I_0 qui, mannaggia me, ma che ci sia rispetto al caso semi-infinito — questo è un cavo infinito, il che vuol dire che è semi-infinito in tutte le direzioni: da qui ad andare a destra e da qui ad andare a sinistra.

Quindi se io, di nuovo, sono ossessionato da questa cosa per cui, per esempio, ho una pipetta, inietto una corrente e lì voglio vedere qual è il potenziale di membrana (perché sperimentalmente la gente fa così), posso pensare che rispetto al caso precedente che era semi-infinito sulla destra, qui se inietto una corrente, la corrente ha modo per distribuirsi verso il pezzo a sinistra e verso il pezzo a destra. Quindi mi è verosimile che la depolarizzazione a $x = 0$, proprio dove sto iniettando una corrente, sia la **metà** rispetto a prima. Questo R_∞ è esattamente lo stesso R_∞ del caso semi-infinito.

L’altra cosa di diverso — a parte me che qui non ho scordato di scrivere I_0 , altrimenti non avrebbe senso — vedete che qui c’è il valore assoluto, il che vuol dire che c’è una simmetria, questa è una funzione pari. Il modulo di x vuol dire che quando x è positivo qui è e^{-x} , quando x è negativo è $e^{-(-x)}$. Vuol dire fondamentalmente che avete, come l’intuito vi poteva dire, se nel caso semi-infinito a destra avevate una diminuzione procedendo dal punto di iniezione della

corrente verso la periferia infinita, anche dall'altro lato deve essere simmetrico e matematicamente lo posso esprimere con questo modulo:

$$V(x) = \frac{R_{\infty} I_0}{2} e^{-|x|/\lambda}$$

Vi dico generalmente come faccio ad avere, a ragionare in questo caso. La **prima condizione al contorno** o ipotesi che devo fare è che, come ho fatto nel caso semi-infinito, è che V rimanga finita comunque. Qui ho il problema che deve farlo da entrambe le parti (all'infinito positivo e negativo). La **seconda** è che la soluzione, se io la studio separatamente da qui a destra e da qui a sinistra, deve essere continua; non c'è ragione per cui ci sia una discontinuità di prima specie nel punto in cui io inietto una corrente. Avrò comunque un valore, magari la derivata può essere diversa, forse sì, forse no, ma non importa: lì inietto una corrente, avrò una caduta di potenziale, ma fisicamente non ho ragioni per pensare che ci sia una discontinuità.

La **terza ipotesi**, che è leggermente più fastidiosa e forse in questo modo è più semplice, è una condizione al contorno leggermente differente, perché sono io qui che gli sto iniettando una corrente. Se comunque sto studiando lo *steady state* e io ho una pipetta puntiforme, quando dico che sto iniettando una corrente in un punto, matematicamente lo potrei tradurre — anche se a voi sicuramente non piace — con non i piccolo ma con I grande. E adesso vediamo che cos'è i piccolo e che cos'è I grande: una corrente che potenzialmente potrebbe cambiare nel tempo ma non cambierà nel tempo, che è data da I_0 , una costante. Poi per dire che è esattamente in quel punto e non è altrove, gli metto una **Delta di Dirac** ($\delta(x)$). Il che vuol dire che in quel punto dove c'è la delta di Dirac, che vuol dire $x = 0$, a quel valore... è vero, infinito, avete ragione, però le cose funzionano perché rappresenta il fatto che la corrente è concentrata solamente in un punto.

E l'unica cosa che devo ragionare è se dimensionalmente, se questo è, supponete, pikoampere, devo fare attenzione se qui, in effetti, quando dico "1 per" (che è l'area della delta di Dirac), non sia per caso la delta di Dirac una quantità che ha come area qualcosa che ha... o pardon, l'ampiezza, non abbia le dimensioni di un inverso di una lunghezza.

Vi rammento rapidamente che una delle possibili definizioni della delta di Dirac è con un processo al limite di una funzione rettangolo. Quindi questo lo chiamo x , questo lo chiamo P grande, delta. Questa è una funzione di x che è 0 dappertutto, tranne che da $-\delta/2$ a $+\delta/2$. La sto inventando io, in realtà la sto ricordando io, ma me la ricordo perché è facile. E qui, questa è una definizione, cioè sono io che mi sto inventando questa cosa qua. Qui dico che l'ampiezza è $1/\delta$. Se provo a calcolare l'area, è l'area di un rettangolo: la base è δ , l'altezza è $1/\delta$, l'area è unitaria, adimensionale. Nota però: l'ampiezza non è adimensionale, è $1/\delta$ che è un inverso di una lunghezza. Questa cosa qua resta uguale (oggi ho i colori, proprio ci sballo con i colorini, ma non eviterò): se voi fate la base, cambiate il valore di delta, fate delta più piccolo, $1/\delta$ in modo inversamente proporzionale tende a crescere. Al limite di delta che tende a zero, si dimostra che questa funzione P rettangolo tende a diventare la Delta di Dirac; ha le stesse proprietà, ma comunque ha l'ampiezza $1/\delta$. Quando uso qui $\delta(x)$, è come se stessi usando questa funzione qui: l'ampiezza, mi devo ricordare, che è $1/\delta$, dimensionalmente non è adimensionale. Quindi lo vedrete fra qualche momento,

io qua dovrò scrivere Δx , oppure devo cambiare la mia interpretazione di I_0 come in qualche modo una densità lineare. Comunque.

Vediamo la soluzione. Questa è la soluzione nel caso generico con le costanti K_1 e K_2 da identificare. Questo è fondamentalmente l'aver implementato, anche se in modo abbastanza intuitivo, la prima ipotesi; cioè dire, immaginando di studiare questa soluzione, la prima e la seconda ipotesi: questa soluzione in due parti, $x > 0$ e $x < 0$. In ciascuno dei due scenari avete me che inizia ad allarmarsi perché c'è uno dei due termini dell'esponenziale che esplode (o esplode a destra o esplode a sinistra), quindi lo devo togliere di mezzo. E l'altra, la continuità, la ottengo dicendo che per $x = 0$ deve essere la soluzione per $x > 0$ e quella per $x < 0$ devono essere uguali. Potete verificare che quando mettete il modulo avete "gratis" questa situazione in cui in entrambi i casi è sopravvissuto solo uno degli esponenziali: quello buono, quello dissipativo, quello gentile, non che esplode. E quindi avete bisogno solo adesso di identificare un'unica costante.

E ovviamente avete bisogno di questa **terza condizione al contorno**. La terza condizione al contorno, nella prossima slide vi dico come viene fuori, e ha esattamente la stessa forma — di nuovo vi chiedo su, qui c'è I_0 di mezzo che manca — ha la stessa forma del caso semi-infinito, però c'è **1 diviso 2**. "1 diviso 2" non ce l'ho messo io arbitrariamente, non è messo nella corrente che sto iniettando. Vi farò vedere fra poco una simulazione che, a parità di condizioni, un caso semi-infinito o circa semi-infinito (è infinito come questo) in cui c'è questa simmetria orizzontale, la depolarizzazione in questo caso è la metà di quella che avreste avuto prima. Perché? Perché, come detto, la corrente scappa e da un lato e dall'altro.

Come ho fatto? Ho preso quella che era scritta ancora nella lavagna in alto, l'equazione del cavo più completa di così non posso, in cui ovviamente ho trascurato questo termine perché non ci sono sinapsi; lì in mezzo ci sono solo io con la mia densità di corrente. Qui ci devo mettere una densità di corrente per far tornare le cose, una i piccolo, e questa i piccolo l'avevamo definita la settimana scorsa come la quantità che inietto diviso $2\pi a$ (raggio) per Δx . Ma qui, se uso la Delta di Dirac, non è una soluzione, non è una funzione qualunque; è una funzione che di per sé si porta dietro un'ampiezza che non è adimensionale e quindi devo per forza tenerne conto e normalizzare, se volete, da questo punto di vista.

Dopodiché faccio la cosa seguente. Ok, mi rammento perché lo scordo sempre... l'unica cosa che mi ricordo è la costante di spazio e che c'è, sicuramente c'è un mezzo, c'è ovviamente la radice perché là sopra compare come λ^2 , essendo il grado di derivazione rispetto a x due volte; mi ricordo solo che è proporzionale al raggio attraverso la radice, ma non riesco a ricordare r_m e r_i se vanno sopra o uno sotto. Quindi figuratevi se io all'esame vi posso chiedere qual è l'espressione senza parlare; magari vi aiuto a derivarla perché non è venuto l'Arcangelo Gabriele a portarla sulla Terra: l'abbiamo identificata partendo da un modello circuitale a parametri concentrati che rappresenta quello a parametri distribuiti, e piano piano scrivendo Kirchhoff abbiamo tirato fuori l'equazione differenziale alle derivate parziali ed è uscito questo termine. Fine inciso.

Questa è l'equazione che devo studiare, o meglio che in effetti ho già studiato, ma non la voglio studiare. Voglio vedere se da qua riesco a captare la condizione che

mi serve per identificare quella K . Nella slide precedente vi ho dato direttamente il valore di K . Voglio farvi vedere questo modo, che secondo me è più semplice di tutti, su come esce fuori. Qui non ho più la dipendenza nel tempo, ho tutta la dipendenza da x . E anche questa Delta di Dirac è una funzione di x , non è una funzione del tempo. Quello che posso fare... vedete che dal momento che c'era questo Δx , qui non c'è più il Δx che sarebbe rimasto.

Quello che posso fare è applicare ad ambo i membri l'integrale. Se non mi ricordo male, forse due settimane fa, quando eravamo nell'altra aula al Policlinico, avevo fatto esattamente la stessa operazione parlando del mio conto bancario, in cui volevo dirvi come trattando il rilascio sinaptico come una Delta di Dirac veniva facile poi capire cosa succedeva a una variabile che era per esempio... mi rappresentava la frazione di canali di recettori post-sinaptici in uno stato aperto subito prima dell'arrivo di uno spike pre-sinaptico e subito dopo. Avevo una regoletta stupida che era “dopo uguale a quello che avevo prima più un salto”; veniva fuori da un'equazione simile (non era nel tempo e non era in x e la derivata compariva con il primo ordine e non il secondo ordine, ok), ma avevo fatto lo stesso discorso in cui dicevo: se applico l'integrale, qui ho un differenziale esatto. Ok, il differenziale... diciamo questo ammazza solamente una derivata; il differenziale esatto, la primitiva, è la derivata prima di V rispetto a x . Poi avevo detto — e questo è fondamentalmente esattamente lo stesso termine che c'era — questo termine è un termine che sto integrando una funzione continua su un termine a misura nulla, su un intervallo di integrazione a misura nulla, quindi è zero. E vi avevo anche detto che questo era in parte legato a un'euristica in cui quando le equazioni avevano un “brutto” ingresso (brutto dal punto di vista delle discontinuità come questo), l'uscita per definizione di equazione differenziale — che vuol dire che la soluzione in qualche modo si ottiene integrando, e l'integrale è una cosa che “non accarezza”, che alliscia, non come la derivata che favorisce le differenze, che amplifica, che è un filtraggio passa-alto, che fa casino — quindi l'uscita è sicuramente sempre più continua dell'ingresso. E anche in questo caso posso usare lo stesso ragionamento per dire: questa è una funzione continua e derivabile integrata su un intervallo di misura nulla.

Qui, a parte questi che sono costanti note, date — anche I_0 , sono io che dico è 20 pikoampere o 50 pikoampere — resta l'integrale della Delta di Dirac. Nota: sto facendo questo integrale fra 0^- e 0^+ , come l'altra volta. L'altra volta era attorno, forse l'abbiamo chiamato T_0 , T_0^- e T_0^+ , attorno al momento in cui avveniva un rilascio pre-sinaptico; in questo caso è nello spazio. Sto per semplicità dicendo che la pipetta è messa a $x = 0$, quindi la Delta di Dirac non è traslata, è posizionata in 0; cioè quando $x = 0$ questa è... prende valori infiniti. L'integrale tra 0^- e 0^+ della Delta di Dirac è 1. È l'area. Questo è... ho ucciso la Delta di Dirac con la sua definizione: è una funzione tale che, una distribuzione tale che quando uno ne fa l'integrale in un range dove è definita (nel caso limite anche 0^- e 0^+ , perché sta lì dentro), l'area è unitaria.

$$\int_{0^-}^{0^+} \delta(x) dx = 1$$

E quindi trovo questa che di fatto ricalca la condizione al contorno che avrei avuto in parte... che avrei avuto diciamo ricordandomi che stavo iniettando la corrente, quindi c'era un ulteriore termine di corrente nel bilancio delle correnti

di Kirchhoff a quel nodo: una per la soluzione che va a destra e una che va della soluzione che va a sinistra.

È facile, una volta che uno scrive questa quantità, calcolarla in 0^+ e poi meno calcolarla in 0^- . Scopre che questa cosa non si annulla e K prende il valore che ottenete appunto da... mettendo questo qui diventa meno $2K/\lambda$, quindi il 2 esce fuori da qua; quello che poi diventa al denominatore un mezzo (vi ho detto il fatto che la corrente scappa sia a destra che a sinistra). E gli altri termini (r_m su $2\pi a$) sono alla fine e λ che è dovuto alla derivata, si ritrovano qui. Quindi questa slide qui vi dice come ho fatto a tirar fuori questa soluzione nella slide precedente. Chiaramente qui c'è "per I_0 ", lo devo modificare e lo farò alla fine della lezione, scusatemi. Ho pensato e continuo a pensare che sia a questo modo... nonostante sia "oh my God, sto integrando la Delta di Dirac", che è esattamente quello che abbiamo fatto assieme due settimane fa, se non siete morti (alcuni di voi non sono morti all'epoca). Anche in questo caso potreste dire: "Ok, qui ha un significato diverso, totalmente diverso; sono io con la pipetta e il fatto che ci sia la Delta di Dirac è perché io sono esattamente in un punto microscopico [senza] alcuna estensione spaziale"; lì era nel tempo. *That's it*, ok.

Quindi qui con V , anziché v piccolo, V grande, è più qualcosa... è più un mezzo, e anche qua mi sono dimenticato I_0 . I_0 non mi piace, probabilmente perché era... perché in parte l'area della Delta di Dirac. Nel caso infinito, infinito in due direzioni, di nuovo: in ciascun ramo avete, come era intuitivo aspettarsi, un decadimento esponenziale.

È come se fosse esattamente la stessa distribuzione che avreste in termini di temperatura se aveste una barra di metallo e aveste una stufa, un fuoco in un punto. È chiaro che a destra e a sinistra avete man mano una riduzione della temperatura che è massima nel picco. *Idem*, la stessa cosa.

Qui vi faccio vedere, tanto per movimentare la cosa, che quando il cavo dovesse avere un punto di biforcazione — di cui semplicemente ve lo menzionerò rapidamente ma non spenderemo tante parole — avete di fatto questo andamento simmetrico. Qui c'è un ulteriore cambiamento al punto di biforcazione e l'ho messa questa figura perché un pochino intuitivamente, se qui capite che la corrente entrando in questo punto va a sinistra e a destra, quindi cambia la forma attorno a questo punto... quando c'è un punto di biforcazione potreste pensare che la corrente qui di nuovo si biforca da un lato e dall'altro in modo dipendente da quello che è il possibile diametro. Perché di mezzo ci sta, in quella espressione di R_∞ , ci sta dentro λ e quindi ci sta dentro a , o la radice di a .

Quindi il contributo quando avete un cavo infinito oppure quando il punto di iniezione della vostra corrente non è... o di arrivo di un input sinaptico — vedete che alla fine la corrente, a parte il meno, o l'input sinaptico sono equivalenti, grosso modo; sono sempre pezzi messi come input in quell'equazione differenziale. In questo caso, appunto, si ha una distribuzione spaziale che rappresenta come picco il punto dove avviene l'iniezione di corrente.

Questo è interessante perché questa attenuazione molto ripida — ripeto, molto ripida dipende dalla scelta di λ , o meglio dalla scelta... da quello che è λ per quei parametri — ha una caratteristica molto interessante quando si parli di **strutture arborizzate** che non sono per definizione simmetriche. Nel nostro caso infinito in tutte le due direzioni, sì, era simmetrico. Ma se voi avete l'iniezione

di corrente, come in questo caso, all'estremità di questo dendrite, che è una di una diramazione, poi c'è un'ulteriore diramazione, un'ulteriore diramazione, di una struttura molto complicata... qui non c'è alcuna simmetria rispetto ad altri punti di questo cavo. Se volete è una specie di cavo generalizzato avendo più rami.

Questo ramo contrassegnato come S è un ramo che, con una sua, una propria coordinata rettilinea, lineare, che non ha nulla a che fare, non condivide la distribuzione di potenziale dell'altro cavo se non per un raccordo di continuità al punto di giunzione. Ma comunque, al di là di questa possibile complessità che si è capita soltanto iniziando a maneggiare anche soltanto lo *steady state* — come stiamo facendo noi — l'equazione del cavo... e ah, ok, in parte menti brillanti lo vedono direttamente nella soluzione analitica, altri devono fare la simulazione numerica. Simulazione numerica che comunque è richiesta quando i dendriti dovessero avere delle conduttanze attive. Ricordatevi che l'equazione del cavo, così come è scritta, vale solo nel caso di proprietà *leakage* di membrana; non ci sono in quell'equazione — le potete mettere, ma scordatevi di fare la soluzione analitica — correnti sodio, potassio. Le potete sicuramente mettere, andrebbero al secondo membro, ma non scrivereste “carta e penna” come stiamo facendo noi.

Quello che si vede è che se considerate a zero in questa coordinata qui il punto del Soma, che su queste — ripeto — questa specie di coordinata rettilinea composta da tanti cavi... lo considerate in risposta a un'iniezione di corrente distale — distale vuol dire lontana, distante rispetto al soma — vedreste che da qui un input di corrente che ha una certa ampiezza avrebbe un'enorme attenuazione al soma. Questo tratteggiato è la distribuzione del potenziale di membrana nello spazio, allo *steady state*, quando la stessa identica corrente fosse iniettata al Soma. È un pochino di più, ma non è così drammaticamente più grande.

Allora, nessuno ovviamente lo sa, nessuno comunque può affermarlo con certezza: forse l'albero dendritico di un neurone così arborizzato, sfruttando “gratis” le conseguenze della teoria del cavo, si è evoluto in modo tale da non solo aumentare l'estensione spaziale come gli alberi con le foglie per prendere più luce possibile — in questo caso per prendere più input possibile — ma la matematica fa sì che un'iniezione di corrente in un particolare cavo, che vedete anche sottile (quindi ha una particolare λ più piccola, ha un raggio più piccolo rispetto al diametro di questo tronco padre), qui la depolarizzazione è molto elevata. E al Soma, grosso modo, ha lo stesso effetto che si avrebbe se l'iniezione di corrente fosse non laggiù ma al Soma. Chiaramente l'attenuazione è notevole.

Asimmetria della attenuazione nello spazio

La cosa interessante è che vedete che mentre lungo questa coordinata lineare — curvilinea dovrei dire — dal punto di iniezione fino a questo punto di biforcazione l'attenuazione è molto molto elevata (si va giù praticamente del 50%... qui è normalizzato, ma è normalizzato per il... non lo so per cos'è normalizzato, dovrebbe essere normalizzato ma non capisco perché questo è 3 punto qualcosa; comunque da 3 punto qualcosa a 1.8, quello che è, è una notevole attenuazione), guardate però che cosa succede alla distribuzione del potenziale di membrana dovuto a questa iniezione di corrente distale in questo *branch*, in questa ar-

borizzazione S : praticamente quasi ininfluente. E così avviene pure negli altri *branch*. Quindi l'attenuazione è **asimmetrica** e non è un'equazione non lineare, è un'equazione linearissima; quello che diventa non lineare, o meglio che rompe la simmetria in questo caso, è la geometria.

E la seconda cosa che possiamo notare è che, visto che ciascuno di questi domini possono avere un raggio e una lunghezza diversi — quindi ergo una costante di spazio diversa — e possono avere delle condizioni al contorno in cui si raccordano qui e poi qui, si può dar luogo a quello che viene chiamato **territori sinaptici**. Cioè dire: il fatto che una sinapsi sia qui potrebbe farla funzionare in modo largamente indipendente da una sinapsi che invece è sull'altro *branch*, per una specie di isolamento elettrico dovuto all'attenuazione. L'attenuazione è asimmetrica, quindi lo è anche il comportamento elettrico in *branch* diversi.

Notate che questo grafico qui, questa analisi qui e queste considerazioni sono del '73, quindi Rall [Wilfrid Rall], il padre di questa teoria del cavo, ha contribuito in modo drammatico negli anni '60, '70 e '80 sulla comprensione anche prima di risorse di calcolo particolarmente performanti.

Idan Segev è stato allievo di Wilfrid Rall ed è uno degli esperti mondiali di questo tipo di descrizione multicompartimentale — si dice delle proprietà eccitabili dei neuroni — e in particolare ha calato nella specifica morfologia e geometria di alcune cellule piramidali, piramidali umane, questo concetto. E dove vedete qui la parte di questa morfologia dendritica eccetera in rosso — qui, qui, oppure qui, oppure qui, oppure qui — e la descrizione matematica rappresentata in forma colorata di quello che vi ho fatto vedere prima, cioè che la depolarizzazione possa restare... questo quantificato in termini di attenuazione, relativamente localizzata grazie alla morfologia. Ma questo dipende da dove gli input sono applicati.

Se sono applicati al Soma — e vi faccio vedere fra poco una dimostrazione — questo è in qualche modo... l'attenuazione è relativamente... si fa sentire nei dendriti, ma è relativamente bassa. Quindi un input applicato al Soma ha un effetto di potenziale elettrico sui dendriti basali e anche su una parte del dendrite apicale. Viceversa, se l'input è distale, al somma praticamente è attenuato quasi al 100%, mentre resta confinato in questa porzione dell'albero dendritico. *Idem* in questo caso; in questo caso invece è un input nei dendriti basali che di nuovo si comporta come una specie di compartimento a sé stante.

Vi faccio vedere adesso una delle simulazioni. Questo è un notebook che è a vostra disposizione su Google Colab. Se avete problemi parlate. Allora, quest'altro notebook rispetto a quelli precedenti continua a essere scritto in Python, ma visto che il problema è di dimostrare in modo facile — ve ne sto dando due, uno l'ho aggiunto questa mattina — di studiare l'equazione del cavo, ci sono due strade: o uso un simulatore, quindi un programma, una libreria se volete, che di mestiere simula cavi, oppure devo io implementare il metodo numerico o invitare voi a fare lo stesso. Fin quando si tratta di Eulero, anche se Eulero è il metodo più becero di integrazione numerica, le cose vanno bene. Vi ho detto che per quel tipo di equazione differenziale delle derivate parziali le cose sono più complicate.

Quindi quello che faccio in questo notebook è utilizzare un programma che si chiama **NEURON**, con molta fantasia; c'è circa dagli anni '80 (dagli 80's) e in-

izialmente aveva — e tuttora ha, però quasi nessuno la utilizza — un'interfaccia basata su un linguaggio obsoleto che si chiama HOC (era una versione del linguaggio C con l'iniziale del creatore, **Michael Hines**). È un'autorità nel campo perché a distanza di... magari poteva essere metà degli anni '80, comunque a distanza di 20-30 anni questo continua ad essere ancora il riferimento per la simulazione numerica di cavi, di reti, di neuroni eccetera. Attualmente da più di 15 anni, ha più di 10 anni, ha un'interfaccia Python ed è relativamente facile da installare: `pip install neuron`. Quindi come voi installate una libreria di Python — matplotlib, numpy, scipy o quello che è, pandas o quello che utilizzate — potete installare questo e lo avete nel codice. Lo potete fare su questo Colab di Google che vedete; io faccio `!pip install neuron` e lo faccio con il punto esclamativo perché sto facendo un cosiddetto *escape*: è un comando della *shell*, questo non è un comando di NEURON, ma è un comando del sistema operativo, però Google Colab mi permette di fare queste cose. Io di fatto sto scaricando da un *repository*, con questo comando, sto scaricando il *repository* Neuron e lo installo nel cloud. Qualche anno fa era impensabile fare una dimostrazione o mettere voi nelle condizioni di — senza impazzire troppo — poter accedere a una simulazione con Neuron senza dovere sul vostro laptop installare 25 cose, poi non funziona... quindi siete fortunati a vivere in un tempo di facilità dal punto di vista numerico.

Quello che faccio, al solito — se siete coraggiosi potete vedere il codice, ma non è oggetto di questo corso, se non quello di stimolare qualcuno di voi a giocare — in cui fisso la costante di spazio perché fisso il parametro del raggio (il raggio in questo caso è 0.5 micrometri e con gli altri parametri ha come valore della costante di spazio 500 micrometri) e quello che posso fare è cambiare la lunghezza di questo cavo.

Se il cavo è lungo, vedete che la soluzione con i pallini rossi, che è la soluzione numerica, sembra descrivere bene — o meglio viceversa, sembra allinearsi bene — a quella che è la traccia nera. La traccia nera è l'espressione analitica $R_\infty \cdot I_0 \cdot e^{-x/\lambda}$, quindi l'espressione analitica nel caso infinito. Mentre il caso rosso è il caso finito. Tanto che con lo *slider* sto cambiando... come far andare via questo ma credo di no, di non poterlo fare... sto cambiando la lunghezza. Adesso il cavo è 4 mm, quindi 4 volte lambda... scusate, 8 volte lambda. Se lo rendo più vicino al... adesso è 2007... se lo rendo 900, questo è due volte lambda, vedete che l'espressione teorica nel caso infinito si discosta dal caso finito.

Potreste aiutarmi e magari aiutarmi a fare un'altra box in cui non solo mettiamo l'espressione del cavo infinito, ma mettiamo l'espressione del cavo finito, quello con il seno iperbolico che credo di aver interpretato che vi sia piaciuto particolarmente. È brutta l'espressione ma non è complicata ed è estremamente interessante perché alla fine i neuroni sono strutture che possono avere sia compartimenti lunghi o compatti.

Qui avete la stessa cosa se volete utilizzarla, in cui questa è la situazione in cui ho un cavo semi-infinito. Nella simulazione numerica non posso fare un cavo semi-infinito, lo devo fare lungo, ma l'iniezione di corrente è in mezzo e di nuovo vedete che se il cavo è particolarmente lungo, l'accordo fra il rosso e il nero è bellissimo: $e^{-|x|/\lambda}$ con quella quantità, ricordatevi, $1/(2R_\infty)$. Se il cavo è corto, la soluzione non è... è anche profondamente diversa; questo è circa un lambda, la soluzione si discosta in modo notevole.

C'è un'ulteriore simulazione qui, che fondamentalmente avete e in teoria potete utilizzarla. Questa è nel tempo. Questo grafico qui rappresenta, al variare del tempo, come in punti diversi di un cavo il potenziale di membrana cambia nel tempo. Diciamo, sembrano transienti che hanno una diversa attenuazione. Qui sono per diversi valori di... mi ricordo cosa, sono diverse posizioni, diverse posizioni per diverse lunghezze. Quando il cavo è corto... alla fine non si vede particolarmente in questa, quindi dovrei fondamentalmente dire che quando il cavo è molto lungo rispetto a λ , l'attenuazione è molto evidente e la cosa che notate è che la forma sembra essere diversa. Di nuovo, per fare una simulazione del genere non riesco numericamente in modo semplice a fare il metodo numerico, ho utilizzato ancora Neuron.

Regime sinusoidale permanente e costante di spazio “efficace”

Vediamo quindi il caso del transitorio. Però prima di fare il caso del transitorio, considero il transiente nel **regime sinusoidale permanente**, in cui per mezzo di operazioni di trasformata nel dominio delle frequenze... quella che vi piace di più, Laplace o Fourier; lo faremo con Fourier fra una mezz'oretta... di fatto di nuovo la derivata nel tempo sparisce. Sparisce perché nel dominio trasformato le derivate temporali diventano operazioni algebriche, diventano moltiplicazioni per — in particolare in Fourier — $j\omega$. Quindi anche lì in quel regime io mi riconduco al caso in cui so risolvere.

Vi farò vedere l'equazione del transitorio in cui non faccio alcuna... diciamo non c'è alcuna semplificazione, non c'è alcuna ipotesi e la soluzione cambia sia nello spazio che nel tempo, ma ve la do “dall'alto”, non la deriviamo. La prima cosa che facciamo rispetto alla volta scorsa... di cui vi rammento il risultato era questo... [Nota: qui il trascritto fa un salto logico, riprende il discorso interrotto precedentemente sull'AC].

Quest'ultimo grafico del Google Colab viene dopo. Qui è il metodo che vi stavo suggerendo in cui per ammazzare il termine di derivata temporale, anziché metterlo a zero — quindi dire “ok, cerchiamo di capire qualcosa”, e qualcosa abbiamo imparato: la simmetria, i territori sinaptici, l'attenuazione, il fatto appunto che esista una differenza fra una geometria finita, semi-infinita o finita — l'altro caso è quello di studiare una soluzione nel **regime sinusoidale permanente**.

Questo lo faccio perché l'equazione è lineare e in linea di principio, se io ho un segnale, una corrente, un input sinaptico che posso decomporre nelle componenti fondamentali di Fourier, potrei supporre di studiare le singole soluzioni frequenza per frequenza e poi ricombinarle; quello che è il principio della teoria dei sistemi lineari, ricombinarli sapendo la soluzione, la risposta del sistema alle singole frequenze. Però almeno una frequenza generica me la devo trovare.

Si fa con il metodo delle trasformate dove questa quantità qua diventa, nel dominio delle trasformate, un'operazione che non è più una derivata ma diventa un prodotto, un'operazione algebrica. Voglio usare Fourier perché mi sta più simpatico e perché alla fine sto considerando un regime sinusoidale, quindi Laplace non è più indicato quando ho a che fare con i transitori. E vi ricordo che la trasformata di Fourier di questa funzione $v(x, t)$ — la sto considerando una funzione del tempo, è anche una funzione di x ma questa è la trasformata di Fourier nel tempo; la potrei fare anche nello spazio ma qui la faccio solo nel tempo — la

indico come W . Continua a essere una funzione di x , perché x non è la variabile indipendente che sto considerando, però cambia con ω , la cosiddetta pulsazione (cioè a dire $\omega = 2\pi f$, la frequenza, in modo equivalente).

Mi piace W perché mi ricordo facilmente che la trasformata, se v piccolo la voglio trasformare, devo metterla sotto integrale, meno infinito più infinito perché deve essere una roba su tutto il dominio di definizione della funzione, c'è $1/2\pi$ e poi dentro c'è $e^{-j\omega t}$ in dt . Vedete che la t viene saturata essendo la variabile *dummy* dell'integrale, quindi questa quantità qui è un numero, non è più una funzione del tempo; il tempo non c'è più, l'integrale è l'area sottesa. Ovviamente il tempo è pesato da ω , quindi cambiando ω cambia questo integrale. j è la radice quadrata di meno uno e uso j perché gli ingegneri di solito usano j e non usano i , dove i sarebbe la corrente. In effetti J è pure spesso utilizzata come densità di corrente, comunque j è il numero immaginario, $\sqrt{-1}$.

Se faccio così si può dimostrare — e lo potete fare tranquillamente se non l'avete fatto da anni, lo potrete riprovare — qual è la trasformata di Fourier della derivata di v rispetto a t . E trovereste che il segno di trasformata e il segno di derivata si possono scambiare perché sono operatori lineari e trovereste che quello che sopravvive è $j\omega$, che è la derivata di questo termine... è $e^{-j\omega t}$.

Ho già fatto il conticino perché sono sicuro che non è così cruciale, quindi qui questa derivata, quindi laddove ho v e non c'è il tempo lo rimpiazzo con W , perché per questa linearità la derivata due volte nello spazio di v piccolo è equivalente alla derivata rispetto allo spazio due volte di W . Qui è la cosa diversa e qui diventa $\tau_m j\omega$ per W più W . Ho già fattorizzato e l'ho scritto in questo modo, perché questa è esattamente la stessa forma che aveva l'equazione del cavo nel regime dello *steady state*, quando però non ci fosse questa pizza qui, quindi per $\omega = 0$.

Quindi da un lato mi fa piacere ritrovare il caso DC quando ω è zero; quando ω è zero questo esattamente è λ^2 per la derivata adesso totale — non è più v , ma è W , perché ovviamente ω conta — questo era il caso dello *steady state*. Quando non è lo *steady state* ma è un regime sinusoidale, quello che gli ingegneri chiamano regime AC, ovviamente cambia. E lo scrivo in questo modo per poter suggerire a voi che è come se fosse esattamente la stessa soluzione che abbiamo visto prima, la stessa equazione, e avrà la stessa soluzione che abbiamo visto prima.

Però qui io vorrei scrivere non λ^2 diviso bla bla... vorrei scrivere λ^2 **efficace**, cioè una specie di costante di spazio che evidentemente dipende dalla frequenza, che io posso mettere qui e posso dire: “Ah, ok, la soluzione è come nel caso dello *steady state*, però la costante di spazio cambia”. Cioè intuitivamente penso che a diverse frequenze la costante di spazio stia cambiando. Quindi per segnali lenti la costante di spazio potrebbe essere grande, mentre per segnali veloci la costante di spazio potrebbe essere piccola. È come se un dendrite, o una porzione di esso, avesse un comportamento **a fisarmonica** dipendentemente da come variano i segnali che lo occupano. Che è molto interessante, ma così non lo riesco a fare perché qui ho questo dannato j . Quindi questa è una quantità complessa. Vorrei che fosse una quantità reale.

Segue un calcolo un po' noioso. Di nuovo vedrete che non è particolarmente

complicato. Chiedo scusa, questo sarebbe dovuto apparire prima... ok:

$$\lambda^2 \frac{d^2 W(x, \omega)}{dx^2} = (\tau_m j\omega + 1)W$$

Fattorizzando W posso vedere che c'è questo termine τ_m e bla bla che va al denominatore. Se prendessi questa quantità qua e la chiamassi λ^* **al quadrato** (λ_{star}^2), questa lambda efficace, potrei scrivere di botto questa espressione. E anzi la scrivo perché è esattamente l'espressione, la soluzione di questa equazione AC, ma ancora non sono soddisfatto perché questa quantità qua è una quantità complessa. Come d'altronde è la trasformata di Fourier di una funzione W : è una funzione di variabili, una funzione complessa di $j\omega$, avrà una parte reale e una parte immaginaria, avrà un modulo e una fase.

Quindi se proprio volessi, al di là del fatto della fase che potrebbe magari non... mi piacerebbe almeno capire se è il modulo. Vorrei riscrivere qualcosa del genere come modulo per $e^{j \text{fase}}$, perché se lo posso fare, allora almeno il modulo posso dire: "Ah, ok, questa cosa della fisarmonica dipendentemente da ω la posso fare". Per il momento ancora non posso farla, è lo stesso commento di poco fa.

Quindi λ^* lo definisco come quello che mi piacerebbe mettere qua per far sparire questo denominatore. Lo chiamerei λ^* . E visto che questo era λ^2 , qui lo metto λ e qui sotto devo però fare la radice quadrata. E di nuovo qui mi dà ulteriormente fastidio perché sì, ho capito che λ^* è una quantità complessa, ma se mi mettete al denominatore pure la radice quadrata mi dà ulteriormente fastidio. Mi sarebbe piaciuto scrivere λ^* come $A + jB$ (parte reale e parte immaginaria) e poi vedere se magari... o meglio, mi piacerebbe più fare modulo e fase, perché il modulo mi dà un'indicazione dell'ampiezza. E se sto parlando di un'attenuazione, di un'ampiezza, forse mi basta quella. Sì, magari ci sarà uno sfasamento che dipende da ogni frequenza, il concetto dell'attenuazione che potrebbe selettivamente cambiare alcune frequenze e non altre, lo potrei vedere con la *magnitude*, l'ampiezza, il modulo.

Quindi l'obiettivo è di scrivere qualcosa del genere, di trasformare questo esponenziale con un pezzo che è un numero complesso in $M \cdot e^{j\omega}$, dove questa M evidentemente è anche una funzione dello spazio, una funzione di x , e anche la fase sarà una funzione di x . Ma io voglio scriverla così perché voglio guardare questa M , perché "mi sei apparso tu, questa M ". Io voglio capire M , anche la fase se fosse il caso. E questa M , questo modulo, è ovviamente una funzione del punto e della frequenza.

Come lo faccio? Prima di tutto noto che questo è e^{-x/λ^*} , quindi compare al denominatore. Per evitare di soffrire troppo già mi metto a studiare $1/\lambda^*$, perché vedete che qui all'esponente è "1 diviso". Questo mi porta al numeratore $\sqrt{1 + \tau_m j\omega}$. Se non ci fosse la radice, vi sapreste dire qual è la parte... immaginando che non ci sia la radice... qual è la parte reale di questo numero complesso $1 + \tau_m j\omega$? E la parte immaginaria, quella che è. Sarebbe facile. Il fatto che c'è la radice quadrata dà un pochino di fastidio, però potrei immaginare di scrivere che se questo lo faccio al quadrato, potrei in altri termini dire: se ho C , che è un qualche numero complesso, lasciamo perdere il denominatore... $1 + \tau_m j\omega$, and that's it. Potrei pensare non di scrivere C , ma di scrivere $C^2 = 1 + \tau_m j\omega$. Di questo io lo so scrivere la parte reale e la parte immaginaria, come avete fatto prima.

L'unica fregatura è che poi devo tornare indietro. Però posso ricordarmi che i numeri complessi hanno anche un'altra forma, ma non soltanto questa in cui avete parte reale più j parte immaginaria, ma avete... quindi C^2 , sarebbe $A^2 e^{j\Phi^2}$. Con questo trucco, di cui non sto a stressarvi più di tanto, riuscite a scrivere sia il modulo — e di nuovo a me probabilmente interessa più scrivere modulo, perlomeno il modulo — sia il modulo... e questo non è più un numero complesso, grazie, è il modulo. E la fase, se mi servisse di trovare la fase, la fase è un mezzo arco che ha per tangente τ_m/ω no, $\omega\tau_m$ (parte immaginaria su parte reale). Il fatto che lì ci sia la radice quarta e il fatto che qui ci sia un mezzo, viene dal fatto che qui abbiamo fatto questo trucco: ci siamo passati al quadrato e poi siamo tornati indietro, ma non con la stessa forma parte reale più j parte immaginaria, ma usando la notazione vettoriale, quindi modulo e fase.

Qui invoco, credo che sia l'unica volta... no, non l'unica volta, però comunque è relativamente raro in neuroscienze invocare la formula di Eulero... ah no, l'ho fatto anche... no, non è raro. Invoco la formula di Eulero, che se vi vedete è pieno YouTube, pieno di video dove si esplora la bellezza di questa equazione, eccetera:

$$e^{j\phi} = \cos \phi + j \sin \phi$$

Di nuovo sto facendo “avanti e indré” fra i due modi di scrivere un numero complesso, perché non vorrei che $e^{j\phi}$... non vorrei perdermi una parte di quello che... ripeto, il mio obiettivo è di scrivere modulo e fase di questa equazione qui. Di questa equazione qui. Quindi devo soffrire, devo stressare un po' questo $1/\lambda^*$ per poter arrivare almeno a concentrare qui tutto quello che non è... che non ha termini complessi e qui la parte immaginaria, la parte di fase.

Come detto lo devo fare per tappe. La prima è di capire questo $1/\lambda^*$ come lo scrivo in termini di modulo e fase. Ok, ma la fase la posso scrivere ulteriormente così, quindi posso ritornare indietro e scrivere che e^{-x/λ^*} lo posso scrivere come un esponenziale $e^{-x\lambda \cos \phi}$ per $e^{-jx\lambda \sin \phi}$. Quindi questo pezzo qui è la fase. Io, ripeto, ero interessato a capire questo dannato parte di modulo perché vorrei di nuovo paragonarlo con la soluzione analitica nel caso in cui non c'è... in cui ω è zero, in cui non ho numeri complessi e dove la soluzione era semplice, era un esponenziale decrescente, con una λ .

Qui che λ devo mettere? Immagino che sia un qualche... vedete, al di là del fatto che A è questa pizza qui clamorosa, se non ci fosse questa pizza clamorosa sarebbe $1/\lambda$. Quindi qui sarebbe $1/\lambda$, $e^{-x/\lambda}$, è la stessa cosa. Però nel caso AC, sinusoidale, avete questo ulteriore termine al numeratore, quindi qui dentro, e avete anche $\cos \phi$, e qui avete il coseno di un mezzo arcotangente bla bla. Lo faccio perché anche ϕ dipende da ω , quindi non solo A dipende da ω , ma anche ϕ dipende da ω . Questa parte qua magari me ne frego, ripeto: sono attento di capire come fare in modo equivalente questo benedetto caso sinusoidale permanente.

Ci sono delle relazioni che vi ho scritto semplicemente per spiegare i più avventurosi... questo diciamo non vi chiederò mai all'esame di... non che sia complicato, non è complicato ma è noioso e non credo che facilmente voi vi possiate ricordare l'espressione del coseno dell'arco tangente. Io non sapevo nemmeno che esisteva questa formula nota. Questa me la ricordavo... il coseno, quindi una formula di bisezione, questa credo me la ricordassi, ed è importante perché a un

certo punto questo coseno dell'arco tangente è un coseno di mezzo arco tangente. Comunque, se io fossi così coraggioso da fare questo coseno di ϕ e scriverlo per bene, alla fine otterrei una quantità che dipende da τ_m e ω , oltre alla A che pure è una quantità che dipende da τ_m e ω .

Per farla breve, questa pizza qui la posso effettivamente scrivere come questo $A \cos \phi$. La posso scrivere con un'espressione... qui la sto rappresentando come "1 su", perché qui la rappresento come un inverso di una... questa è una costante di spazio equivalente, efficace, AC. È un'espressione orribile, ma la posso plottare e vedo che quando la frequenza è molto bassa... questo in coordinate semilogaritmiche... quando la frequenza è bassa... bassa rispetto a cosa? Bassa rispetto a τ_m .

τ_m , costante di membrana, mi dice quanto veloce è "veloce". Se la costante di tempo di membrana è dell'ordine di 20-50 millisecondi, se ho qualcosa che varia molto lentamente dell'ordine di 1-2 Hz, a paragone 1-2 Hz con l'inverso di τ , che dovrebbe essere 20 Hz, rende trascurabile questa frequenza. Se invece ho un'oscillazione che è superiore a una componente di frequenza che è superiore a 20, 30, 50, 100 cicli al secondo, allora ovunque io ho τ_m per la frequenza ($\tau_m \cdot \omega$), qui l'ho scritto come f per poter dire cicli al secondo e non radianti al secondo, allora lì è una frequenza veloce.

Quando la frequenza è lenta, praticamente λ è uno dei termini... non è questo termine qui sotto radice, praticamente è ininfluente. Quindi se io vado lento, per segnali lenti... se ho un IPSP, tanto per intenderci, e questo IPSP arriva... questo è un neurone e questo è il suo dendrite, se ho una sinapsi qui e questo IPSP lasciamo perdere che salta rapidissimamente, ma quando decade lentamente questo comportamento di *decay* è molto molto lento e lì questo grafico mi sta dicendo: "Guarda che la soluzione di attenuazione di quella fase è indistinguibile dal caso in cui fosse un cavo allo *steady state*".

Il problema è qui, questa salita istantanea. Nella realtà non è istantanea, però se vi ricordate il valore di α per la concentrazione di un neurotrasmettitore era una frazione di millisecondo, particolarmente sto pensando agli AMPA, vanno su rapidamente: un millisecondo potrebbe voler dire un kilohertz. Sto facendo letteralmente uno diviso la costante di tempo; l'inverso di un millisecondo è un kilohertz. Supponete che ci siano varie... ok, 500 Hz, 100 Hz, quello che è. Siamo comunque qui, dove questo effetto di questo termine qui si fa sentire: più velocemente andate, più questo termine che "ammazza", abbassa la costante di spazio lo ammazza sempre di più.

Quindi mi aspetto che un IPSP o EPSP o anche l'equivalente inibitorio abbia sicuramente una deformazione, non possa passare, nonostante le attenuazioni, non possa farla fare franca ai transitori molto rapidi. Perché di per sé mi sta dicendo che il cavo diventa con una costante di spazio piccola. Se il cavo diventa con una costante di spazio piccola, anche se è un dendritino, un dendrite piccolo... se λ è molto piccolo, quel cavo lì è come se diventasse infinito. Lo sto estremizzando per farvi capire, quindi alle alte frequenze λ diventa piccolo, è come se i cavi diventassero lunghi, quindi hai voglia di attenuare! Al soma non arriva più niente.

E se ci pensate non è così impossibile da pensare, questa è la stessa cosa che ho detto prima, non è così inaudito da anticipare intuitivamente perché voi sapete

che se avete una struttura con dei condensatori, resistori, avete un filtro passa-basso, quindi cerca di sfavorire i cambiamenti molto rapidi nel tempo. Quindi se io ho una roba molto lunga — penso a Lord Kelvin, i cavi telegrafici — è una roba... un transiente rapido, nessuna sorpresa se dall'altro lato dell'oceano non arrivava. Non solo non arrivava la nota telegrafica a una certa ampiezza — grazie, l'hai ammazzata, l'hai molto attenuata — ma anche il contenuto spettrale è molto diverso, il transitorio rapido è completamente alterato. Un filtro, se pensate di capire che cos'è un filtro passa-basso con un RC in parallelo... se voi ne mettete tanti, è come mettere tanti blocchi di filtraggio uno dietro l'altro. Se il primo vi deformava e vi cambiava il contenuto in frequenze dell'uscita, se mettete un ulteriore filtro e poi un ulteriore filtro, quindi immaginando di scomporre un cavo con una serie di filtri, a destinazione avete qualcosa che è fortemente *low passed*, fortemente passabassato, fortemente deformato. I segnali rapidi non ci sono più.

Questo è un ulteriore grafico che vi fa vedere a diverse frequenze, questa è la soluzione, la soluzione nel caso AC. Vedete che somiglia molto al caso di un cavo semi-infinito, come anche questo è un caso semi-infinito, nel caso DC, nel caso dello *steady state*. Il caso dello *steady state* è rappresentato da questa curva blu, vuol dire è frequenza zero. Se la frequenza cambia — aumenta: 100 cicli, 500, 1000, 1500 cicli al secondo — è come se voi steste cambiando la λ , la state rendendo molto più piccola.

Questo grafico è ulteriormente normalizzato a λ , di nuovo in modo tale che si possa usare sempre. Quindi quello che fa fede è il confronto: l'attenuazione è molto molto brusca se andate rapidi ed è praticamente un pochino meno brusca se andate molto lenti. Paradossalmente se non vi muovete del tutto, nel caso DC, il caso blu.

Quindi questa quantità qua e il come ci siamo arrivati a derivarla può richiedere qualche fastidio dal punto di vista della manipolazione dei numeri complessi, che non vi chiedo all'esame, ma vorrei che almeno, più o meno — particolarmente da qua, da questo punto qui — semplicemente scrivendo Fourier, un'intuizione di dire: "Ah cazzo, qui è λ diviso ω ". Sì, è vero, c'è j , quindi questo discorso è molto intuitivo e non lo potete fare rigorosamente. Però quando ω cambia, la λ efficace qui diventa sempre più piccola. Questa è un'intuizione che vi chiedo di sviluppare. E per chi non è particolarmente infastidito dei numeri complessi... non sto parlando di fare l'integrale nel campo complesso di funzioni variabili complesse, solamente massaggiare espressioni in modo da farle tornare con modulo e fase, per poter scrivere modulo e alla j fase. Anche la fase sarebbe interessante e importante da esaminare, ma a me non interessa; per il momento mi interessa solo il modulo. Questo modulo ha un'espressione che dipende in qualche modo inversamente dalla frequenza: tanto più la frequenza, tanto più questo termine al denominatore ammazza la λ .

Interpretazione di dati sperimentali: registrazioni somato-dendritiche

Allora, adesso vi dico che ne facciamo di questa conoscenza. L'obiettivo è quello dei segnali extracellulari, ma già che ci siamo vi dico che cosa comporta questo dal punto di vista dell'effetto delle sinapsi, dei dendriti, dal punto di vista del soma.

E semplicemente vi faccio vedere due esempi in cui, non così nel passato — forse voi siete nati nel '94, non è nell'Ottocento — questo è una cosa che mi ha sempre colpito e ho conosciuto i tizi che hanno fatto questo esperimento e questo mi impressiona: il fatto che sia un'evidenza recente, che non sia un'evidenza che è sempre stata nota. Quindi è un campo relativamente giovane, quello delle neuroscienze, quello della neuroingegneria.

Qui vedete un esperimento in cui è stata messa una pipetta per registrare o stimolare sia nel Soma sia nel dendrite apicale diverse decine o centinaia di micrometri a distanza. Vi ho detto l'altra volta che questo non è assolutamente una roba semplice, perché mentre il Soma su uno schermo di un computer, nonostante la tecnica di microscopia infrarosso, lo vedete bene, il dendrite lo vedete come un filo ed è difficile con una pipetta sapere se avete solamente un'immagine, se state davanti, se state dietro o se lo state pinzando. Se invece facessi la stessa cosa con una palla da calcio sarebbe un pochino più facile. Il Soma è una palla da calcio, il dendrite è una roba molto molto sottile: il diametro qui potrebbe essere di un micrometro, due micrometri; il Soma invece è una decina, 15-20 micrometri, quindi è bello massivo.

Quello che è stato fatto è iniettare una corrente e far sparare il neurone. Quello che vedete qui, questa traccia qua, è un potenziale d'azione somatico e quest'altro elettrodo, che a distanza di diverse centinaia di micrometri, ne ha colto l'eco. Questa è una cosa strana perché viene chiamato potenziale d'azione di retropropagazione — anterogrado forse — ed è una cosa inaspettata. La neurofisiologia dal libro di testo prevedeva che quando uno spike, un potenziale d'azione fosse stato generato al Soma, si sarebbe propagato lungo l'assone. Che c'entrano i dendriti?

La struttura dendritica per come ve l'ho venduta, nonostante ci sia evidentemente una notevole attenuazione e un notevole filtraggio, è tale per cui con un certo ritardo — il ritardo lo vedete a parte nel picco ma lo vedete la salita della traccia del potenziale dopo... notate che potrebbe non essere, no ok, credo che qui la barra di calibrazione sia la stessa per entrambi... è un'attività molto più attenuata, circa la metà, ed è più lenta: va su più lentamente e va anche giù più lentamente, quindi è evidentemente un segnale filtrato. È interessante perché sembra che sia il mezzo con cui una sinapsi che siede qui... se vi ricordate due settimane fa, abbiamo parlato della plasticità sinaptica dipendente dal tempo di arrivo di un potenziale d'azione presinaptico e dell'arrivo del potenziale d'azione post-sinaptico. Vi avevo raccontato che era pre-post, pre-post rinforzava la sinapsi; se avveniva prima il post e poi il pre, la sinapsi si sarebbe depressa, a meno che la finestra temporale non fosse stata troppo grande. Questo è un meccanismo cellulare basato semplicemente sull'equazione del cavo, sul fatto che il dendrite è un cavo passivo — è un cavo attivo ancora meglio, non ne parleremo però — in cui alla sinapsi, qui dopo qualche millisecondo di ritardo, arriva l'informazione: "Questo neurone sta sparando e io ne vedo l'eco". Quindi questa è l'attenuazione del potenziale d'azione che si retropropaga.

Invece la propagazione ortodromica, quindi diretta in una direzione dal dendrite apicale al soma, è stata fatta... qui questo di nuovo, la barra di calibrazione è per entrambe le tracce, un millivolt, quindi è estremamente più piccolo. Quello che è stato fatto è stato qui iniettare una corrente che simulava, che emulava un potenziale eccitatore, una corrente eccitatoria post-sinaptica. In altri esper-

imenti, se questo non vi piace, gli sperimentatori non hanno messo la pipetta dentro il dendrite, l'hanno messa lì attorno e poi hanno fatto, dentro la pipetta c'era un pochino di glutammato e hanno fatto un cosiddetto *puff*, hanno fatto un rilascio di glutammato. E questo glutammato si è legato ai recettori sinaptici che erano qui nei dintorni, dando luogo a una forma d'onda pressoché identica.

Quello che vedete è di nuovo quello che abbiamo discusso prima: un input distale al Soma si propaga con una notevole attenuazione, oltre che con un filtraggio, una deformazione del... vedete che questo stadio di salita molto ripida non passa, è filtrato.

Vediamo quindi il caso del **transitorio**. La soluzione del transitorio non vi dico come si deriva; se siete interessati potete guardare o cercare la stessa derivazione per l'equazione della diffusione oppure della trasmissione del calore. È esattamente la stessa matematica, la stessa forma, solo che lì non è V ma è una concentrazione oppure è una temperatura, e non sono resistenze transmembrana o capacità, sono capacità termiche o resistenze termiche di accoppiamento termico, per esempio di conduzione, di scambio termico di calore per conduzione o convezione; non fenomeni legati a Kirchhoff e nel caso della diffusione sono conservazione della massa, non della carica e della corrente.

Per farla breve, la soluzione nel tempo e nello spazio, quando avete un cavo infinito da entrambe le direzioni e state iniettando una corrente in un punto specifico — quindi una specie di delta di Dirac con la x , ma questo è anche nel tempo, nel senso che viene mantenuto costante — ha questa forma e apparentemente non vi dice nulla. La vorrei riscrivere in questo modo. Se la riscrivo in questo modo spero che questo esponenziale di $-x^2$ somigli, vi ricordi, quello che è l'espressione di una gaussiana, di una curva campana. Anzi, è esattamente una gaussiana perché le gaussiane hanno $e^{-x^2/2\sigma^2}$ (qualcosa che chiamate σ^2 , la varianza) e se è una gaussiana vuol dire che prima il termine che moltiplica l'esponenziale deve essere $1/\sqrt{2\pi \cdot \text{varianza}}$.

Quindi, allora questa è un'osservazione interessante per chi conosce o ha visto per caso studiato l'equazione della diffusione perché lì la gaussiana spunta. Come in quel caso anche qui però... quindi è una gaussiana a media nulla, è centrata esattamente per $x = 0$, è questa qui. Però vedete che la varianza, questa σ che ho identificato — cioè io la sto chiamando varianza, ma non è una varianza, è un termine matematico che qui non ha solamente in modo analogo per analogia ha significato di varianza — vedete che dipende dalla costante di spazio e dal tempo.

Velocità di conduzione e confronto con dati sperimentali

Cioè dovete immaginarvi che se io ho questo cavo e ho un elettrodo che inizio a stimolare in un punto, inizialmente la gaussiana è molto molto stretta e col tempo che passa inizia a “spanciarsi”. Non solo si spaccia, ma la sua ampiezza, questa $A(t)$ — lo vedevate da qui, da questo termine esponenziale, l'ho riscritto qui semplicemente per convenienza — la sua ampiezza, fissato il punto, è un esponenziale nel tempo, con la costante di tempo che siete abituati a vedere.

Quindi nello spazio c'è qualcosa con questo e^{-x^2} , però è una soluzione simultanea, sia nello spazio che nel tempo. Nello spazio, come la curva a campana,

nello spazio vi direbbe, facendo un flash a un particolare istante... quindi questo istante è praticamente subito, 0,1 volte τ_m (il τ_m è la costante di tempo della membrana, supponete che sia 20 millisecondi, questo vuol dire dopo 2 millisecondi è così), dopo 20 millisecondi è così, dopo 40 millisecondi è così: si spancia e si appiattisce.

Questo è abbastanza ok da capire perché quello che sto facendo è: ho dato una “schicchera” qui — devo dare una schicchera con laser, ma non posso — dopodiché, diciamo, se fosse dell’inchiostro in un tubo pieno d’acqua, questo diffonderebbe lateralmente e la concentrazione sarebbe inizialmente più denso, l’inchiostro sarebbe più denso qui e poi tenderebbe a spanciarsi. La stessa cosa avete col potenziale elettrico e lo potete anche studiare non nello spazio ma nel tempo a punti diversi.

Era quello che vi facevo vedere nel codice di Google Colab all’inizio, ma non ha molto... ha senso solo se qualcuno di voi fosse particolarmente curioso e volesse mettere le mani e vedere come cambia questa cosa qua. Qui avete nel tempo; nel tempo vuol dire che dovete avere più pipette, oppure dal punto di vista di una simulazione avere “registra qui” (quindi registra da $x = 0$), poi “registra da $x = 0.5$ ”, “registra da $x = 1$ ”, $x = 2$, magari 1, 2, 3 in funzione di λ (quindi delle costanti di spazio), e ogni volta registrate. Scusate, non ogni volta: fate partire la simulazione e semplicemente registrate da punti distinti.

Vedete che per $x = 0$, al tempo 0 fondamentalmente l’ampiezza è infinita e poi inizia a decadere esponenzialmente. Sto guardando questa curva qua. Qualcosa che sicuramente vi sareste aspettati pensando al solito RC, alla solita cellula a singolo compartimento. Le date una schicchera, il potenziale schizza e poi decresce, decade nel tempo, come con la costante di tempo τ . Di nuovo qui l’asse delle t , del tempo, è normalizzato a τ , così che sia universale. Quindi vedete che dopo un τ l’ampiezza si è ridotta del 66%... non lo ricorderò mai questa cosa da ingegneri, per cui dopo una τ l’esponenziale è a meno 30%, non lo so.

Se vi spostate a 0,5, a 1, a 2 lambda, non vedete più il picco; lo vedete molto attenuato e shiftato, spostato. Alla fine anche il potenziale che si backpropagava nella simulazione che vi ho fatto vedere prima sembrava non soltanto accorciarsi ma shiftare. A una lambda o due lambda sembra che sia profondamente shiftato verso destra, oltre che attenuato.

Quello che si può fare, e lo fece per la prima volta Rall negli anni ’70-’80, è cercare per esempio di capire qual è la posizione nel tempo... a che tempo avviene il picco. Nota: non sto avendo a che fare con l’equazione delle onde. L’equazione delle onde, che di fatto era quella che ho simulato quando vi ho fatto vedere l’assone (l’assone tutto eccitabile), aveva per definizione una forma d’onda che era sempre la stessa e si propagava nello spazio. Questa è l’equazione delle onde, quella che viene chiamata equazione di D’Alembert. Avrebbe, se non mi ricordo male, un termine di derivata seconda del tempo, ma posso sbagliarmi.

Qui non c’è una vera propagazione, perché la forma d’onda non c’è una primitiva che si propaga, come nei campi elettromagnetici, nell’equazione di Maxwell, si propaga sempre identico. Qui è un qualcosa che sembra una perturbazione che si muove sia nel tempo (fissato il punto) ma sia nello spazio (fissato il tempo).

Quindi quello che uno può fare è plottare la posizione del picco e dire: questo picco dov'è al variare del tempo?

Scrivete questa relazione e trovate che di fatto è una relazione quasi lineare, tranne l'inizio. All'inizio appunto c'è, per tempi molto piccoli, c'è una piccola eccezione: questa curva sembra che non parta dritta ma parta con una derivata maggiore. E potete scrivere che la pendenza di questa curva — alla fine questa è una curva spazio-tempo — quindi la *slope*, la pendenza di questa curva è una velocità. Ripeto, non è un fenomeno di propagazione di un'onda, è un fenomeno di propagazione di una perturbazione che cambia di forma. Però se prendo per buono il picco, posso pensare che questo picco potrebbe essere rappresentativo del picco di un IPSP, di un potenziale eccitatore, un inibitorio post-sinaptico distale. Se io so qual è la distanza e so qual è la velocità di — chiamiamola — propagazione, di conduzione (chiamiamola meglio velocità di conduzione), potrei prevedere quanto tempo impiega un potenziale sinaptico remoto ad arrivare al Soma. Non soltanto l'attenuazione che, ok, ci sta, eccetera, ma anche il tempo.

Viene fuori che questa velocità di conduzione è data, forse banalmente, forse no... non banalmente perché c'è questo 2... costante di spazio diviso costante di tempo:

$$v_{\text{conduzione}} \approx \frac{2\lambda}{\tau_m}$$

Ok, due volte costante di spazio diviso costante di tempo. Alla fine non era assolutamente intuitivo pensare che quel termine messo a moltiplicare la derivata spaziale e l'altro a moltiplicare la derivata temporale avessero a che fare in modo così semplice — e questa ovviamente è un'approssimazione — per descrivere quella che sembra essere una specie di velocità di conduzione.

E questa cosa della velocità di conduzione, negli anni '80 o '70, è stata da Rall paragonata con le tracce sperimentali. Quello che vedete qua è registrazioni sperimentali fatte da qualcuno che nei motoneuroni del midollo spinale del gatto registrava il soma e vedeva diverse forme d'onda. Rall le ha normalizzate, cioè ha messo la loro ampiezza... ha fatto in modo che dividendo per l'ampiezza di ogni picco, che fosse sempre la stessa, e quindi si è accorto di due cose. La prima è che la forma cambia e parecchio, notevolmente; sembra non essere semplicemente un fattore di scala, sembra essere un filtraggio. Quindi i dendriti filtrano (l'abbiamo visto prima, sappiamo addirittura che sono filtri passa-basso, ok, di un tipo un po' strano perché abbiamo anche una componente spaziale e l'abbiamo visto con l'analisi AC).

E ha potuto paragonare la cosiddetta *half width*, la larghezza, e il tempo al picco e plottare — questi sono i triangolini — la misura in un esperimento e paragonarli con la linea tratteggiata che è la considerazione che abbiamo fatto prima. Lui aveva l'equazione, la soluzione nel transitorio, e ha potuto dire: “Boh, ho questi risultati sperimentali? Tornano?”. E la risposta è sì: questi punti si allineano perfettamente su questa curva teorica.

E il *take-home message* è questo qua: che le sinapsi distali non soltanto si attenuano ma si hanno anche, diciamo, si spanciano, si ha un filtraggio. E questo è particolarmente importante per l'attenuazione e lo spanciamiento, per quello che è l'effetto sul Soma. Se io sono spanciato e sono per esempio una corrente che sta viaggiando nel dendrite e entro dentro il Soma, magari sarò più

bassa, però l'area sottesa (corrente per tempo) è la carica, quindi potrei avere un effetto diverso a seconda della mia forma.

Ovviamente resta il problema del quando, del *timing*. Se io ho un input sinaptico molto vicino al Soma, l'eventuale *recruitment*, l'eventuale evocazione del potenziale d'azione può avvenire nell'arco di poco. Se ce l'ho distale il picco avviene comunque in ritardo. Di nuovo, anche dal punto di vista della plasticità sinaptica dipendente dal tempo, queste considerazioni sono nello stesso ordine di grandezza come per il potenziale che si backpropaga nei dendriti; anche questi che sono input sinaptici che si propagano direttamente dai dendriti al soma hanno un ritardo che forse è paragonabile con quelle che sono quelle scale di tempo della plasticità.

Democrazia dendritica in CA1 e sommazione spaziale e temporale

C'è un'eccezione a questa regola, perlomeno dal punto di vista dell'attenuazione (lo spanciamento, il filtraggio è inevitabile), ed è stato scoperto pochi anni fa in una popolazione di neuroni piramidali dell'ippocampo. Questa eccezione è chiamata **democrazia dendritica**.

Quindi il caso normale è che se voi avete un input lontano e un input più vicino, distale o prossimale, al soma l'input distale risulta molto attenuato oltre che spanciato, mentre l'input prossimale risulta un pochino attenuato e un pochino spanciato, ma meno. Quindi in qualche modo quanto più sei distante, tanto meno presto attenzione a quello che dici, perché al Soma, sito prossimo, vicino a dove viene generato il potenziale d'azione, sono poco depolarizzato da un input lontano. Però in questa classe di cellule è stato trovato che in periferia l'input distale era proporzionalmente molto più elevato, cosicché nonostante l'attenuazione si chiama elettrotonica — che è quella che abbiamo descritto con l'equazione del cavo, ha a che fare con il tono elettrico di quello che si pensava essere un fenomeno meccanico, ma in realtà è un fenomeno puramente elettrico e ha a che fare con il cavo — a parità di attenuazione elettrotonica, input distali o prossimali di fatto hanno come picco, come ampiezza, praticamente la stessa quantità. Vedete però che qui il rosso comunque è spanciato, però partiva più ampio, quindi alla fine l'ampiezza è uguale.

Questo è un grafico importante che ha riassunto questo fenomeno in cui se voi guardate nel dendrite in punti diversi... quindi ciascuno di questi, allora questo è lo spazio in cui la distanza dal soma, 0, 100 micrometri, 200 micrometri, 300, 500 micrometri, dove avete una sinapsi. Se avete una sinapsi qui e avete la fortuna di mettere un elettrodo qui, vedreste che la sua attivazione causa una depolarizzazione molto più grande di quella che causa qui quando avete una sinapsi qui. Invece l'elettrodo piazzato al Soma, che non cambiate mai, dovrebbe mostrare un'attenuazione, dovrete vedere una curva esponenziale $e^{-x/\lambda}$ perché questo è lo spazio, se è distante più attenuo; in realtà vedete piatto, quindi è come quello che viene stato chiamato democrazia perché tutti hanno una stessa voce, una voce equivalente per far sparare il Soma presumibilmente.

Non è chiaro se questa cosa qua sia una cosa specifica di alcuni... allora sembra che sia così nelle cellule CA1, cellule piramidali della zona CA1 dell'ippocampo e non sia così in corteccia. C'è un motivo perché questo è così? È una specie di effetto dell'evoluzione per compensare quella che è un bug, un'attenuazione

elettrotonica? “Io avrei voluto che il neurone fosse un punto in cui tutti gli input sinaptici avessero avuto peso uguale, invece ho dovuto per motivi genetici, molecolari, esprimere queste ramificazioni che però non mi rappresentano, non mi sento un dendrite arborizzato”. Ergo faccio sì che quando una sinapsi viene stabilita, il numero di recettori post-sinaptici che vengono inseriti distalmente o prossimamente sia diversa. Ne metto molti di più a lontano e pochi da vicino, cosicché se c'è per esempio la stessa quantità di neurotrasmettitore, questi fanno molta più depolarizzazione distale e compensano l'attenuazione.

Un altro concetto che voglio dirvi prima di concludere questa parte è concludere la parte di potenziali extracellulari, che sarà di nuovo relativamente qualitativa, si baserà sulla presentazione di simulazione al calcolatore, di studi di simulazione, è il concetto di **sommazione temporale e spaziale**.

La **sommazione temporale** dovreste averla orecchiata con la storia dell'università che mi paga lo stipendio, delle famose “code”; qualcuno di voi nelle interruzioni ha continuato a usare il termine che ho usato io del fatto che quando un evento — in questo caso un IPSP, un potenziale sinaptico eccitatorio, potrebbe essere inibitorio — quando arriva prima che la coda non si sia del tutto esaurita, si somma, c'è una somministrazione nel tempo. Non è una sorpresa, questo ha a che fare col fatto che l'equazione di bilancio della carica, $CdV/dt = \dots$, alla fine è un accumulatore, è l'equazione di un condensatore, capacitore, che accumula. Se integro ambo i membri CdV/dt o che V uguale all'integrale della corrente... l'integrale vuol dire somma. Quindi se ho un neurone che riceve quattro afferenze, quattro assoni con ciascuno un terminale sinaptico, indipendenti... questa è una brutta, magari con il vostro aiuto posso fare un grafico più carino, perché non sono IPSP, avrei potuto farlo EPSP... anziché essere un unico evento di attivazione presinaptica, sono quattro eventi molto ravvicinati, dato che ogni evento si somma alla coda precedente che non era ancora esaurita, si ha una depolarizzazione progressiva.

La stessa cosa avviene quando avete input sinaptici che avvengono in punti vicini dello stesso dendrite, in prima approssimazione, quindi non è una somministrazione nel tempo, ma è una **sommazione nello spazio**. E anche qui non è particolarmente complicato da sviluppare un'intuizione, anziché avere una pipetta in un punto, o più pipette se volete, o più sinapsi, e per pura linearità di quell'equazione vale la sovrapposizione degli effetti. Cioè la risposta alla somma degli input a questi è la sovrapposizione delle singole risposte che si hanno quando i singoli input vengono somministrati indipendentemente. Quindi anche lì c'è una decomposizione dovuta alla, se volete, una somministrazione spaziale, ma lì la somministrazione spaziale continua a valere perché l'equazione è lineare.

Questo è il grafico che probabilmente potrebbe illuminarvi maggiormente. Questi grafici, queste curve viola, ciano e verde, sono le risposte in un cavo infinito a un'iniezione di corrente in punti diversi. Vedete: qui l'iniezione è a zero, qui l'iniezione era a meno tre... non sono un genio, vedo dove è il picco... in questa condizione di dendrite è solamente passivo, quella è l'unica spiegazione, avevo un elettrodo o un input lì. Una corrente che nello spazio era una Delta di Dirac per esempio centrata lì, questa era centrata a 3 e aveva un'ampiezza più piccola, quindi queste singole curve sono quelle che ottengo iniettando nel cavo una di queste correnti alla volta, indipendentemente, le altre le metto a zero. Quando le inietto tutte assieme, la risposta — o numericamente, o

analiticamente, oppure semplicemente con questa euristica che è corretta, perché l'equazione del cavo è un'equazione lineare — la ottenete come una sovrapposizione, quindi una somma punto per punto delle tre curve. Quindi questo è il grafico che uno ottiene dalla risposta alle tre correnti simultanee.

Volevo farvi vedere l'ultima di queste simulazioni in cui ho... questo è solo nel tempo, però c'è la componente spaziale. Queste sinapsi sono in una posizione remota, sono tante sinapsi che sono in una posizione remota e dimostro con questo il fatto dell'attenuazione e il fatto della sommazione spaziale. Quindi al dendrite distale, 414 micrometri, sto attivando queste sinapsi e vedo questi EPSP che sono molto grandi; laggiù sono grandi e hanno queste code. Mentre in nero vedo la depolarizzazione del Soma. Se aumento la frequenza di questi eventi — anziché 30 Hz, 50 Hz, 70 Hz, 90 Hz — vedo che progressivamente anche il Soma si sta alzando, si sta mantenendo una depolarizzazione. Perché? Perché ciascun nuovo evento arriva quando la coda di quello precedente non è ancora esaurita.

C'è un piccolo *catch* rispetto alla cosa del singolo compartimento del mio stipendio, dell'università che mi paga lo stipendio, e che vedete che se questo vale molto bene nei dendriti, nel Soma, che c'è un cavo di mezzo, le cose sono un pochino diverse: c'è un'attenuazione, potrebbe anche essere che non riesca a far sparare il neurone. Ok, qui in questo caso lo faccio sparare. Quindi qui è un esempio di sommazione spaziale messa anche con l'attenuazione.

Di nuovo, spero che qualcuno di voi possa essere curioso e dire: “Ma se io ho una frequenza più bassa, ma inizio ad aumentare in modo notevolissimo l'ampiezza dell'input sinaptico in remoto, quindi faccio diventare questi impulsi molto più grandi... com'è che non spara il neurone?”. Scusate, ho sbagliato. È questo lo slider. Qui sparano. Ok, qui spara sempre. Quindi, a una certa frequenza, un'ampiezza bassa, ok... per esempio così, non so se può o non tornare a voi, che nonostante io stia aumentando l'ampiezza delle sinapsi... ok, qui alla fine sta funzionando, quindi ok, non lo posso fare. Quello che volevo verificare, ma non sto riuscendo a trovare la combinazione di parametri, è che esiste un fenomeno di **saturazione sinaptica**, per cui anche se voi aumentate tantissimo l'ampiezza sinaptica, non necessariamente sul Soma avete un effetto proporzionalmente elevato. Però questa è un'altra cosa, non è cruciale.

Shunting sinaptico e spine dendritiche

Questo è l'aspetto, l'ultimo, che conclude questo capitolo, è un aspetto leggermente controintuitivo. Se vale la sommazione spaziale, forse c'è ancora un paio di slide dopo... se vale la sommazione spaziale, allora se immaginate di avere degli input sinaptici eccitatori e inibitori sulla stessa arborizzazione, sullo stesso ramo o su rami diversi, potreste immaginare che al Soma possa avvenire una specie di somma algebrica degli effetti. Quindi non è più nel tempo e nello spazio; il neurone si è evoluto con queste arborizzazioni per massimizzare la superficie, ma di fatto è come se si comportasse come una sfera.

La cosa interessante è che in alcuni casi non c'è necessariamente una sommazione spaziale lineare, una sommazione **sottolineare** (*sublinear*). Questo avviene per il fatto che le sinapsi hanno una particolare caratteristica di essere — forse l'ho già ripetuto alla nausea qui — di essere degli **input di conduttanze**. Quindi

qui c'era scritto:

$$I_{syn} = g_{syn}(t)(V - E_{syn})$$

e poi c'era anche $1/R_m$... Ma è questa cosa qua su cui mi soffermo. Non è che quando una sinapsi si attiva c'è un'iniezione di corrente; cambia anche la conduttanza.

Potete immaginarvelo — e questo è abbastanza facile da immaginare — che l'apertura dei canali porta, in una struttura fatta a cavo, alla perdita, quindi cambiando la resistenza transmembrana totale. Quindi questa resistenza transmembrana in qualche modo qui è moltiplicata dalla conduttanza sinaptica. Se la conduttanza sinaptica aumenta, in qualche modo cambia o scombina le proprietà elettriche transmembrana: rende cioè la membrana più *leaky*, meno resistiva.

Questo fa sì che se voi applicate soltanto, accendete soltanto queste tre sinapsi di stimolo eccitatorio (questo è un *cartoon*, non è una simulazione accurata), oppure le attivate quando c'è sia l'eccitazione che l'inibizione... in questo caso avete ammazzato l'effetto, avete ridotto notevolmente l'effetto dell'eccitazione. Cosa che sembra invece non avvenire qui, in cui avete due *branch* distinti. Qui, se fosse semplicemente una somma algebrica di correnti, anche qui dovrete avere lo stesso effetto. Quando accendete eccitazione e inibizione, l'inibizione dovrebbe sottrarsi dall'eccitazione, ma l'eccitazione non è sottrattiva. L'eccitazione e l'inibizione sono degli input moltiplicativi (o meglio divisivi); qui moltiplicano per la variabile di stato, non è più corrente. Se sono io che inietto una corrente, allora sì, è una corrente che è algebrica, che si somma se la corrente è positiva o negativa; ma le sinapsi sono diverse, hanno un effetto di cambiare la conduttanza.

Questo per esempio si vede qui, viene da un articolo molto importante di qualche anno fa, in cui in particolare input provenienti dalla corteccia auditiva, o meglio dalla periferia del sistema auditivo, i ricercatori hanno speculato che fosse dipendente dalla loro attivazione simultanea. Se voi avete soltanto input dall'orecchio sinistro e avete l'attivazione di questi due input, visto che questo è un cavo, avete paradossalmente un effetto opposto, non c'è una sommazione. Se volete, l'attivazione di quest'altra sinapsi... immaginate che questa sinapsi faccia veramente scorrere una corrente. La corrente andando qui, se questa sinapsi si attiva, ci sono dei canali ionici, dei recettori post-sinaptici che sono dei canali ionici (per esempio recettori ionotropici) che si aprono, quindi la corrente qui trova un passaggio ed esce oltre che proseguire, quindi è molto più attenuata. Questo è un effetto strano, controintuitivo. Se invece attivo una sinapsi solo dalla parte sinistra e solo dalla parte destra, quindi come qui, che sono su *branch* diversi, ottengo per esempio un'integrazione, una sommazione. Non ottengo questo effetto che viene anche chiamato **shunting** (*effetto di shunting*). Credo che in elettronica *shunting* o *shunt* voglia dire mettere a massa, voglia dire una connessione... credo lo *shunt* cardiaco, mi aiutate voi, voglia dire fare una specie di bypass. Quindi *shunting* vuol dire che alla fine è come se io sto mettendo a massa, mi liquido, mi faccio dissipare quelli che sono dei segnali elettrici che altrimenti avrebbero invaso questa parte di questo ramo in modo normale, come atteso.

Ci sono altre due cose che voglio dirvi. La prima è che normalmente, soprattutto — o meglio quasi la totalità — delle sinapsi eccitatorie non arrivano nei dendriti

sulla parte laterale cilindrica del dendrite, ma vengono stabilite su una struttura dedicata che si chiama **spina dendritica**. Questa è pur sempre una parte post-sinaptica e la sinapsi si abbraccia a questa specie di pomello, quindi è più un afferrare da parte del bottone sinaptico la spina dendritica piuttosto che il bottone sinaptico che tocca il corpo nudo del dendrite. Ci sono anche quel tipo di sinapsi (le sinapsi inibitorie sono così, alcune sinapsi eccitatorie sono pure così, nel Soma ci sono sinapsi così, ci sono anche sinapsi che sono nell'assone, insistono sull'assone), ma nei dendriti delle cellule piramidali, delle cellule eccitatorie principalmente, c'è questa struttura.

[Image of dendritic spine structure diagram]

E questa struttura, anche se non entriamo nel dettaglio, ha una caratteristica di essere una specie di piccolo cavo e di avere una strozzatura qui, anche se io non ricordo nulla della storia dell'equazione del cavo... posso pensare che qui dal punto di vista elettrico avere una strozzatura, un diametro molto molto piccolo, potete pensare alla costante di spazio che diventa molto piccola, potete pensare semplicemente che dal punto di vista di un restringimento notevole ho una resistenza assiale molto alta qui, perché faccio difficoltà se sono uno ione a entrare dentro.

Questo oggetto funziona quindi come una specie di amplificatore. Se io qui inietto una corrente, visto che qui la resistenza è molto elevata ($V = R \cdot I$, R è elevato), V sarà molto grande rispetto che iniettare una corrente sulla parte nuda del dendrite.

Ha un altro effetto: il fatto che se qui ci sono delle correnti calcio, aver fatto un compartimento che è pressoché isolato (perché questa è una strozzatura in cui pochi ioni possono attraversare), quando andate a misurare questo con metodi ottici — quindi il potenziale elettrico viene... quindi questo è il potenziale elettrico, vedete che è attorno a 1 mV, un EPSP di 1 mV — quando andate a misurare nel tempo la concentrazione del calcio, vedete che dentro la spina dendritica questo sale in modo notevole. Qui è una misura differenziale, quindi non è assoluta, non so quanti micromolare il calcio è andato su, ma vedete che nel dendrite, poco lontano, il calcio non si è assolutamente alterato. Di nuovo, se ho dei meccanismi di plasticità sinaptica, una struttura del genere mi permette di localizzare solo a questa sinapsi un qualche fenomeno che potrebbe essere calcio-dipendente. La plasticità STDP, *spike-timing dependent*, ha una dipendenza notevole dal calcio che è portata dal potenziale che si retropropaga (forse), è portata dall'attivazione del calcio, di canali calcio qui (forse), comunque sia in entrambi i casi è l'aumento dovuto all'attivazione di questa spina dendritica è locale per le concentrazioni ioniche. E quello che avviene è che la depolarizzazione è molto anche questa amplificata rispetto a quello che sarebbe se la sinapsi fosse sullo stesso *shaft*.

Dendriti attivi, Calcium spikes, BAC Firing e Modello di Rall

Comunque, questo non è solamente un *glimpse*, uno sguardo a questo tipo di descrizione, che di nuovo usa in qualche modo strumenti che sono legati alla conduzione elettrotonica e alla teoria del cavo. C'è un ultimo fenomeno che vi dico rapidamente prima di fare la pausa, è legato alla presenza di conduttanze voltaggio dipendenti nei dendriti, a un particolare punto dei dendriti apicali di

un particolare tipo di neuroni piramidali della corteccia. Quindi in questo caso il dendrite non è passivo; se lo volessi simulare dovrei modificare l'equazione del cavo e farla numericamente, e lo posso fare, lo potete fare voi in 5 minuti con NEURON e Python.

Quello che è stato visto sperimentalmente è che, visto che in questo punto, lontano dal Soma, esistono correnti voltaggio-dipendenti — in particolare sono correnti calcio voltaggio-dipendenti, e se vi ricordate le correnti calcio sono anche loro come il sodio: si attivano... quindi innanzitutto il calcio extracellulare è più abbondante del calcio intracellulare, quindi se ci sono dei canali che si attivano, depolarizzano la membrana localmente, come il sodio (vi leccate il sudore salato), anche qui il calcio fuori è molto concentrato. Quando un potenziale d'azione si retropropaga, in qualche modo interagisce con questa parte e può generare quello che viene chiamato un **Calcium Spike**, uno spike al calcio, perché qui ci sono delle conduttanze che creano una depolarizzazione aggiuntiva. Quindi è come se in queste cellule esistano due siti di integrazione o di emissione di spike: uno è quello somatico — in realtà nella parte iniziale dell'assone — in cui sono spike al sodio, e un altro dendritico in cui sono spike al calcio.

E vedete nella traccia blu, questa blu, gli spike sono quasi come potenziali d'azione cardiaci: non c'è una inattivazione, sono una roba, un “blob”. Questo blob però è sufficiente quando viene evocato — quindi viene evocato da un potenziale d'azione che si retropropaga — e una volta che c'è questo eccesso di questa depolarizzazione non lineare, se volete (perché c'è un'apertura di canali e un influsso, una elettrogenesi, cioè una generazione di una corrente ionica), questa corrente ovviamente si propaga sia in su che in giù e invade il Soma. E in alcune condizioni questo “ping pong” fra Soma (quando spara invade i dendriti) e i dendriti (si attivano e ulteriormente di riflesso generano una ulteriore cascata di depolarizzazione al Soma), ma insomma potrebbe decidere di sparare ulteriormente.

Quello che viene chiamato *Backpropagating Action Potential activated Calcium spike firing*, **BAC Firing**. Adesso sorvolo sul fatto dell'interpretazione come un meccanismo di detezione delle coincidenze fra input somatici e dendritici. Mi basta solo lasciarvi nella testa — e facciamo la pausa fra qualche secondo — che se ho delle conduttanze attive nei dendriti, le cose possono essere molto più interessanti e complicate. In questa direzione c'è tanto da fare, da creare un ping pong in cui se per caso questo riesce a sparare, quindi immaginate che debba essere raggiunta una certa soglia nei dendriti, e questo è sufficientemente... il firing somatico è sufficientemente in grado, come frequenza ripetuta (le famose code), di rendere i potenziali che si backpropagano nei dendriti sufficientemente grossi — e uno che si somma nelle code del precedente — da creare questa depolarizzazione, qui l'attività del soma di riflesso persiste di più.

Quindi quello che normalmente sarebbe stato un *burst*, un'emissione di un singolo potenziale d'azione, diventa un *burst* di 3, 4, 5 spike. È rappresentato qui, e qui in effetti non ci sono spike aggiuntivi, c'è questa gobetta che viene chiamata *after depolarization*, una depolarizzazione dopo. Se questa gobetta fosse ancora maggiore ci sarebbe uno spike in più. Ho “gratis”, ripeto, sul dendrite un meccanismo che mi permette di amplificare — e su un singolo compartimento non lo farei — la frequenza di sparo di un neurone. Se sparo una sequenza di 4-5 potenziali d'azione ne avrò 2 o 3 in più, e questi 2 o 3 in più sono dovuti al

fatto che ho questo meccanismo dendritico. Mi fermo per 10 minuti. Grazie.

(Pausa... Riassunto breve di interazioni tecniche... Ripresa della lezione).

Questa cosa dell'elettrogenesi dovuta alle correnti calcio nei dendriti apicali delle cellule piramidali dello strato 5 fa sì che la conduzione qui, o l'integrazione, non sia lineare. Mentre prima con l'equazione del cavo (che continuo a indicare lì sulla lavagna) di fatto è un pochino diverso, però continua a essere un condensatore, è un condensatore sia nel tempo che nello spazio. Laddove io vedo un'equazione differenziale con una derivata e al secondo membro... alla fine è l'equazione di bilancio della carica, ma distribuita nello spazio: penso a un accumulatore.

Un accumulatore, se io ho un input — esattamente la storia delle code dell'università che mi paga lo stipendio — se la frequenza di pagamento dello stipendio fosse aumentata, magari mi aspetterei che la risposta fosse lineare a un certo punto. Non mi ricordo se due settimane fa vi ho fatto vedere — credo di sì — anche che nel caso allo *steady state* dinamico, l'ampiezza di quel sali e scendi (se prendete il picco, la parte in basso, la parte in mezzo), comunque tende a crescere proporzionalmente con la frequenza, come uno si aspetterebbe. Quindi quanto più l'attività è frequente, tanto più ho queste code che... quindi una specie di *build up* sulla coda precedente è un comportamento che in ampiezza è proporzionale alla frequenza.

Tuttavia, il fatto che qui, quando avete una particolare depolarizzazione, qui avete di fatto... è come se aveste una generazione di uno spike, quindi dal punto di vista dell'ampiezza, il fatto di avere questa elettrogenesi distale — quindi in punti lontani dal Soma — fa sì che il comportamento che sarebbe lineare diventa **sopralineare**, esplosivo e ancora più ripido. Perché a un certo punto, a una certa frequenza, i potenziali d'azione che si backpropagano dal Soma al dendrite contano e contano in maniera ulteriore, perché ho qui, solo qui, delle correnti calcio-voltaggio-dipendenti.

Vi faccio vedere questa curva che è stata ottenuta anche sperimentalmente da **Matthew Larkum**, che adesso è professore a Berlino ed è — forse l'ho menzionato prima — è uno dei primi che è stato in grado negli anni '90 e 2000 di mettere diverse pipette nello stesso dendrite ed è un musicista, è un violinista, quindi la manualità è ovviamente ragionevole ed è comprensibile che sia da un musicista. Ha fatto vedere che di fatto in posizioni remote, questa è la concentrazione di calcio, l'integrazione sembra essere non solo sopralineare ma sembra essere **sigmoidale**.

Questa cosa delle sigmoidi... quindi vuol dire che c'è un qualche, anche se il calcio... lasciate perdere che sia la concentrazione di calcio, c'è una sigmoide qui e c'è sicuramente una sigmoide dove c'è il punto in cui vengono generati potenziali d'azione sodiodipendenti. La chiamo sigmoide qui perché vi ho raccontato della curva frequenza-corrente. Quanto più la corrente è ampia, tanto più frequente è. Quindi c'è un valore minimo della corrente di ingresso sotto la quale l'uscita è piatta, dopodiché inizia a salire e poi in qualche modo satura (vedi il periodo refrattario assoluto); non continua ad andare alle stelle, a un certo punto satura.

Nel contesto del *machine learning*, quante più primitive avete biologiche simili a sigmoidi, tanto più avete quello che i *machine learner* chiamano potere di

rappresentabilità (*representability*) per uno sviluppo in serie di kernel, di funzioni elementari che sono non lineari, le sigmoidi. Quindi questa cosa qua ha destato molto interesse perché il fatto che ci sia una sommazione sopralineare potrebbe indicare che questo oggetto si comporta come due unità, non una. Non è un percettore in cui qui si sommano le cose e qui si ha un'emissione. I dendriti sommano, qui c'è un'integrazione, quindi una soglia, e il risultato di quest'operazione di soglia — quindi alla fine il percettore è solo nei dendriti attivi — questo viene dato in pasto al soma e per esempio all'integrazione che fa su dendriti prossimali e input somatici.

Quindi tutto questo potrebbe far pensare: “Aspetta, se pensavi che il cervello funzionasse come... non un *Transformer*... ma come una collezione di unità sigmoidali tipo *deep learning*, *deep architecture* per via della caratteristica gerarchica dei vari *layer*, le singole unità sono i neuroni... potrebbe anche essere che un neurone ha come modello equivalente, come concetto equivalente, due unità, non una”. Inoltre vi menziono che c'è uno studio molto interessante di diversi anni fa, ripreso diverse volte ed espanso negli anni, di una ricercatrice molto in gamba che sta a Creta (non è l'università di Creta, è l'istituto FORTH), si chiama **Panayiota Poirazi**, che ha dimostrato che se voi prendete un neurone con un cavo, quindi spazialmente esteso, questo fa la stessa cosa di una rete di percettori con un *layer* nascosto. Quindi un neurone solo, con tanti input, è una rete neurale, un neurone. In tempi recenti, **Idan Segev** — lo stesso che vi ho menzionato — ha pubblicato un articolo molto interessante in cui, di nuovo, dice un neurone è equivalente a una rete *deep*. Poi che cosa questo significhi per la cognizione, memoria, per le emozioni, per la coscienza, questo è un altro discorso; perlomeno sembra suggerire che dal punto di vista biofisico ci sia un substrato che “risuona” computazionalmente con qualcosa che stiamo iniziando a — se non altro — sfruttare (comprendere è una parola grossa nel caso del machine learning, non sempre capiamo perché funziona). Comunque, questo argomento non lo trattiamo.

Vi voglio solo far pensare che quando ci sia una struttura arborizzata con dei punti di *branching*, delle diramazioni (non so come si dica in italiano, “i branching”, delle diramazioni), la possibile soluzione dell'equazione del cavo è assolutamente possibile pur di raccordare... in questo caso vedete che qui il raggio di questi due figli è diverso dal raggio del dendrite padre, dovete raccordare le condizioni al contorno dicendo che qui deve esserci una conservazione della corrente, quindi la corrente uscente o entrante qua deve essere la somma delle altre due. Questa cosa funziona molto bene ed è molto semplice da implementare in un simulatore numerico come quello di NEURON. Si dimostra che esiste una qualche tipo di relazione, un qualche tipo di coefficiente che dipende dalle relazioni dei raggi, i raggi dei *branch* figli rispetto al raggio del *branch* padre. E se sono in una particolare relazione, che non vi sto a commentare... se il padre è uguale alla somma dei figli per quello che riguarda il raggio... in realtà è la radice del cubo del raggio deve essere uguale alla somma delle radici dei cubi dei raggi dei figli, perché è così:

$$d_{padre}^{3/2} = \sum d_{figli}^{3/2}$$

Rall ha dimostrato che un modello in cui avete un singolo Soma e un singolo Dendrite è equivalente dal punto di vista di sedersi al Soma — attenzione: solo

dal punto di vista di sedersi al Soma — a un modello invece arborizzato quanto volete, purché i rapporti dei raggi padre e figlio (anche multipli con tante diramazioni, non importa) purché funzioni questa legge, con un’arborizzazione complicata. Quindi se io ho un input sinaptico su questo *branch*, in questo modello che sembra complicato dal punto di vista geometrico... se vale questo (e più o meno nel caso biologico vale questo), posso calcolare al soma lo stesso effetto che a parità di distanza lineare avrebbe lo stesso input sinaptico in un modello in cui ho un *ball and stick*, ho un unico dendrite. Chiaramente il neurone è vero, c’è un sacco di dendriti, c’è un sacco di arborizzazioni, ma questo lo faccio quasi a occhi chiusi. Mentre l’arborizzazione devo pensare del raccordo eccetera. Se la geometria lo sostiene, allora c’è un’equivalenza. Questo è quello che viene chiamato il **Modello di Rall**. Quindi quando si parla di modello di Rall si parla anche del modello *ball and stick*. Palla e stick, bastone.

Ok, fuori dai piedi questa parte della descrizione spaziale delle proprietà del singolo neurone.

Conduzione di Volume e sorgenti di corrente

Nota: questo era essenziale perché mi serve che in ogni punto della morfologia del neurone io sappia quali sono le correnti e il potenziale, o perlomeno le correnti, perché intuitivamente vi ho detto che posso capire cosa succede allo spazio extracellulare trattandolo come un **volume conductor** (un conduttore di volume) soltanto se riesco a formalizzare e a capire pozzi e sorgenti di corrente. Quindi mi serve, data un neurone incasinato a piacere, averne la descrizione. È vero, intracellulare, ma dopo che ho fatto questa descrizione intracellulare, quello che mi resta mi è essenziale con queste correnti per dire a un punto extracellulare, in questo punto qua, qual è il potenziale extracellulare.

E ovviamente è evidente che ne risenta da tutte le parti della morfologia di un neurone. Se quel punto lo cambio, lo sposto, lo sposto dall’interno della corteccia, lo metto sulla cute o addirittura magari a qualche centimetro dalla testa, ok, deve cambiare qualcosa: deve cambiare la distanza fra sorgenti e pozzi e il punto in cui misuro il potenziale extracellulare.

Quindi adesso ritorno e concludo, spero, la storia dei segnali extracellulari. Questa parte, come detto, è essenziale; quest’altra mi permette di caratterizzare in ogni punto dello spazio... in questo caso vedete il caso in cui io abbia un neurone, ma potete pensare — e la gente lo ha fatto in anni recenti, questo libro di testo è un bel esempio del culmine, del successo di questi studi — non un unico neurone, ma una rete di neuroni, anche 100.000 neuroni, e in punti dello spazio lontani andare a caratterizzare qual è... per dire qual è il potenziale extracellulare.

Perché ha senso farlo? Perché io la maggior parte delle volte, se ho un elettrodo di elettroencefalogramma (EEG), lo metto addirittura sulla cute, lontanissimo. Se ho un elettrodo che mi misura i **Local Field Potential** (LFP), lo metto magari un po’ più vicino, ma non lo metto certo nella pancia, dentro, non nell’elettrodo intracellulare. Se ho un elettrodo metallico vicino al Soma e misuro gli spike, misuro il correlato extracellulare dei potenziali d’azione, potrebbe aver senso cercare di dire: “Ma cosa sto misurando? Sto effettivamente misurando gli spike, sto misurando l’attività sinaptica, cosa sto misurando?”. Visto

che potrebbe non essere così banale desumere il potenziale a un punto data una distribuzione di correnti.

Adesso vi dico perché sto parlando di distribuzione di correnti e da dove viene questo fattore 4π e da dove viene questo σ_T che è la conducibilità del mezzo extracellulare, la corrente di trasmissione. Quindi questo modulo di $R - R_n$ è la distanza in modulo riferita a uno stesso sistema, un sistema di riferimento cartesiano del singolo pozzo o corrente il cui valore è questo I_n .

Però all'inizio del corso, oramai diverse settimane (il tempo vola quando uno si diverte), io vi ho detto che in un certo punto P il potenziale è dato da una somma pesata di cariche dove l'andamento è 1 sulla distanza. E poi c'era in mezzo un termine che era $1/4\pi\epsilon_r\epsilon_0$, perché veniva fuori dalla definizione di potenziale, quindi questo aveva a che fare con la definizione di forza di Coulomb, di potenziale elettrico e di potenziale che ne era... il cui gradiente, meno il cui gradiente, mi avrebbe dato, mi avrebbe ricondotto all'espressione del campo elettrico.

Ebbene, vi ho mentito. O meglio, vi ho mentito per scale spaziali come queste. All'inizio del corso non vi mentivo: stavamo considerando i comportamenti elettrici microscopici ai capi della membrana e lì sì che questo vale. Ma a particolare distanza non è che queste cellule sono nel vuoto; sono in una soluzione acquosa e questi oggetti che sono molecole di acqua hanno una distribuzione di carica che non è con lo stesso baricentro. Il fatto che ci siano due atomi di idrogeno e un atomo di ossigeno e sono messi in questo modo (mi pare che l'angolo qui sia a 105 gradi, sono reminiscenze, cose che dovrei rimuovere dalla testa) fa sì che esista un centro di massa della carica positiva diverso rispetto alla carica negativa.

Quindi posso pensare — com'è, come avviene — che questi **dipoli**, che vengono chiamati dipoli, queste molecole di acqua, vadano a schermare... supponete quindi H è positivo, queste sferette blu sono negativo... vadano a creare uno strato di idratazione neutralizzando la carica. Quindi questa formula, benché sia corretta, non è facile da utilizzare per distanze macroscopiche. Macroscopiche vuol dire non nanometri, ma micrometri, decine o centinaia di micrometri, qualche millimetro se vado all'esterno della corteccia. Non che sia sbagliato in sé. Ho un'altra slide dove ci sono tre sketch che dovrebbero chiarire ulteriormente questo punto. Non è che vi ho mentito: in quel contesto era appropriato. Quindi nel caso in cui ci muoviamo a distanze macroscopiche dovrei considerare l'effetto di questi... di scudo, di **shielding**, dipoli di acqua. E questo modifica questa espressione in un modo noto con degli esponenziali per ciascun termine, quindi non è solo la dipendenza 1 diviso la distanza della carica. Qui c'è il punto in cui voglio calcolare il potenziale, questa è la distanza, 1 diviso la distanza non basta: a una certa distanza vale anche un termine e^{-r/λ_D} , una certa, se volete, costante di spazio che si chiama **raggio di Debye**, una distanza di *shielding*. Ed è dell'ordine di un nanometro.

Potete immaginarvi quindi che se sono sotto il nanometro, ok l'esponenziale sta un pochino, ma se sono a qualche decina, centinaia di micrometri, questo è già andato, è a zero, quindi non c'è più nulla, non vedo più nulla. Sono così distante che i dipoli dell'acqua hanno neutralizzato qualunque effetto. Quindi: uno, se sono a distanze maggiori del raggio di Debye, me lo scordo di usare

questa trattazione. Inoltre, mi devo scordare una trattazione che ha a che fare con le cariche se sto considerando dei tempi, delle scale temporali, che sono di qualche millisecondo. Perché vi rammento che quando abbiamo considerato, definito la mobilità di uno ione in un mezzo acquoso, abbiamo scritto la legge della dinamica in cui l'attrito, diciamo, combinato con la massa di uno ione, generava una soluzione transitoria che noi abbiamo detto: "Guarda che praticamente è sempre allo *steady state* questo". Ma qual era questo tempo particolare? Era dell'ordine di un nanosecondo. Quindi un nanometro (questa distanza di *shielding* Debye) e un nanosecondo. Fondamentalmente questa descrizione, oltre questa descrizione, non è più adeguata e io devo convincermi, devo accettare il fatto che in queste condizioni, a questa scala temporale, a questa scala di tempi, il mezzo extracellulare è isopotenziale ma è neutro, **elettro-neutro**, e quindi isopotenziale.

Questo non è che vi ho mentito: alla nanoscala della membrana e dei canali questo valeva, perché ero potenzialmente interessato alle correnti di canale che... quindi il tempo di attraversamento di uno ione all'interno di un canale di membrana non è così più grande di un nanosecondo, potrebbe essere inferiore, e dal punto di vista spaziale non sono sopra i nanometri, se vi ricordate che la membrana è di qualche nanometro di distanza. Ma a una scala microscopica e mesoscopica (qui lui la chiama macro, ma secondo me sarebbe meglio chiamare meso, ma questo è un fatto di filosofia) questa descrizione non vale più. Tanto che alla scala microscopica noi abbiamo iniziato a parlare di concentrazione, di flussi di densità o concentrazione, abbiamo iniziato a utilizzare formulazioni elettrostatiche, Nernst, eccetera, flussi ionici, omici e non omici, equazione di... non mi ricordo più come si chiama il tizio che sostituisce la formulazione omica di una corrente all'interno di un canale di membrana... Goldman, equazione di Goldman. Se vado ancora più su una scala estesa — quindi in cui sto vedendo non il dettaglio del canale di membrana, non il dettaglio di uno spazio molto vicino alla membrana, ma sto vedendo diversi neuroni, sono a qualche micrometro — quello che conta sono le sorgenti di corrente, sorgenti e pozzi di corrente.

Nella lezione precedente vi ho introdotto in modo intuitivo, dicendo: se c'è qui una sinapsi eccitatoria che si apre, gli ioni sodio o calcio entrano dentro, svuotano il mezzo extracellulare da ioni positivi. Quindi questa corrente di risucchio è probabilmente notevole, importante per me per capire, semplicemente perché penso alla legge di Ohm. Io ho quest'idea che $V = R \cdot I$, quindi se ho una qualche corrente da qualche parte e io ho un elettrodo e vedo un potenziale, forse sto vedendo l'eco di quella corrente, dove R è la resistenza di... che varierà con la distanza, legata alle proprietà ohmiche di conducibilità del mezzo extracellulare.

Quindi viene alla fine uno dei risultati di attività relativamente recente, di studi relativamente recenti dell'arco degli ultimi 15 anni, 20 anni, è che i potenziali extracellulari possono essere compresi, in termini molto semplici, nella distribuzione delle correnti, perché di fatto sto assumendo che ci sia la conservazione della carica e quindi Kirchhoff, la conservazione delle correnti. Questo è quello che abbiamo già evidenziato. Nel caso di una morfologia, a questo punto deve essere estesa, perché vi ricordate con un *Point Neuron*, un neurone puntuale, non avevo modo di vedere questa chiusura delle correnti che, se in qualche modo avvengono extracellularmente o intracellularmente, devono chi-

udere il circuito. Quindi è stato fondamentale poter discutere e avere adesso uno strumento, anche se numerico (perché magari data la morfologia complessa e data la distribuzione di conduttanze anche attive nell'albero dendritico, lasciando perdere addirittura solo l'assone, che è un cavo con proprietà elettriche attive), io ho bisogno di avere questa descrizione in cui mi dice le correnti come evolvono e come si scambiano. Se queste correnti così lontane, quando per esempio c'è un potenziale d'azione qui, c'è una eco... ma questa eco per motivi che adesso abbiamo sviscerato e sono tutti là dentro quell'equazione del cavo... ma intuitivamente continua a essere una cosa per cui qui la membrana continua a essere *leaky* e la corrente si disperde, quindi cambia il potenziale di membrana e quindi cambia la corrente. Se io potessi conoscere come ho, come conosco (perché una volta che ho risolto l'equazione del cavo ho le correnti: se in particolare sono correnti di *leak* mi basta sapere quella che è g_{leak} e il potenziale di *reversal*, se sono correnti attive avrò bisogno anche delle variabili di stato ma ce l'ho dentro, almeno dentro una simulazione a calcolatore), la teoria della conduzione di volume permette di descrivere anche addirittura sullo scalpo la distribuzione del potenziale elettrico extracellulare.

E ha delle assunzioni. Le assunzioni sono: 1. Che tutte le correnti e i potenziali sono **noti**, oppure sono misurati (sono noti nel caso di un approccio sintetico, modellistico come quello che vi ho venduto fino adesso, o perlomeno si possono misurare). Chiaramente è impensabile pensare di poter misurare ogni singolo neurone con tante pipette (neppure se ci fosse Matthew Larkum qui potrebbe farlo con tantissime pipette in tutti i neuroni di un pezzo di corteccia dove ci sono milioni di cellule nervose). Però questa è l'assunzione: io le conosco e le conosco attraverso la teoria del cavo, l'eccitabilità cellulare, la localizzazione delle sinapsi, tutto quello che abbiamo fatto finora in questo corso. 2. Questa è un'altra ipotesi molto importante: il fatto che ci sia un certo potenziale extracellulare in un certo punto **non influenza**, non cambia il potenziale intracellulare di un neurone che è lì vicino. Quello che in letteratura viene chiamato interazioni, sarebbero altrimenti chiamate **interazioni efaptiche**; in altri termini, se io sono un neurone piramidale, sono "spilungone", ho i miei dendriti eccetera, e ne ho uno accanto, il fatto che io stia perturbando — perché per esempio ho una sinapsi che si è attivata qui, quindi qui c'è stata una qualche corrente — ho perturbato lo spazio extracellulare, qui c'è un particolare valore di potenziale extracellulare. L'altro è un neurone che sta accanto, in teoria dovrebbe un po', dovrebbe sentirlo. Posso solo invocare il fatto che il neurone si comporta un pochino come una gabbia di Faraday e quindi probabilmente l'interno è schermato, ma se dovessi parlare con uno di voi in una giornata particolarmente "no", forse mi direste: "Ma che caspita dici? Quando hai le correnti di canale, tu hai il ΔV : uno è la parte intracellulare, meno il riferimento esterno, che non posso pensare che sia isopotenziale, perché tu stesso mi dici che in punti diversi ha un potenziale extracellulare diverso". L'unica cosa che potrei dire a mia giustificazione è che probabilmente questo effetto è trascurabile. Non lo è durante — si pensa — durante un'attività patologica sincronizzata come alcune **crisi epilettiche**, in cui voi avete un blocco di corteccia cerebrale che inizia a essere sincronizzata e quindi c'è dal punto di vista extracellulare — semplicemente per una somma, una soluzione degli effetti — una quantità enorme di un *build up* del campo elettrico esterno e si pensa che anche quello contribuisca a innescare ulteriormente ulteriori crisi o alla persistenza di questa crisi. Però

per questa teoria non ci sono interazioni efaptiche. Questa alla fine è una cosa interessante perché dice: “Hai fatto la simulazione del cavo? Sicuro? Dammi semplicemente i dati che hai registrato. Non voglio fare ancora dei calcoli, tu mi dai dei dati, poi me la vedo io di mettere queste correnti, di fare il *playback* di queste correnti in punti diversi della morfologia, però non è che poi vengo dentro e dico: aspetta guarda che devi cambiare il potenziale, c’è uno spike in più”. No, quello che hai fatto, quello che viene chiamato una descrizione **forward**, perché è invocando la linearità delle leggi di Maxwell, dell’elettromagnetismo: se ho le sorgenti posso predire V , ma non torno, è solo *forward*, è solo una direzione, non torno indietro. Allora, visto che è $0V$, influenza la dinamica dell’equazione del cavo? No, è solo in una direzione e funziona abbastanza bene, il motivo per cui ve lo racconto a lezione. 3. Un’altra ipotesi è questa: il tessuto cerebrale è un **mezzo continuo**, ok, è quello che è nel titolo essere un conduttore di volume, conduttore di volume. E in particolare la conduttività del tessuto è **uniforme**, cioè non cambia nello spazio, è costante nel tempo ed è **isotropica**, cioè in tutte le direzioni se io parlo delle correnti è la stessa. E potreste essere insoddisfatti e dire: “Ma come? Hai rotto le scatole che i neuroni piramidali sono tutti allineati, ce l’hai venduta durante le prime due o tre lezioni, del fatto che quando si, in particolare come anche in questo contesto (lì era qualitativo), si misurano dei potenziali dallo scalpo, EEG o Local Field Potential, risente da questa organizzazione geometrica”. Quindi qui, proprio come nella risonanza magnetica (che forse qualcuno di voi avrà orecchiato), il fatto di avere... qui non sono fibre, non sono assoni, non sono nervi, non sono proiezioni da un emisfero all’altro... tuttavia in questa direzione ci sono dei pezzi di conduttore che sono messi allineati, quindi questa cosa della isotropia potrebbe non essere così verificata. E anche il fatto che sia un mezzo continuo, io non so esattamente che cosa vuol dire. Cioè so che cosa vuol dire qua nello spazio extracellulare, perché me lo immagino come una specie di vasca da bagno in cui ci sono io che sono un neurone ma accanto c’è solo acqua salata. Qui c’è un casino di altri tipi di cellule, fibre che passano, quindi le correnti — come d’altronde aveva anche intuito Rall — le correnti passano anche all’interno del tessuto. Quindi quello che probabilmente avviene (e la gente sta iniziando a caratterizzarlo e studiarlo) è che questo mezzo è continuo ma il valore di conduttività non è il valore che voi avreste a prendere un pochino di fluido extracellulare cerebrale e misurarlo: è un valore **efficace**. Col fatto che c’è una particolare tortuosità, col fatto che per esempio uno ione non è che ha vita semplice a passare, non è un *bulk*, non è un bagno in cui mi muovo in tutte le direzioni facilmente. Però questo esula; sono considerazioni per cercare di mantenere uno spirito critico in voi, per non farvi bere ogni cosa, o perlomeno essere molto *aware*, molto consapevoli delle ipotesi che ci sono dietro.

E per tutte queste considerazioni alla scala macroscopica vale qualcosa di simile alla **Legge di Ohm**. Il mezzo è ohmico, anche qui, ma i segnali sono forse... e se cambiano nel tempo, le proprietà dielettriche — cioè Maxwell funziona al di là del fatto della propagazione elettromagnetica, quindi radiofrequenza — per cui magari i segnali non sono così veloci da generare campi elettronici. È difficile che possiamo leggerci il pensiero perché c’è una propagazione di onde radio fra me e voi, perché i segnali variano lentamente. Però comunque variano lentamente e hanno a che fare con proprietà dielettriche, di capacità. Queste per il momento non ne tengo conto e non ne terrò conto nel prosieguo.

Voglio spiegarvi perché esce questa espressione, da dove viene, perché ho iniziato a ragionare su qualcosa che è inversamente proporzionale alla distanza in un certo punto. Chiaramente lo posso fare per punti diversi; sarà interessante farlo per punti vicino al Soma durante l'attività spiking. Lo vedo uno spike? E se mi allontano lo vedo attenuato lo spike? Ripeto, questo è nell'ambito extracellulare, quindi mi aspetto che se uno di voi parla e io mi allontano parecchio, se il mezzo è ohmico, la resistenza è maggiore, le quantità saranno attenuate. Ma cambia la forma? Quindi questo lo muoverò, il punto in cui misuro il potenziale extracellulare lo muoverò abbondantemente. Ma perché questo dipende da $1/r$ alla fine, 1 diviso la distanza da queste sorgenti o pozzi? E perché c'è questo 4π al denominatore? E perché c'è il σ_T che è la conducibilità del mezzo per correnti di trasmissione?

Per farlo vi ricordo, perché probabilmente avete visto qualcosa del genere in un corso di elettromagnetismo (se l'avete fatto), quello che è la Legge di Ohm in un conduttore, non in un filo, non in una struttura monodimensionale. Quindi non in una struttura concentrata e considero questa cosa delle sorgenti puntiformi. Qui sto prendendo un cubetto e comunque tratto per semplicità il caso monodimensionale. Vi faccio presente che normalmente l'equazione costitutiva per un resistore è scritta in questo modo: la caduta di potenziale tra questo punto e questo punto è $V_a - V_b$. Quindi quando la prendete così, allora la corrente I è uguale a questa $V_a - V_b$ diviso R .

In questo caso qui — e sarà chiaro perché, perché io sono ossessionato dal rapporto incrementale, perché la natura intrinsecamente viene a essere descritta da relazioni differenziali (il motivo di questo, come detto altre volte, non lo so, è più profondo) — se prendo un cubetto nello spazio e penso di prendere questo come punto x e questo come punto $x + \Delta x$, se il cubetto ha un certo lato di misura Δx , posso invece... invece vuol dire che devo semplicemente fare attenzione a un segno meno, ma per il resto nulla, solo vi metto in guardia che potreste essere confusi adesso per un millisecondo... scrivo ΔV come V qui meno V prima. Ripeto, lo voglio fare perché questo mi suona come già mi prepara a una qualche espressione differenziale. Qui, fra poco, ne sono sicuro, sono fiducioso, inizierò a scrivere dV/dx o dV/dr , il gradiente nello spazio. E fra parentesi il gradiente, quindi la derivata nello spazio, mi veniva comoda perché io sapevo come si scriveva il campo elettrico. Quindi se la legge di Ohm è in un conduttore di volume, forse avrò qualcosa che non è esattamente $V = R \cdot I$; magari anziché V ci sarà il campo elettrico. Adesso lo vediamo.

Quindi scritta così, prendendo questo ΔV così, la corrente deve essere presa col segno opposto, perché la corrente è positiva quando scorre in questo verso, prendendo $V_a - V_b$ (prima rispetto dopo). Sarebbe stato prima rispetto dopo, ma io ho preso esattamente l'opposto, devo essere consistente; posso fare quello che voglio, però l'equazione costitutiva la devo adattare se ho cambiato la convenzione. Quindi anziché scrivere $I = \Delta V/R$, lo descrivo in termini di conduttanza che mi piace di più, però col segno meno. Quindi questa è la prima cosa: ok, $I = -\Delta V$ è proporzionale alla corrente attraverso la conduttanza. E I alla fine (sto pensando, avendo a che fare con un volume, non è una conduttanza concentrata, ma è il risultato di una proprietà dello spazio, che chiamo conducibilità, σ_T di trasmissione) moltiplicato per la superficie di passaggio diviso Δx . Me lo ricordo perché è l'inverso della storia della resistività: la resistenza è tipica-

mente la resistività per la lunghezza diviso la sezione di passaggio. Questo non so perché me lo ricordo meglio di quello... perché capisco che quanto più è lungo un filo tanto più è resistivo, e tanto più è largo tanto meno... scusate, tanto più la resistenza è elevata a parità di resistività, e quanto più la sezione di passaggio è grande, visto che sta al denominatore, vuol dire che la resistenza è bassa. Qui è esattamente l'inverso di quello, ma non so perché, non me lo ricordo, dovrei ma non me lo ricordo.

Con questa geometria questo è il valore della conduttanza e vedete: finalmente sono contento perché ho questo Δx , ΔV e Δx . Faccio tendere Δx a zero. Prima di farlo, se volete, posso scrivere la corrente I , che qui sarebbe stata una corrente totale, come un flusso, quindi una densità di corrente se volete. Cioè questa è la corrente totale e se io so la densità di corrente devo moltiplicarla per la sezione di passaggio. Lo faccio perché mi metto nelle condizioni in cui questa S vada via. Alla fine io ho assunto, perché mi ricordavo la formula del condensatore, che esistesse una corrente totale, ma è più facile che io possa descrivere nel mezzo, come anche nel caso di un neurone, delle densità di corrente, correnti per unità di superficie. Quindi scrivendo I grande come $J \cdot S$ (qui $I_t \cdot S$), cancello S da ambo i membri, lo posso fare tanto è non nulla, e mi resta che la corrente è uguale a meno sigma t, la derivata o il gradiente di V rispetto a x , col meno:

$$J = -\sigma_T \nabla V$$

Quindi questa cosa del meno viene necessariamente da questa scelta legata alla definizione del rapporto incrementale. Ma visto che c'è un meno per il gradiente, questa cosa di meno gradiente è il **campo elettrico**, è esattamente la definizione per un campo di forze conservativo del potenziale. Il potenziale è una funzione tale che se io prendo il gradiente col meno ottengo il campo. Quindi, ok, scritto in modo elegante in un caso tridimensionale dove scrivere il gradiente, ma quello che volevo dire è che alla fine questo meno gradiente è il campo elettrico. Questa è la legge di Ohm nel caso di un volume tridimensionale.

Semplicemente per far vedere questo e continuare a ragionare alla fine con questo, alla fine con questa espressione, questa mi basta. Allora, quello che faccio adesso è prendere una corrente puntiforme e calcolare una densità di corrente puntiforme e dire che la corrente totale, prendendo una sfera di raggio dato, quindi a una certa distanza, è l'effetto che si ha moltiplicando la densità di corrente di trasmissione, la corrente di passaggio, per la superficie, la superficie di una sfera $4\pi r^2$, la superficie esterna di una sfera. Quindi la corrente I_0 dovuta a una densità di corrente J generica... di nuovo io qui purtroppo ragiono con una densità di corrente, ma se ho nel caso di un cavo, di un neurone, o le (lo tiro più giù), questi pozzi o queste sorgenti potrebbero aver bisogno di correnti totali, perché lì sono correnti totali. Quindi sostituisco fondamentalmente a J (I_t), in questa equazione qua, $I_0/(4\pi r^2)$. Un altro modo per vederlo è: se io ho in questo punto una corrente totale I_0 , per esempio dovuta a questo canale sodio che si sta aprendo o chiudendo o fa quello che vuole, per metterlo in relazione con la densità, con una densità, devo dividere per quella che è la superficie di passaggio, visto che questa corrente presumibilmente si espande in ogni direzione (visto che il mezzo è isotropo) a una certa distanza r . Ecco da dove viene fuori questa sfera, ecco da dove viene fuori questo 4π .

Scritto così, sto scrivendo $J = -\sigma_T \nabla V$ (derivata di V rispetto a r). Integro

ambo i membri. Questo è facile perché la primitiva di $1/r^2$ è $-1/r$; se io faccio la derivata di $1/r$ è $-1/r^2$, quindi questa parte qui è molto facile e immediatamente mi esce fuori il termine $1/r$, non è più r^2 . Come funzionava alla fine per le cariche? Il potenziale non sembra variare come $1/r^2$, con l'inverso del quadrato, ma con l'inverso della distanza. E da questa parte qui invece è facile perché è un differenziale esatto, quindi è tutto come prendo gli estremi di integrazione. Scelgo gli estremi di integrazione fra infinito, un punto all'infinito e un punto a r . Perché prendo all'infinito? Perché all'infinito posso dire nel *bulk* che ho l'elettrodo di riferimento dove il potenziale è per convenzione zero. Fare questa scelta mi viene molto comoda, ma qualunque altra scelta sarebbe stata possibile, perché la primitiva qui, $1/r$ o $-1/r$, quando la calcolo in r è ok, quello che è. Quando la calcolo all'infinito, vuol dire in realtà un processo di limite, ho 1 diviso qualcosa che va all'infinito e 0, quindi si semplifica anche questo termine. E ho l'espressione del potenziale, a parte dividere per σ_T che va al denominatore, e viene più e più da ambo i membri.

$$V(r) = \frac{I_0}{4\pi\sigma_T r}$$

Quindi questa cosa del meno alla fine era necessaria per riscoprire quell'espressione in cui in qualche modo mi diceva che in questo punto V mi testimonia quanto intensa sia la corrente lì. Se una corrente è presumibilmente una sorgente, quindi sta sputando qualcosa che sputa positivamente nella mia direzione, io mi divento più positivo. Quindi se non avessi fatto questo, se avessi fatto casino lì, avrei avuto probabilmente un meno e questa cosa sarebbe stata strana. Ma come? Quella corrente mi sta sputando ioni positivi, è una corrente positiva, nella convenzione dell'elettrotecnica delle correnti positive il potenziale deve aumentare e varia con l'inverso della distanza.

Per la linearità del mezzo, se io non ho un'unica sorgente, ma ho un insieme di sorgenti, e in questo caso sto pensando alla fine di discretizzare un pezzo di morfologia del neurone complicato come volete, lo discretizzo come una sequenza di piccolissime sorgenti di corrente puntiformi. Potreste obiettarmi che in effetti... e qui è tutto un cavo, perché sono diventati puntiformi? Non è che per caso c'è una descrizione un po' più accurata? Alla fine sono dei piccoli cavi, sono dei piccoli cilindri: non è che c'è una descrizione in cui anziché una descrizione sulle correnti puntiformi vale con le correnti di linea? Avreste ragione con questa intuizione, ma lo vediamo probabilmente la settimana prossima. In questo caso ogni singolo elemento ha l'effetto a una certa distanza, un effetto che si sovrappone, quindi l'effetto complessivo (volevo dire per la sovrapposizione degli effetti) l'effetto complessivo è la sovrapposizione degli effetti che i singoli elementi presi individualmente avrebbero in quel punto. Quindi dato che ciascun elemento è la corrente diviso $4\pi\sigma_T$ diviso la distanza, per la distanza, avete che il potenziale dovuto a una serie di... per esempio a un cavo, una serie di sorgenti o pozzi puntiformi, è la media pesata delle correnti pesata dalle distanze $1/r$.

Allora, lo vediamo adesso ed è l'ultima cosa che vi racconto, prima della fine. Un'approssimazione migliore è quella delle **linee di sorgente**. Per capire questa cosa qua dovreste o dovrete spendere 15 minuti a guardare come ho scelto questi assi. Sono leggermente diversi da come è la scelta nel libro di testo che vi ho consigliato e di fatto rappresentano il contributo di un piccolo cilindro (alla fine un cilindro che diventerà infinitesimo) e su un punto P mettendo però questo

cilindro in modo tale che la sua fine coincida con il punto zero di questo sistema di assi cartesiani. Non chiedetemi perché nel libro non hanno fatto così, per me così è facile, più o meno facile da capire.

[Image of Line Source Approximation Diagram]

Quello che faccio è: ho un cavo di lunghezza ΔL (per il momento ΔL è finito, non è infinitesimo) e chiamo questa coordinata x , chiamo questo punto L e chiedo qual è l'effetto di questa... questa è una corrente puntiforme perché è un anellino su quello che è tutto un cilindro pieno di correnti. Con tutte queste freccettine sto assumendo che ognuno di questi anelli, in un processo poi di integrazione di limite, di integrale, ciascuna contribuirà a suo modo in questo punto. Questa qui contribuisce su questo punto data la sua distanza. Per come ho scelto gli assi questo è facile. Questa distanza è $x - L$, perché questo è x e questa componente è L , al quadrato è Pitagora, questo, più y al quadrato sotto radice. Questa è questa ipotenusa, questa distanza qua. E una volta che avete fatto questo, alla fine è una passeggiata, per modo di dire, perché il contributo di questo anellino di corrente su questo punto, questo anellino di corrente lo chiamo ΔI ed è fondamentalmente proporzionalmente la parte che dipende da ΔL su dL su ΔL . Se questo è un decimo della lunghezza, il termine di corrente scalerà come un decimo del totale, non c'è granché altro da capire.

E in questo punto, di nuovo applico la definizione: ho I_0 per dL diviso ΔL , che è la parte di corrente, diviso $4\pi\sigma_T$ per la distanza. È brutta come espressione, però mi fa piacere che ci sia dL al numeratore, perché mi tenta di dire: “Ok, questo è il contributo di questo dL . Se voglio avere la somma di tu, quindi l'effetto collettivo, la sovrapposizione, e quindi avere il potenziale extracellulare totale, devo fare una sommatoria, oppure nel caso continuo un integrale”. Cioè devo prendere questa quantità qua, integrarla da $-\Delta L$ a 0, quindi facendo muovere questi anellini in modo tale da coprire tutta questa lunghezza. E di fatto è... quindi $I_0/\Delta L$ lo posso portare fuori, questo $4\pi\sigma$ qua lo porto fuori; quello che resta è 1 diviso questa radice di $(x - L)^2 + y^2$.

La variabile di integrazione è solo L , quindi in teoria se io mi ricordassi gli integrali potrei dire: “Ah, questo è un integrale noto, 1 diviso la radice quadrata di variabile t , $t^2 + a^2$ ”. Io questo onestamente non me lo ricordavo, lo sono andato a guardare e dopodiché ho verificato che se uno prende il logaritmo del valore assoluto e fa la derivata ottiene questa quantità. Ricordatevi: logaritmo è “1 su” e poi questo è un termine, una funzione composta, quindi dovete fare la derivata della somma e la derivata della radice con la regola per i polinomi. Ma al di là di questa cosa qua — che onestamente, visto che questa cosa qua, in particolare con Wikipedia, ChatGPT, fidatevi o non fidatevi, provate a fare voi carta e penna a vedere se questa è veramente la soluzione dell'integrale, basta fare una derivata — data un'espressione anche brutta così, in qualche modo potreste almeno dire: “Ok, da qualche parte c'è qualche matematico che 500 anni fa ha già fatto questo integrale”. Potete scrivere in questo modo una nuova espressione, che non sto a commentare più di tanto, che è brutta rispetto all'altra. L'altra era semplice, era per un termine di corrente puntiforme, era $I_0/4\pi$... era solo questo, dove qui c'era la distanza. Quando considerate una linea di corrente, una sorgente lineiforme di corrente, avete la dipendenza dallo spazio che è legata al logaritmo di questo rapporto con queste radici. È una schifezza.

Chiudo facendo il confronto. Se avete la descrizione del campo di una sorgente — quindi nel caso di un neurone vero, quindi alla fine è un'integrazione su tanti punti della membrana — una corrente puntiforme o questa corrente di linea, vedete che la differenza si nota particolarmente a distanze brevi. Qui sto scrivendo con questo *shading* di colore la descrizione del potenziale extracellulare a una distanza dell'ordine di 10-50 micrometri. Vi faccio solo vedere la slide dopo: qui lo vedete che è un po' diversa, qui è più circolare, qui è più elongata. Quindi in teoria uno dice: "Allora c'è un beneficio perché è diverso su distanze più elevate". Quindi distanze dell'ordine di 500 micrometri... sfido chiunque a paragonare queste isocline, queste curve isopotenziali extracellulari: praticamente non c'è differenza nell'aver usato un modo, quello semplice delle correnti puntiformi, o quest'altro modo delle linee di correnti. E il gruppo quindi di **Gaut** e **Einevoll** [Gaute Einevoll] ha fatto questo confronto e ha detto: "Ti faccio vedere qual è la differenza, l'errore che tu commetti se usi le sorgenti puntiformi anziché le sorgenti di linea". L'errore che fai è dell'ordine di un decimo, è già piccolo, quando ti muovi — quindi magari non è trascurabile un decimo — quando ti muovi è dell'ordine di 20-25 micrometri. Ma appena sei attorno a 50 micrometri, l'errore è dell'ordine di un centesimo. Quindi in teoria uno, dipendentemente dai casi, potrebbe dire: "Ma se io sto misurando un segnale che è 100 microvolt, ok, faccio un errore che è un centesimo. E amen".

Mi fermo qui. Ci vediamo la settimana prossima che dovrebbe essere l'ultima lezione. Grazie a tutti.

Teoria del Conduttore di Volume e Densità delle Sorgenti di Corrente (CSD)

L'ultima lezione, la settimana scorsa, si è svolta continuando l'esposizione della **teoria del conduttore di volume**, in cui abbiamo stabilito che il potenziale elettrostatico in un certo punto non è il risultato di una distribuzione di cariche, bensì di una distribuzione di sorgenti di corrente. Abbiamo visto che queste sorgenti di corrente possono essere descritte anche in un modo un pochino più sofisticato attraverso un approccio che, anziché considerarle puntiformi, le considera come **correnti di linea**. Visto che alla fine tutti gli oggetti all'interno di una rete di neuroni sono "pezzi di cavo", viene naturale considerare l'approssimazione in cui siano segmenti lineari.

Esiste ancora un'altra descrizione che forse avete sentito nominare o sentirete nel futuro: è quella chiamata della **Densità delle Sorgenti di Corrente** (o *Current Source Density*, CSD). In questo approccio, la distribuzione nello spazio e nel tempo — ma concentriamoci sullo spazio — delle sorgenti e dei pozzi di corrente non è puntiforme come ve l'ho presentata io, ma è data generalmente da una funzione arbitraria, complessa quanto volete.

Tanto per intenderci, è possibile effettuare la stessa identica trattazione matematica e scrivere un'equazione che assume una forma più complessa, diventando un'equazione che coinvolge l'operatore **Laplaciano** (∇^2), ovvero l'operatore Nabla Quadro. Questo accade quando si sostituiscono le correnti puntiformi o le correnti di linea con questa descrizione più generale della densità di sorgenti di corrente. Questa densità rappresenta il fatto che in un punto qualsiasi del volume ci sia, appunto, una densità di sorgenti. Quindi le sorgenti non sono

puntiformi.

Sto enfatizzando la parola “puntiformi” perché magari qualcuno di voi potrebbe pensare: “Ma dire puntiformi non significa forse che c’è una funzione del punto in cui la forma di questa funzione è, in questo caso specifico, una Delta di Dirac (δ) in 3D nello spazio?”. Se supponete che questo punto abbia coordinate (x_0, y_0, z_0) , spero che a qualcuno venga in mente che questo è esattamente quello che abbiamo fatto noi: di fatto, partendo (o ignorando) questa trattazione molto più generica e astratta, siamo andati subito al sodo. Dal punto di vista della descrizione delle sorgenti neuronali, noi abbiamo le correnti di canale e, dopo aver esaminato insieme l'**equazione del cavo** e aver intuito il fatto che si possa simulare numericamente una struttura arborizzata arbitrariamente complessa e accurata dal punto di vista morfologico, lì otteniamo delle correnti puntiformi.

Nel caso più generale, potrei non avere questa conoscenza morfologica dettagliata. Alla fine, si pensa a una densità di sorgenti di corrente che possa avere una forma qualsiasi; nel nostro caso sarebbe stata una collezione di Delta di Dirac o qualcosa di leggermente più complesso nel caso delle sorgenti di linea.

Il Problema Inverso e i Dipoli Ve lo racconto semplicemente con questa slide perché il concetto della CSD viene fuori nel cosiddetto **problema inverso**. Quello che abbiamo affrontato noi si chiama **problema diretto** (o *forward modeling*): è una modellistica, una descrizione quantitativa diretta in cui, date le sorgenti, si calcola qual è il potenziale extracellulare in ogni punto.

Nella realtà, molto spesso uno misura il potenziale – pensate all’Elettroencefalogramma (EEG) con diversi elettrodi sullo scalpo – e si chiede: “Quali sono le sorgenti?”. Questo è un problema inverso. Ovviamente, voi sapete che in generale, in matematica e in fisica, la risoluzione dei problemi inversi è piuttosto “tosta”; trovare qual è questa funzione tale che l’equazione sia soddisfatta può essere molto complicato, ambiguo e mal posto. Sono necessarie delle considerazioni di **regolarizzazione**, cioè delle altre ipotesi o condizioni che rendano possibile risolvere il problema.

Spesso, infatti, è necessario o utile poter inferire la presenza e il posizionamento di alcune sorgenti, anche se nelle descrizioni tipiche in letteratura e in clinica (dal potenziale elettrostatico all’identificazione delle correnti) difficilmente si parla di sorgenti cellulari singole. Si parla piuttosto di sorgenti “efficaci”, che non hanno necessariamente una corrispondenza biofisica diretta.

Alla fine di questa sezione, credo nell’ultima slide, vi farò vedere che si parla di **dipoli**. Perché un dipolo? Perché dovrebbe esserci una configurazione dipolare di correnti, ovvero una corrente che fa da pozzo e una che fa da sorgente? In qualche modo l’abbiamo detto: se una struttura è simile a queste cellule piramidali che hanno tipicamente (anche se sappiamo che non è sempre così, ma è la fisiologia da “libro di testo antiquato”) gli input sinaptici distali mentre la generazione dei potenziali d’azione è somatica, allora si crea un dipolo. Si crea una distribuzione, una separazione di sorgenti e pozzi. Quindi vedremo che il concetto dei dipoli alla fine si può recuperare.

Ve lo dico solo per cultura generale, non proviamo neppure ad approssicare l’equazione della CSD. Nel nostro caso, avendo questa densità di sorgenti la

forma di una sovrapposizione di Delta di Dirac, integrando ambo i membri farebbe sparire il secondo ordine, ritornando all'equazione che vi ho raccontato. L'integrale sul volume di una funzione che è una sovrapposizione di Delta di Dirac alla fine fa sopravvivere la sovrapposizione delle correnti, cioè delle aree delle Delta. Quindi ritrovate la stessa equazione, ma il caso più generale è questo.

Modellistica Diretta: Forma e Ampiezza degli Spike Extracellulari

Adesso e per le prossime slide, probabilmente finiremo nell'arco di quest'ora, vorrei, sulla base di questa modellistica diretta del potenziale elettrostatico extracellulare, affrontare due domande.

1. **Qual è la forma o l'ampiezza dei potenziali d'azione extracellulari?** Quelli che ho chiamato spesso *spike*. Alla fine io chiamo spike anche il potenziale d'azione intracellulare per abitudine, però tecnicamente i primi a essere misurati sperimentalmente sono stati i potenziali extracellulari. Sull'oscilloscopio si vedevano queste deflessioni molto rapide, come degli "spilli" o degli "aculei" (*spike* in inglese), e la gente continua a chiamarli così.
2. **Cosa succede alla forma del potenziale d'azione extracellulare misurato in punti distinti, anche lontani da dove si sono generati?**

Questa non è una domanda banale. Vi ho dato due settimane fa una specie di approssimazione, una formulazione di linea di massima che, se vi ricordate, era:

$$V_{extra} \propto -\frac{dV_{intra}}{dt}$$

Cioè meno la derivata temporale del potenziale intracellulare, cercando di derivare quell'espressione da considerazioni multicompartimentali.

In questo caso, esiste la possibilità (che ovviamente è solo teorica, poiché non è che per tutti i neuroni della mia corteccia in questo momento, o di quella di un paziente, ho la ricostruzione tridimensionale e l'esatta geometria) di simulare un caso semplice. Considero un unico neurone di cui so tutto e lo simulo. Simulare vuol dire risolvere, per tutti gli istanti di tempo in un certo intervallo, tutte le equazioni del cavo (anche non lineari, nel senso che ci sono le proprietà di permeabilità ionica voltaggio-dipendenti) e riesco, punto per punto, a caratterizzare quelle che sono le sorgenti e i pozzi in tutta la morfologia del neurone.

Se faccio questo per un tempo di 10, 20 o 50 millisecondi (non faccio una simulazione estesa), osservo una condizione in cui il neurone è stato inizializzato in un certo modo tale che, dopo qualche millisecondo (es. 20-30 ms), spara un potenziale d'azione intracellulare. Poi smetto di registrare; mi interessa soltanto paragonare la forma del potenziale intracellulare al potenziale extracellulare.

Considerazioni sulla Simulazione e l'Interfaccia Elettrodo Un'altra cosa che devo menzionarvi è che, se fossi io con un elettrodo simulato a iniettare corrente nel soma, quella iniezione sarebbe una sorgente o un pozzo. In questo caso specifico non la sto considerando perché, per esempio, assumo di aver inizializzato la simulazione in modo tale da rendere instabile il sistema: il

neurone deve prima fare uno spike e poi andare a riposo. Lo dico perché giustamente potreste chiedermi: “Com’è che in questa registrazione extracellulare non vedo l’eco di quella corrente iniettata con una pipetta?”. Dal punto di vista elettrostatico extracellulare, se avessi iniettato qualcosa dentro, il mio elettrodo di riferimento sarebbe stato fuori, quindi avrei contribuito anch’io al potenziale extracellulare.

Inoltre, non stiamo considerando l’**interfaccia metallo-elettrolita**. Potreste chiedermi nella pausa se i miei colleghi Gibaldi e Gibertoni trattino questo argomento. Se lo fanno, sapete che non è esattamente la stessa cosa – e noi fingiamo che lo sia – prendere un volume in cui c’è un potenziale elettrostatico e un campo elettrico, metterci un pezzo di metallo in un punto e pensare che il potenziale elettrostatico del metallo sia identico al potenziale del *bulk* (del volume) in quel punto. Ci sono considerazioni relative al materiale dell’elettrodo (alcuni si polarizzano), alla zona di svuotamento, ai doppi strati di Helmholtz all’interfaccia, eccetera. Noi non trattiamo questo aspetto: i segnali che sto simulando qui sono considerati come se ci fosse un elettrodo extracellulare ideale.

Variazione della Forma d’Onda nello Spazio Quello che vedo è che, vicino al soma, effettivamente il potenziale sembra la derivata prima temporale del potenziale intracellulare. Vi faccio notare che qualcuno di voi, la settimana scorsa o due settimane fa, sotto mio stimolo ha correttamente risposto dicendo: “Sì, più o meno il potenziale intracellulare ha una durata di circa un millisecondo”.

Quello che vedete extracellularmente ha un’ampiezza più piccola ed è la derivata. Essendo la derivata, il fatto che vada giù e poi su corrisponde alla fase di salita del potenziale intracellulare e poi al suo arresto. Arrivato al punto di massimo (dove la derivata è zero), la derivata è stata positiva, poi ha accelerato e poi decelerato. Infatti, con il segno meno davanti, il potenziale extracellulare è diminuito, ha raggiunto un valore massimo assoluto (negativo) e poi è ritornato a zero. Ovviamente, questa fase di salita è più breve rispetto alla durata totale dell’evento. Per questo, intracellularmente vedo un evento di circa un millisecondo, mentre extracellularmente lo vedo anche più stretto.

La cosa interessante è che se vi muovete in direzione **distale**, sempre vicino alla geometria del neurone, vedete che la forma del potenziale d’azione cambia. Diventa quasi bifasica. Potreste dirmi: “Ma questo non lo chiami bifasico? C’è una parte negativa e una parte positiva”. Sì, ma vicino al soma la parte positiva è molto piccola. Guardate invece cosa succede muovendosi lungo l’albero dendritico: sono sempre fuori e ho una forte transizione. Poi non la chiamo “ripolarizzazione” (mi dovrete linciare se lo facessi, perché qui “positivo” e “negativo” non hanno alcun significato storico legato alla polarizzazione della membrana). Qui è semplicemente un segnale extracellulare, e vedete che può cambiare anche parecchio, addirittura invertendo la polarità.

Oltre alla forma che diventa diversa, la polarità generale, che al soma è principalmente negativa, si inverte e diventa positiva. In questo caso distale, la forma somiglia quasi alla forma d’onda intracellulare. Questo è dovuto al fatto che, quando un potenziale d’azione viene “sparato” (iniziato), il potenziale somatico tende a essere più positivo. Quindi, nella parte extracellulare, evidentemente si

crea un “vuoto” o, se volete, una compensazione per chiudere il circuito.

Adesso avete il linguaggio corretto per descrivere questa cosa che altrimenti sarebbe solo intuitiva: fuori, vicino al soma, è rimasta una quantità negativa, ma in altri punti della morfologia, durante la prima depolarizzazione, il circuito deve essere chiuso. È per questo che, durante la stessa fase, in punti lontani avete una compensazione. Extracellularmente c'è una parte negativa nella prima frazione di millisecondi vicino alla sorgente, ma da qualche altra parte deve esserci un fenomeno positivo. E qui ce l'avete “gratis”: gratis intendo facendo la simulazione del neurone multicompartimentale con morfologia e biofisica corrette, conduttanze voltaggio-dipendenti, senza sinapsi in questo caso, e applicando la teoria della conduzione di volume.

Questa osservazione è molto potente perché permette di dire: se prendo un elettrodo e lo infilo nella corteccia di un mammifero o di un paziente tetraplegico e inizio a vedere dei segnali, che segnali vedo? Mi aspetto che siano negativi? La stragrande maggioranza delle volte sì, per i motivi che vedremo dopo. Ma non solo non è raro, anzi è quasi standard vedere anche segnali con polarità positiva. Da dove vengono? Sono presumibilmente l'eco dei potenziali d'azione, registrati però da punti vicini ai dendriti e lontani dal punto in cui si sono generati (il soma/segmento iniziale dell'assone).

Distinzione tra Tipi Neuronal: Spettro e Forma d'Onda

Un'altra considerazione importante, che va sempre in questa direzione ma da un punto di vista sperimentale o clinico, riguarda cosa aspettarsi quando si inserisce un elettrodo nella corteccia. Abbiamo parlato della polarità e della durata, ma c'è un'altra componente fondamentale descritta per anni in letteratura, spesso da un punto di vista puramente pratico.

Neuroni *Fast Spiking* vs Piramidali Alcuni neuroni, specificamente gli interneuroni GABAergici (e nemmeno tutte le loro sottopopolazioni), hanno un potenziale d'azione molto più “stretto” a causa di differenze nell'espressione e nella cinetica dei canali ionici. In particolare, mi riferisco ai neuroni **fast spiking**, che sono definiti tali perché possiedono conduttanze voltaggio-attivate con una cinetica che permette al neurone di sparare molto più rapidamente. Tanto per intenderci, hanno conduttanze potassio (tipo *delayed rectifier*) non troppo “ritardate”, ma abbastanza “arzille” da intervenire rapidamente per ripolarizzare e iperpolarizzare la membrana.

Per molti anni, uno dei pionieri di questa descrizione, **György Buzsáki** (di cui vi ho già parlato), ha insistito sul fatto che osservando extracellularmente una certa forma d'onda, è possibile distinguere fra neuroni eccitatori e neuroni inibitori guardando se esiste una sottoclasse di segnali molto più sottili.

Contenuto Spettrale e Impedenza degli Elettrodi Successivamente a queste analisi empiriche, si è iniziato a esaminare il contenuto spettrale della forma del potenziale d'azione, sia intracellulare che extracellulare. Analizzando la **densità spettrale di potenza** (PSD) – o, approssimativamente, la trasformata di Fourier – si nota che l'energia del segnale crolla drasticamente sopra 1 kHz.

Qui è importante fare un'aggiunta molto interessante. Spesso sentirete parlare delle proprietà degli elettrodi utilizzati sperimentalmente o in clinica (ve ne mostrerò alcuni nell'ora successiva) e uno dei parametri fondamentali forniti è l'**impedenza**. Voi sapete che l'impedenza è una proprietà complessa, di fatto la resistenza in regime sinusoidale. Quando vi viene detto che l'impedenza di un elettrodo è, per esempio, di qualche centinaio di $k\Omega$, vi stanno dando un numero scalare, non una funzione. Implicitamente, si riferiscono all'impedenza misurata alla frequenza di **1 kHz**.

Perché proprio 1 kHz? Perché i potenziali d'azione intracellulari hanno un contenuto frequenziale che risiede di fatto sotto 1 kHz. Se guardate la PSD di un potenziale d'azione di un interneurone *fast spiking* (quello con il segnale più rapido e sottile), vedrete che il suo spettro è più largo: a parità di frequenza avete un contenuto energetico maggiore. Questo ha senso: essendo un segnale più rapido nel tempo, il suo spettro si allarga in frequenza.

La cosa interessante è che, per passare dalla descrizione intracellulare a quella extracellulare, è necessario applicare tutta la teoria che abbiamo costruito nelle ultime lezioni (teoria del cavo e conduzione di volume) su un neurone di cui si conosce morfologia e biofisica. Anche in questo caso si scopre che, sebbene il contenuto frequenziale sia un po' ridotto, la differenza tra piramidali e interneuroni persiste. Gli interneuroni generano spike extracellulari più rapidi e, di conseguenza, il contenuto a 1 kHz è molto più elevato rispetto ai piramidali (rappresentato dalla traccia tratteggiata nei grafici di riferimento). Inoltre, l'ampiezza al picco sembra essere maggiore per gli interneuroni.

Il Problema della Separazione delle Sorgenti (*Spike Sorting*)

Tutte queste considerazioni ci forniscono strumenti fondamentali per affrontare un problema pratico enorme. In clinica e negli esperimenti, quando devo registrare l'attività di uno o più neuroni con un elettrodo extracellulare, non mi trovo mai nella situazione ideale di un neurone isolato nel vuoto. Ho un impaccamento notevolissimo di decine di miliardi di cellule. Diventa quindi complicato separare le sorgenti e attribuire i potenziali d'azione misurati a unità distinte oppure alla stessa unità.

Questo è cruciale. Se siete nella corteccia motoria e volete decodificare se un paziente tetraplegico sta pensando di muovere il braccio a destra o a sinistra, non potete confondere e attribuire allo stesso neurone tutti gli spike che state registrando. Se lo faceste, i segnali avrebbero un significato completamente diverso: quel "neurone" sembrerebbe sparare a una frequenza altissima, mentre in realtà state registrando una popolazione di 10-50 neuroni sovrapposti.

Vi ricordate il grafico che vi ho mostrato, in cui si evidenziava un'area di detezione di qualche decina di micrometri? Entro quel raggio potete rilevare segnali da molti neuroni.

Algoritmi di Classificazione Sapendo che il contenuto frequenziale e la forma sono diversi, potrei inventare un algoritmo che, osservando gli eventi, guardi simultaneamente: 1. L'**ampiezza al picco**. 2. La **durata**, spesso definita come *half-width* (la durata temporale misurata a metà dell'ampiezza massima).

Prendendo una certa *baseline* (che potrebbe essere zero, dato che questi segnali sono a media nulla dopo un filtraggio passa-alto), calcolo l'ampiezza massima in valore assoluto, prendo la metà di questo valore e misuro la distanza temporale tra i due punti di intersezione con la curva. Potrei quindi dire: “Voglio poterli riconoscere, ordinare e separare” (si dice **spike sorting**). Voglio distinguere non solo tra segnali forti e deboli, ma anche tra quelli “alti e magri” e quelli “grassi e bassi”, perché so che potrebbero corrispondere a sorgenti cellulari diverse (es. interneuroni vs piramidali).

Attenuazione e Variazione della Forma con la Distanza C'è però un problema aggiuntivo. Se vi muovete, pur restando grossomodo vicino al soma, di una distanza di 200-500 micrometri, la forma e l'ampiezza cambiano drammaticamente. In particolare, l'ampiezza al picco si attenua molto rapidamente. Quindi, se sentite uno spike che appare “basso e grasso”, potrebbe essere un interneurone, ma potrebbe anche essere un neurone piramidale che è semplicemente più distante.

L'ampiezza del segnale si riduce con la distanza (il mezzo extracellulare attenua come $1/R$), ma cambia anche la forma. Se normalizzate l'ampiezza di curve simulate a diverse distanze (10, 30, 50, 70 micrometri), noterete una cosa interessante: * La **parte iniziale** dello spike rimane quasi inalterata. * Ciò che cambia è la **fase di recupero** (la seconda parte dell'onda). A 70 micrometri, la durata totale dell'evento diventa forse una volta e mezza quella originale.

Tutto questo è molto utile per progettare algoritmi di *spike sorting*. Posso trarre vantaggio dal fatto che dopo un centinaio di micrometri il segnale cambia caratteristiche spettrali (diventa più “spanciato”). Questo mi permette di attribuire un significato anche alla distanza della sorgente.

Il “Cocktail Party Problem” Per chiudere il concetto della separazione, vi faccio il solito esempio, forse stupido, del **Cocktail Party Problem**. Siete a un cocktail, parlate con un interlocutore davanti a voi, ma c'è un sacco di gente che parla ad alta voce intorno. Eppure, voi riuscite a isolare e comprendere solo le parole del vostro interlocutore. È vero, probabilmente vi aiutate guardando le labbra, ma potreste farlo anche bendati. Il vostro cervello, a livello cognitivo, riesce a fare questa separazione di sorgenti.

A livello cellulare, un algoritmo deve fare la stessa cosa: deve separare sorgenti che si sovrappongono. Poiché le equazioni di Maxwell sono lineari, gli effetti di tanti neuroni vicini si sommano semplicemente per il principio di sovrapposizione degli effetti.

In sintesi, una descrizione modellistica accurata (che include come l'ampiezza e la larghezza dello spike, o *spike width*, cambino in funzione della distanza) ci permette di capire e rispondere a domande estremamente complicate sulla natura dei segnali che registriamo.

Leggi di Attenuazione del Segnale nello Spazio

Una descrizione modellistica diretta permette di rispondere a domande fondamentali: è vero che l'ampiezza si attenua allontanandosi dalla sorgente? Sì. Ma

come? Segue una legge $1/R$? Se mi allontano del doppio, l'ampiezza si dimezza, diventa un quarto ($1/R^2$), o un ottavo?

La risposta è sorprendente: dipende dalla **morfologia del neurone**.

Confronto tra Modelli: “Ball-and-Stick” vs Modelli Dettagliati Se considerate un modello molto semplice, come il modello di **Rall** (quello che abbiamo chiamato *ball-and-stick*), le proprietà matematiche sono interessanti. La volta scorsa abbiamo detto che questo modello permette di sostituire una descrizione accurata di input sinaptici e strutture arborizzate complesse con una sola “palla” (il soma) e un unico cavo (il dendrite). Quando la geometria è così semplice, effettivamente l'attenuazione dell'ampiezza in funzione della distanza è più o meno lineare in scala logaritmica. Sembra un'attenuazione proporzionale a $1/R$.

Se invece utilizziamo un modello morfologicamente dettagliato – come il modello di **Hay** (sviluppato con Idan Segev) – che rappresenta un neurone piramidale umano con tutte le caratteristiche geometriche, notiamo un comportamento diverso. In questo caso, l'attenuazione è molto più rapida nei primi 50-100 micrometri e poi tende a saturare o cambiare pendenza.

Analisi in Scala Log-Log Se basassi le mie considerazioni e la progettazione degli algoritmi solo sul modello *ball-and-stick*, farei un errore, attribuendo una distanza errata a segnali che sono attenuati dalla complessità morfologica e non solo dalla distanza geometrica. Guardando i grafici in scala **log-log** (dove le leggi di potenza diventano rette la cui pendenza corrisponde all'esponente): * Per il modello *ball-and-stick* (e forse per il modello complesso a brevissime distanze), la pendenza suggerisce un andamento $1/R$. * Tuttavia, per il modello dettagliato di Hay, a distanze maggiori la pendenza cambia. La traccia diventa parallela a rette di riferimento che indicano un decadimento come $1/R^2$ o addirittura quasi come $1/R^3$ (dipolo o quadrupolo).

Non esiste una ricetta standard o una semplice formuletta. Il potenziale non va banalmente come $1/R$ (come il potenziale di una carica puntiforme) o $1/R^2$ (campo elettrico), perché qui non stiamo osservando l'effetto di una singola sorgente statica, ma di una struttura distribuita con proprietà di cavo che influenzano la generazione stessa del segnale.

Detezione nel Rumore e Volume di “Ascolto”

Queste considerazioni portano a una domanda pratica: qual è il volume entro il quale posso rilevare uno spike con un elettrodo? Ogni sistema di registrazione ha un rumore intrinseco. Oltre al rumore elettronico dell'amplificatore e alla larghezza di banda, c'è il rumore termico (rumore di **Johnson-Nyquist**) dell'elettrodo stesso, che è proporzionale alla resistenza (o meglio, alla parte reale dell'impedenza) e alla temperatura. Immaginate un elettrodo a 37°C con un'impedenza di qualche centinaio di $k\Omega$: è un generatore di rumore.

Potreste stabilire una soglia minima di detezione, per esempio $30\ \mu\text{V}$, sotto la quale il segnale è considerato “annegato” nel rumore. Potreste pensare che questa soglia definisca una sfera di raggio fisso (es. $80\ \mu\text{m}$) intorno all'elettrodo. La risposta, ancora una volta, non è così semplice: dipende dal **tipo cellulare**.

Differenze tra Tipi Cellulari (Piramidali vs Interneuroni) Confrontiamo tre morfologie : 1. **Neurone Piramidale**. 2. **Cellula di Martinotti** (interneurone). 3. **Cellula Neurogliaforme** (interneurone).

Se tracciamo le curve di **iso-ampiezza** (la frontiera dove il picco del segnale è esattamente $30 \mu V$), vediamo che la forma e l'estensione del volume di detezione sono drasticamente diverse: * Per un **neurone piramidale**, posso probabilmente rilevare segnali a qualche centinaio di micrometri di distanza. Vicino al soma il segnale è enorme, dell'ordine di $800 \mu V$. * Per una **Cellula di Martinotti**, il volume di detezione non è sferico ma allungato (una specie di ellissoide) e molto più piccolo. Vicino al soma il segnale scende a circa $130 \mu V$. * Per una **Cellula Neurogliaforme**, il segnale al soma è appena $50 \mu V$. Se mi allontano anche di poco, scendo sotto i $30 \mu V$ e perdo il segnale.

Questo introduce un **bias di campionamento** notevole. Se mettete un elettrodo nello strato 5 della corteccia, potreste “beccare” solo i grossi neuroni piramidali eccitatori e perdere completamente gli interneuroni inibitori, semplicemente perché i loro segnali sono troppo deboli o decadono troppo in fretta nello spazio. Se state progettando un'interfaccia neurale, questo è critico: la computazione corticale non è fatta solo dai neuroni eccitatori!

Ruolo delle Conduttanze Attive Dendritiche

Infine, un'ultima considerazione sulla biofisica dei dendriti. Sappiamo che l'albero dendritico non è passivo. Esistono i *calcium spikes* e fenomeni di elettrogenesi dendritica dovuti a conduttanze voltaggio-dipendenti (canali Calcio, NMDA, ecc.) che rendono i dendriti strutture attive, capaci di computazioni non lineari e rilevazione di coincidenze.

Ma queste conduttanze attive si vedono dal punto di vista extracellulare? Abbiamo simulato due condizioni: 1. **Modello Attivo**: Il neurone completo con tutte le conduttanze dendritiche. 2. **Modello “Active and Passive Replay”**: Prendiamo la corrente generata al soma nel caso attivo e la “riproduciamo” (replay) in una struttura morfologica passiva, senza canali dendritici attivi.

Il risultato è che le tracce extracellulari sono **praticamente indistinguibili**. La differenza di ampiezza è minima, dell'ordine di $10\text{-}15 \mu V$ su un segnale di $300 \mu V$ (meno del 10%).

La conclusione è che, sebbene i dendriti attivi siano fondamentali per la computazione intracellulare, dal punto di vista di un elettrodo extracellulare è molto difficile capire se quel particolare neurone stia facendo qualcosa di speciale (come generare spike di calcio dendritici). L'elettrodo extracellulare è sostanzialmente “cieco” a questi fenomeni fini.

Adesso facciamo la pausa. Al rientro vi racconterò cosa succede se avete una struttura soltanto assonica e se questa è mielinizzata o meno. Ci fermiamo per 10 minuti. Grazie a tutti.

Mielinizzazione e Conduzione Saltatoria

Ok, prima dell'intervallo ho menzionato la questione della mielinizzazione. Non confondetela con la melanina, che non c'entra nulla e ha a che fare con la pigmen-

tazione della cute. La **mielina** è una sostanza di colore scuro che, in particolare, caratterizza alcune cellule della glia chiamate **oligodendrociti**. Questi non sono presenti per tutti gli assoni e nemmeno per tutti i collaterali dello stesso neurone; agiscono come il pane degli hot dog avvolgendosi attorno all'assone e creando, di fatto, una struttura di isolamento elettrico. Questo avviene per tutti i nervi periferici, ad esempio.

Proprio come il cavo di una telecamera è isolato dallo spazio esterno (che potrebbe essere aria non conduttiva o una soluzione acquosa ricca di elettroliti), la mielina isola la membrana plasmatica. Se un isolante è utile per contenere le dispersioni in un cavo lungo, nel caso di un assone questo ha conseguenze fondamentali. Se vi ricordate, la settimana scorsa abbiamo giocato con un *Jupyter Notebook* su Google Colab simulando un cavo equipaggiato con molti canali attivi (Sodio e Potassio voltaggio-dipendenti). Quel dispositivo era in grado di propagare il potenziale d'azione con ampiezza costante fino alla fine del cavo. In quel caso, però, non c'era mielinizzazione: la conduzione era continua.

Quando ci sono gli oligodendrociti, la membrana non ha un accesso diretto al mezzo extracellulare, quindi tutti i valori di conduttanza (di *leak*, massima del Sodio, massima del Potassio) sono efficacemente circa zero in quei punti. Non possono esserci correnti transmembrana. Questo porta la biologia a una soluzione evolutiva fantastica: lasciare scoperte delle zone che invece hanno le conduttanze. Questi punti, chiamati **Nodi di Ranvier**, sono punti "caldi" (*hot*) per le proprietà di eccitabilità. Tra un nodo e l'altro c'è un'interruzione isolata di qualche decina di micrometri. La conduzione risultante si chiama **saltatoria** (*saltatory*), perché il segnale passa di fatto da un punto all'altro. Questo porta ad avere un'accelerazione notevole e un tempo di propagazione minore rispetto al caso senza mielina.

Proiezioni a Lungo Raggio vs Locali Nel caso dei neuroni della corteccia cerebrale, le proiezioni a lungo raggio – come quelle da un emisfero all'altro o il **tratto piramidale** (chiamato così per l'anatomia, non solo perché le cellule sono piramidali) che proietta fino al midollo spinale – necessitano di integrità del segnale e velocità massima, proprio come un cavo transoceanico. Tuttavia, nello stesso neurone ci sono le cosiddette **collaterali** (biforcazioni dell'assone che vanno di lato). L'80% di queste restano in blocchi relativamente vicini della corteccia (connessioni intracorticali locali).

Confronto Simulato: Assone Mielinato vs Non Mielinato

Utilizzando una simulazione con morfologia e biofisica accurate, possiamo confrontare tre casi: 1. **Soma** (punto di generazione). 2. **Assone Mielinato** (con interruzioni nei nodi di Ranvier). 3. **Assone Non Mielinato** (cavo attivo continuo senza interruzioni).

Punto di Vista Intracellulare Dal punto di vista intracellulare, notiamo subito una differenza nel **potenziale di riposo** (*baseline*). * Il Soma è molto più depolarizzato. * L'Assone sta praticamente sempre a riposo fino a quando non gli arriva una **corrente laterale citosolica**.

La propagazione laterale del potenziale d'azione dai punti immediatamente

precedenti cambia il potenziale transmembrana locale, portando il punto successivo a “esplodere” e generare uno spike. È una cascata: una perturbazione per prossimità geometrica fa sì che, dopo un po’, esploda anche il punto eccitabile successivo, fino a invadere i terminali sinaptici. Nel caso dell’assone non mielinato, il potenziale di riposo è ulteriormente più iperpolarizzato.

La Questione del “Kink” nell’Inizio dello Spike A parte la *baseline*, le tracce sembrano simili, ma i più attenti potrebbero notare che la generazione dello spike nell’assone sembra essere molto ripida. Qualche anno fa (forse 15-20), un articolo su *Nature* mise in dubbio il modello di **Hodgkin e Huxley** per i neuroni corticali. Il modello di Hodgkin-Huxley (originariamente per l’assone gigante di calamaro) prevede una curva di carica dolce prima dell’emissione dello spike. L’articolo sosteneva che i potenziali d’azione nella corteccia fossero più *kinky* (più “monelli”, o meglio, con un gomito più spigoloso), iniziando in modo molto più ripido. Si ipotizzava una biofisica diversa. Probabilmente non è una biofisica diversa, ma un effetto della propagazione in strutture eccitabili che genera questa estrema rigidità (*stiffness*) nel fronte di salita.

Punto di Vista Extracellulare Le vere sorprese arrivano guardando il **potenziale extracellulare normalizzato** (al picco negativo). * **Soma:** Ha il comportamento classico simile alla derivata prima del potenziale intracellulare (giù, poi su, con una gobetta finale rappresentativa della *after-hyperpolarization*). * **Assone Mielinato:** Ha una forma molto stereotipata, simile al soma ma è uno spike **più stretto** e con meno “ghirigori”. Va giù e torna su rapidamente. * **Assone Non Mielinato:** Ha una forma diversa, un po’ più larga e con una parte iniziale predominante strana.

Se vedete segnali “strani” in una coltura cellulare *in vitro*, potreste chiedervi: “Non è che manca la mielina?”. La risposta sarebbe quasi certamente sì. Avere un preparato in vitro (cellule dissociate) che preservi la mielinizzazione è quasi impossibile, perché le cellule della glia non si riconfigurano correttamente. Diverso è il caso di una fettina acuta di cervello, dove la citoarchitettura originale è preservata.

Attenuazione in Funzione della Distanza La cosa più interessante è come cambia l’attenuazione dell’ampiezza allontanandosi dalla sorgente (10, 100, 1000 μm): 1. **Soma:** L’ampiezza decade molto rapidamente. 2. **Assone Non Mielinato:** Decade **meno rapidamente** rispetto al soma. 3. **Assone Mielinato:** Ha un comportamento intermedio.

Se vedete una “sberla” di segnale enorme (migliaia di microvolt), siete quasi sicuramente sopra il soma. Se vedete segnali più attenuati e con forme diverse, potreste essere vicini a un assone non mielinato. Queste considerazioni sono molto utili per interpretare segnali “blind” registrati sperimentalmente.

Dati Sintetici e Validazione degli Algoritmi

Per ricapitolare, questa modellistica diretta (*forward modeling*) è essenziale per guidare lo sviluppo di algoritmi o creare dei **benchmark**. Nella realtà, quando inserisco un elettrodo nel tessuto cerebrale, non ho la **Golden Truth** (la verità

assoluta). Non so quanti neuroni ci siano, non so quando stiano sparando. Solo conoscendo la verità potrei validare i miei algoritmi di separazione (*spike sorting*) e detezione.

Il Problema del Rumore “Colorato” Inoltre, c’è il problema del rumore. In una registrazione reale, il rumore non è necessariamente gaussiano e additivo. Il “rumore” che vedete in una traccia extracellulare filtrata (la parte ad alta frequenza) è spesso un *bailamme* generato dalla periferia: è l’attività di migliaia di altri neuroni distanti che sono “annegati” nel segnale. Non è lecito assumere che la statistica di questo rumore sia gaussiana o simmetrica, perché gli spike di fondo hanno comunque una polarità (vanno giù o su) e non sono distribuiti nello spazio in modo uniforme.

Per questo motivo, la comunità scientifica ha iniziato a creare **dati sintetici**. Si crea un blocco di tessuto neuronale finto *in silico*, dove so esattamente dove sono tutti gli elettrodi virtuali e quando avvengono gli spike. In questo contesto, posso aggiungere un “rumore autentico” (generato dall’attività di fondo della simulazione stessa, non aggiunto artificialmente come rumore bianco) e testare gli algoritmi in condizioni controllate.

I più puristi potrebbero obiettare: “Questa è pur sempre una teoria, non è la verità”. È vero, ma poiché la verità sperimentale è inaccessibile per popolazioni numerose (mentre è accessibile per il singolo neurone isolato con patch clamp), la simulazione resta uno strumento indispensabile.

Local Field Potentials (LFP) e Multi-Unit Activity (MUA)

Facciamo ora lo stesso discorso per i **Local Field Potentials (LFP)**, complicando però lo scenario: non consideriamo più un unico neurone, ma una mini-popolazione di neuroni piramidali. Questi neuroni non sono esattamente identici né perfettamente affiancati; sono dispersi nell’arco di qualche centinaio di micrometri, proprio come avverrebbe in un tessuto biologico corticale o ipocampale reale. Non sono tutti perfettamente allineati.

Simulazione di una Popolazione e Filtraggio Simuliamo il potenziale extracellulare in punti distinti, corrispondenti ai siti di un elettrodo *multisito* (uno *shank*). Immaginate un elettrodo vero – ve ne mostrerò una foto tra poco – utilizzato sperimentalmente o in clinica, che possiede diverse metallizzazioni esposte (contatti). In questo caso simulato ne abbiamo 22, con una distanza tra l’uno e l’altro (*pitch*) di circa 50 micrometri (quindi tra il contatto 1 e il 4 ci sono circa 150-200 micrometri).

Posso generare un’attività sintetica in questa rete di neuroni (che include anche l’attività sinaptica) e simulare la traccia per qualche centinaio di millisecondi. Successivamente, filtro le 22 tracce simulate per separare due componenti: 1. **Local Field Potentials (LFP)**: La parte a bassa frequenza, ottenuta con un filtraggio passa-basso (es. da 0 a 100 Hz, o fino a 500 Hz). 2. **Multi-Unit Activity (MUA)**: La parte ad alta frequenza, ottenuta filtrando, ad esempio, da 500-750 Hz fino a 5000 Hz.

Nota: 5000 Hz è molto più grande di 1 kHz, che era il punto di concentrazione

dell'energia dei singoli potenziali d'azione. Sto considerando un range che include attività molto rapida.

Localizzazione Spaziale delle Componenti Osservando i risultati, si nota che l'attività MUA – molto più frastagliata e rapida – avviene specificamente in corrispondenza degli elettrodi **13-17**. Questi elettrodi sono posizionati geometricamente vicino ai **somi** dei neuroni nella simulazione. Quindi, l'attività MUA è probabilmente legata all'attività di *spiking* (potenziali d'azione). Appare frastagliata perché queste variazioni rapide non sono state eliminate dal filtraggio, ma anche perché i neuroni non stanno facendo tutti la stessa cosa nello stesso istante. C'è una sovrapposizione nel tempo e nello spazio degli effetti di diverse sorgenti. Gli spike extracellulari possono essere un po' più attenuati, larghi o stretti, e non avvengono sincronicamente; magari sono distribuiti in una finestra temporale di 10-20 millisecondi, formando quello che viene chiamato un **volley** (una scarica di gruppo).

Guardando la traccia MUA, è difficile dire quanti spike ci siano perché le forme d'onda si sovrappongono. Se avessi avuto una traccia con due unità ben spaziate e molto silenzio in mezzo, avrei potuto distinguerle. Ma qui no.

Relazione tra Ampiezza MUA e Firing Rate Tuttavia, potrei chiedermi se l'ampiezza di questa *Multi-Unit Activity* (che, notate, è dell'ordine di pochi microvolt, es. $4 \mu V$, quindi nella realtà sarebbe piccolissima e facilmente sopraffatta dal rumore elettronico) non sia rappresentativa dell'attività globale. Mi piacerebbe poter estrarre i tempi esatti (T_1, T_2, T_3), ma è impossibile. Posso però ipotizzare che più c'è attività – più alto è il **firing rate** della popolazione – tanto maggiore sia l'ampiezza del segnale MUA. È come se gli effetti si sommassero. Ricordatevi la storia delle “code”: anche se gli eventi hanno code brevissime, se ce ne sono tanti e molto impaccati nel tempo, possono sommarsi costruttivamente.

In questa simulazione (dove posso controllare tutto girando una “manovella”, cosa impossibile sperimentalmente), si vede che esiste una relazione tra il *firing rate* della popolazione e l'ampiezza media della MUA: * **Relazione Lineare:** Sembra esserci una proporzionalità diretta per frequenze di *firing* dell'ordine di qualche decina o centinaio di Hertz. * **Legge di Potenza:** A frequenze più alte, la relazione lineare si perde. Un *fitting* numerico suggerisce un andamento a potenza (es. radice cubica della quarta potenza), ma lascia il tempo che trova.

Il messaggio importante è che, osservando l'ampiezza della MUA con un elettrodo nella corteccia motoria, posso inferire istantaneamente il *firing rate* della popolazione locale, utile ad esempio per decodificare l'intenzione motoria (es. muovere la mano a destra o sinistra).

Attenuazione Spaziale: LFP vs MUA C'è una differenza sostanziale nell'attenuazione spaziale tra LFP e MUA. In un grafico che mostra l'ampiezza del segnale in funzione della distanza radiale (allontanandosi dalla “colonna” neuronale): * **MUA:** Si attenua molto rapidamente. La pendenza suggerisce un decadimento intermedio tra $1/R^2$ e $1/R^3$. Per vedere la MUA, devo essere fortunato e avere l'elettrodo molto vicino ai somi. * **LFP:** Persistono molto più

a lungo nello spazio. I segnali sono dell'ordine di centinaia di microvolt (es. 500 μV) e si vedono a distanze maggiori. Probabilmente decadono come $1/R^2$.

Di conseguenza, è facile che con un elettrodo posizionato “da qualche parte” io veda i LFP ma **non veda alcuna MUA**, perché quest'ultima è troppo attenuata dalla distanza.

Origini Biofisiche dei Local Field Potentials I LFP non sono generati solo da fenomeni lenti come le correnti sinaptiche distali. La realtà è più complessa: 1. **Correnti Sinaptiche Distali**: Correnti generate da recettori come NMDA o da correnti Calcio, che sono lente. 2. **Contributo degli Spike (filtrato)**: Anche gli spike hanno componenti a bassa frequenza, dovute a correnti che non sono coinvolte nell'esplosione immediata del potenziale d'azione ma sono lente (es. correnti di post-iperpolarizzazione, Potassio, o Sodio persistente). Queste componenti sopravvivono meglio all'attenuazione del mezzo resistivo. 3. **Cellule della Glia (Astrociti)**: Spesso trascurate (non ne abbiamo parlato molto), le cellule gliali sono numerose quanto i neuroni (o più, nel cervello umano). Hanno un ruolo metabolico e nella trasmissione sinaptica, e possiedono correnti ioniche proprie che cambiano lentamente nel tempo, contribuendo ai segnali lenti. 4. **Variazioni di Concentrazione Ionica**: In condizioni normali esistono loop di corrente che chiudono il circuito nel mezzo extracellulare. Tuttavia, in condizioni patologiche (es. **focus epilettico** o attività ipersincrona sostenuta), possono crearsi differenze notevoli di concentrazione ionica (es. svuotamento del Calcio o accumulo di Potassio extracellulare) su aree macroscopiche. Questo contribuisce significativamente ai LFP.

Interpretazione dei LFP e Ambiguità della Polarità

Per concludere, vorrei tirare le somme e darvi degli elementi da ricordare, con un *caveat* fondamentale: l'interpretazione dei segnali non è banale, e le simulazioni lo dimostrano chiaramente.

Analizziamo la polarità dei **Local Field Potentials** in relazione alla posizione delle sinapsi attive:

1. **Sinapsi Eccitatorie Distali (Apicali)**: Se attivate una sinapsi eccitatoria nella parte distale dell'albero dendritico (lontano dal soma), gli ioni positivi (Na^+ , Ca^{2+}) entrano nella cellula. Questo crea un **pozzo** (*sink*) di corrente extracellulare. Di conseguenza, nella zona dendritica registrate una **negatività**. Per chiudere il circuito, la corrente deve uscire da qualche altra parte (tipicamente al soma), creando una **sorgente** (*source*) e quindi una **positività** somatica.
2. **Sinapsi Eccitatorie Prossimali (Basali/Somatiche)**: Se l'input eccitatorio è vicino al soma, il pozzo (negatività) è al soma, mentre la sorgente (positività) si trova distalmente nei dendriti apicali.

L'Ambiguità “Sorgente-Pozzo” Qui nasce il problema interpretativo. Immaginate di avere un elettrodo vicino al soma e di registrare una **positività**. Potreste essere tentati di dire: “Ah, positività significa inibizione locale”. Infatti, se attivaste sinapsi inibitorie (es. GABA-A, permeabili al Cloro) al soma,

il Cloro entrerebbe (cariche negative dentro), lasciando una positività fuori. Tuttavia, come abbiamo appena visto, una positività somatica può essere generata anche dall'**eco passivo** (la sorgente di ritorno) di una sinapsi eccitatoria distale.

Quindi, due situazioni opposte dal punto di vista funzionale (eccitazione distale vs inibizione locale) possono produrre un segnale extracellulare simile (positività locale). Questa ambiguità impone estrema cautela: senza conoscere la distribuzione spaziale completa del potenziale, è rischioso inferire la natura della sinapsi solo dal segno del LFP.

Il Caso dell'Attività Distribuita Le cose si complicano ulteriormente quando consideriamo una rete di neuroni o una distribuzione di sinapsi complessa. * **Attivazione Distribuita:** Se le sinapsi eccitatorie bombardano l'intero neurone (sia apicalmente che basalmemente), le sorgenti e i pozzi possono cancellarsi a vicenda. Extracellularmente, il potenziale risultante potrebbe essere quasi piatto o nullo, rendendo "invisibile" un'attività sinaptica anche molto intensa. * **Sincronia:** Se gli spike o gli eventi sinaptici non sono perfettamente sincroni, ma leggermente sfasati (come in una *Multi-Unit Activity* disordinata), i segnali possono mescolarsi in modo tale da non permettere di distinguere le singole componenti.

Il Modello a Dipolo: Validità e Limiti

Nonostante queste ambiguità, l'osservazione della separazione di carica (negatività dendritica e positività somatica, o viceversa) ha consolidato per decenni il concetto di **dipolo di corrente**. Questo modello è stato fondamentale per l'interpretazione dell'Elettroencefalogramma (EEG). Se consideriamo i neuroni piramidali della corteccia – con i loro lunghi dendriti apicali allineati parallelamente – come generatori di dipoli, la somma dei loro campi spiega i segnali macroscopici registrati sullo scalpo.

Confronto con il Dipolo Matematico Ma quanto è accurata questa approssimazione? Se confrontiamo il campo generato da un neurone piramidale simulato con quello di un dipolo matematico ideale (una coppia puntiforme sorgente-pozzo): * **Far Field (Campo Lontano):** A distanze di qualche centinaio o migliaio di micrometri, le due descrizioni sono praticamente indistinguibili. L'approssimazione a dipolo (o ai termini successivi dello sviluppo multipolare) funziona bene. * **Near Field (Campo Vicino):** A distanze ridotte (frazioni di millimetro, all'interno dello spessore corticale), il modello a dipolo fallisce. Il neurone reale ha una struttura estesa, non puntiforme. Il dipolo tende a sovrastimare o sottostimare il potenziale a seconda della posizione (creando dei lobi di errore), non riuscendo a catturare la complessità generata dalla morfologia dendritica.

Cenni sulla Formulazione Matematica Solo per completezza, il momento di dipolo \vec{P} per una distribuzione discreta di correnti è definito come una somma pesata dalle posizioni:

$$\vec{P} = \sum_n I_n \vec{r}_n$$

Nel caso semplice di un dipolo (due correnti I e $-I$ nelle posizioni \vec{r}_1 e \vec{r}_2), per la conservazione della carica/corrente, questo si riduce a:

$$\vec{P} = I(\vec{r}_2 - \vec{r}_1)$$

Dove $(\vec{r}_2 - \vec{r}_1)$ è il vettore distanza tra la sorgente e il pozzo. Il potenziale risultante a grande distanza decade come $1/R^2$ (a differenza del monopolo che decade come $1/R$) e dipende dall'angolo θ (coseno direttore) tra il vettore dipolo e il punto di osservazione.

Questo conclude la parte di potenziali extracellulari e l'applicazione dei principi della biofisica all'interpretazione dei segnali elettrofisiologici.

Ci fermiamo e facciamo una pausa di 10 minuti.

Introduzione al Demo Notebook per l'Analisi Dati

Allora, voglio solo menzionare l'esistenza di un ultimo *notebook* che avete a disposizione sul repository GitHub e che funziona su Google Colab. Si intitola “**Demo Notebook per Electrophysiological Data**” e contiene dei dataset di registrazioni extracellulari e intracellulari.

Nel caso qualcuno di voi voglia semplicemente giocarci – e giocarci può voler dire plottarlo con diversi colori, fare zoom, calcolare la media, la varianza, vedere qual è la frequenza media nel caso di una traccia intracellulare, calcolare la durata, o plottare la derivata nel tempo – potete fare quello che volete. Io credo che soltanto una piccola porzione di voi sia curiosa o motivata a esplorare. Non è neppure per conto vostro, perché sapete (l'avrete capito dopo circa 50 ore che siamo stati assieme) che se nessuno si presenta in aula mi dispiaccio, ma se mi fate delle domande che mi accendono, io sto qui a parlare anche per altre 4-5 ore. Sappiate che se avete voglia di giocare su queste cose, potete parlarne. L'università alla fine è questo: non è una scuola di avviamento professionale e non è un istituto tecnico in cui uno prende un pezzo di carta per fare la professione del bioingegnere che “attacca le spine agli ecografi” in ospedale. Anche quello è importante, ma non è il contenuto di questo corso.

Gestione dei Dati su Google Colab

Per portare i dati dentro Google Colab c'è un equilibrio un pochino complicato, ma è una cosa che ho già risolto per voi nel codice. Dentro il repository GitHub c'è una directory che si chiama **data** e dentro ci sono dei file zippati. Li ho zippati e sono una porzione ridotta (non avete una registrazione di 10 minuti di 100 neuroni) perché GitHub impone limiti di spazio e non permette ai repository di essere troppo pesanti.

Trovate diversi tipi di dati:

- Una traccia di **elettromiografia** (acquisita dal mio braccio l'anno scorso o due anni fa), resa disponibile come file ASCII o binario. Li dovrete avere un riferimento a un notebook che forse aveva a che fare con le “rane”, dove vi mostro come accedere ai dati.
- Dati sui **Microelectrode Arrays (MEA)** provenienti da fettine di tessuto corticale.

- Una registrazione **intracellulare** dal soma di neuroni della corteccia di ratto.

Comandi Shell in Colab: Download e Decompressione L'acrobazia consiste nell'usare comandi di sistema direttamente nel notebook. Google Colab si aspetta istruzioni Python, ma antepo-
nendo il punto esclamativo (!) possiamo eseguire comandi della **shell** (del sistema operativo sottostante, che è una macchina virtuale Linux). Il comando fondamentale è **curl** (o **wget**), che serve per scaricare il file. Ho impiegato diverse ore per trovare il link diretto corretto al file zippato su GitHub.

Il comando appare simile a questo:

```
!curl [URL_AL_FILE_ZIP] -o dati.zip
```

Facendo così, dico alla macchina virtuale di scaricarlo nel cloud. Nulla vi impedisce di farlo sul vostro laptop, ma se avete bisogno di aiuto per installare Python o altro, chiedete pure (anche se dubito che tutti e 50 lo faranno).

Successivamente, bisogna scompattare il file. Mi serve una procedura automatica (non posso cliccare col mouse come sul desktop), quindi uso:

```
!unzip dati.zip
!rm dati.zip
```

unzip scompatta l'archivio e **rm** (remove) cancella il file zip originale per pulire il file system, dato che ora ho i dati estratti.

Se aprite le icone sulla sinistra di Google Colab, vedrete il **file system** della directory di lavoro popolato dai nuovi file. Troverete file con estensione **.bin** (dati binari grezzi) e file **.h5**.

- I file **.bin** sono nove in questo caso (non 4096 come nella matrice reale, per risparmiare spazio).
- I file **.h5** seguono il formato **HDF5** (*Hierarchical Data Format*), un protocollo molto efficiente per l'acquisizione e lo scambio di dati, supportato da librerie in Python, Julia, Matlab, R, ecc.

Caricamento e Visualizzazione in Python

Una volta che questi oggetti sono nel file system locale, devo caricarli nella memoria di Python, cioè dentro dei vettori (array). Lo faccio usando la libreria **NumPy**. Se non sapete come fare, non c'è nulla di magico: basta cercare su Google o Stack Overflow "how to load binary file into numpy array". Ci sono riuscito io in pochi secondi, potete farlo anche voi.

Iterazione e f-strings L'unica cosa particolare del codice che vi ho fornito è il caricamento iterativo. Anziché scrivere otto volte l'istruzione per caricare **data0.bin**, **data1.bin**, ecc., ho creato un ciclo **for** generico:

```
for i in range(n_channels):
    filename = f"data{i}.bin"
    # caricamento dati...
```

Utilizzo le **f-strings** di Python 3 (quelle con la **f** prima delle virgolette) che permettono di inserire variabili direttamente nella stringa (es. `{i}`). A *runtime*, il ciclo sostituisce `{i}` con 0, 1, 2, ecc., generando il nome del file corretto.

Plotting con Matplotlib Infine, uso la libreria **Matplotlib** per visualizzare i dati. È una libreria con una documentazione sterminata che permette di personalizzare ogni dettaglio (spessore linee, colori, assi), il che a volte mi dà timore per la sua complessità rispetto alla semplicità di Matlab. Tuttavia, uso la funzione più basilare:

```
plt.plot(data)
```

Non metto nemmeno l'asse delle X, plotto semplicemente la sequenza di campioni per ciascuno degli otto elettrodi. Questa è la traccia grezza (*raw data*), che probabilmente copre solo pochi secondi di registrazione. Vi invito a investigarla.

Analisi Spettrale e Filtraggio del Segnale

A questo punto, dai dati grezzi, passo a calcolare lo spettrogramma o, più specificamente, la **Densità Spettrale di Potenza** (PSD). Non l'ho programmata io da zero, nonostante abbia reminiscenze di comunicazioni elettriche e teoria dei segnali; ho semplicemente utilizzato la funzione di Python che calcola la PSD applicando la **finestra di Welch**. Chi di voi ha fatto qualcosa di elaborazione dei segnali sa cosa vuol dire “metodo di Welch”; se non lo sapete, chiedete a Google. In teoria, ogni volta che incontrate una parola che non conoscete, non dovete per forza starci un'ora sopra, ma grosso modo potreste usare Wikipedia o Google con saggezza (se vi spunta il sito dei complottisti, magari evitate quelle informazioni).

Osservazione dello Spettro e Artefatti Calcolando la PSD per tutti gli otto elettrodi, vedo che a qualche migliaio di Hertz (o cicli al secondo) le tracce vanno giù, come atteso. Quello che *non* vedo, e che mi sarei aspettato di vedere, è un picco a circa **50 Hz**. Essendo il grafico in scala log-log (questo è 100, 90, 80, 70, 50...), mi sarei aspettato il rumore della rete elettrica. Qui non ci sono abbastanza punti per dirlo con certezza. Quello che invece vedo è un piccolo picco (“picchettino”) ad altissima frequenza che sembra esserci in tutti gli elettrodi. Non so cosa sia: forse un rumore numerico o digitale a una frequenza che di solito non sono abituato a utilizzare.

Filtraggio Digitale: Separazione LFP e MUA Posso utilizzare un filtraggio per estrarre le diverse componenti: 1. **Local Field Potentials (LFP)**: Uso un filtraggio passa-basso. 2. **Multi-Unit Activity (MUA)**: Uso un filtraggio passa-banda.

Per i LFP, ad esempio, utilizzo un filtro **Butterworth**. Di nuovo: non sapete cos'è un filtro digitale? Non sapete cos'è un filtro **FIR** (*Finite Impulse Response*) oppure **IIR** (*Infinite Impulse Response*)? Dateci un'occhiata. Non dovete studiarlo a fondo, ma è utile sapere grosso modo di cosa si tratta. Questa è la funzione di trasferimento che Python mi permette di implementare con questa bellissima libreria chiamata **SciPy** (*Scientific Python*), che mi consente di non

saper fare nulla “a mano” dal punto di vista dell’implementazione del filtraggio, fornendomi direttamente un filtro passa-basso o passa-banda pronto all’uso.

Strumenti Software e Feedback Didattico

Mi chiedo se nel corso dei miei colleghi Gibertoni e Gibaldi voi facciate qualcosa di pratico in **Matlab**. Dovreste probabilmente fare qualcosa in Matlab. Se no, parlatene: i vostri commenti, positivi o negativi, sono preziosi per i posteri, specialmente se sono informali e preliminari anziché affidati solo ai questionari ufficiali (lì è difficile che possiate scrivere liberamente “il tizio fa schifo” o “mi piace”, mentre a voce è più diretto).

Per esempio, riguardo all’uso di **Python** trasversalmente su tutti i corsi: ci ho provato quest’anno, ma credo che Gibertoni e Gibaldi abbiano continuato a usare Matlab. (*Interazione con gli studenti: “Per motivi... secondo me o tutto Matlab o tutto Python visto che Python ha una quantità enorme di librerie... ma non ancora o non del tutto? Ok. Ah, ok. Non volevo lasciare qualcosa... Ok, non bene, non bene. Grazie per avermelo detto.”*)

È vero che questo non è un master in *Data Science*, però un pochino “giocare” con i dati, togliere il rumore, è importante. Altrimenti finisce che solamente N di voi (magari 7 o 8 persone) sviluppano la curiosità di farlo, mentre alla maggior parte dei vostri colleghi questa competenza manca.

Esplorazione delle Tracce: LFP, MUA e Crisi Epilettiche

Nel *notebook* avete un modo per “giocare”, per filtrare i **Local Field Potentials** (parte a bassa frequenza) e la **Multi-Unit Activity** (parte ad alta frequenza). Potete zoomare, ad esempio su una finestra di 500 millisecondi, e vedere le diverse tracce. Evidentemente qualcosa succede in quel momento specifico; lo si vedeva anche dai dati grezzi. Nei dati grezzi sembrava che tutte le tracce a un certo punto iniziassero un’attività intensa. Questa traccia blu sembra aver iniziato dopo; forse quella iniziale è stata questa traccia viola (la numero 4).

Non so esattamente chi inizi questa specie di **scarica epilettica in miniatura**, ma il tessuto da cui provengono i dati è effettivamente un pezzo di tessuto epilettico (o reso tale *in vitro*). Dal punto di vista dei LFP, potreste notare che l’inizio della crisi (*seizure*) non è simultaneo su tutti i canali. Potreste chiedermi: “C’era una relazione spaziale?”. Sì, c’era. Quanto erano distanti questi siti di registrazione? Vi potrò dire: qualche decina di micrometri. Quindi, se uno volesse giocare con i dati, potrebbe estrarre qualche caratteristica di **propagazione** della crisi, misurando i ritardi tra un elettrodo e l’altro. Essendo *in vitro*, non è un’epilessia clinica completa, ma è un’attività **epilettiforme** (ha la forma di un’attività epilettica).

Introduzione alla Peak Detection (Detezione dei Picchi)

Passiamo ora all’analisi della **Multi-Unit Activity**. Potreste voler detettare gli spike e avrete presto la necessità – ne parliamo ora in modo abbastanza leggero – di trovare un modo per definire una **soglia** il cui attraversamento mi dice se quello è un picco oppure no.

Nel codice vi faccio vedere come implemento la **peak detection**. L'idea è che magari qualcuno di voi, particolarmente “rompiglione” o viceversa ossessivo-compulsivo (OCD), mi dica: “Qui è una schifezza, questo codice è buttato lì”. È vero, è buttato lì un po' apposta, non per darvi fastidio ma per stimolare qualcuno a dire: “No aspetta, fammelo commentare bene, o fammi cambiare i colori... qui è brutto che prima non hai usato gli assi e qui li hai usati”. Ovviamente il vostro input sarebbe prezioso, ma non è obbligatorio.

Quindi, detetto i segnali. In alcuni casi vedo deflessioni solo negative, in altri solo positive. Che ne faccio di tutte queste cose? Posso estrarle traccia per traccia, plottare le forme d'onda (e di questo parleremo per lo *spike sorting*) e poi visualizzare i risultati per ciascuno dei canali (es. `Data1.bin`, `Data2.bin`, ecc.).

Anche se qui ho plottato i segnali come negativi (semplicemente per averli tutti in uno stesso grafico), vedete che non tutti i neuroni che presumibilmente ho colto da questo elettrodo fanno la stessa cosa allo stesso momento. Però, se strizzate gli occhi, vedete che c'è una specie di “banda” di attività qui e un'altra banda qualche centinaio di millisecondi dopo: una specie di prima onda e poi un'altra onda, come una prima crisi e una seconda crisi successiva.

Analisi dei Dati Intracellulari

Per quanto riguarda i dati intracellulari, se plottate l'intera traccia (non solo una finestra di 30 secondi), vedrete che c'è una struttura definita. Ero io stesso a iniettare una corrente negativa, un gradino iperpolarizzante, per studiare l'andamento esponenziale della curva di carica e scarica della membrana. Lo scopo era estrarre, effettuando un *fit* esponenziale su questa risposta, il valore della **costante di tempo della membrana** (τ_m).

Quindi, una persona potrebbe analizzare quei dati fittando un esponenziale. Oppure, guardando gli spike, potrebbe venirvi voglia di analizzare la frequenza di scarica. Non è obbligatorio farlo per l'esame, ma potete farlo per il resto della vostra vita se salvate questi dati (finché GitHub o Google li mantengono online). Troverete anche il riferimento all'articolo scientifico da cui sono stati presi questi dati, che spiega cosa volevamo fare e perché quella cellula specifica (un neurone corticale di ratto) sparava in modo così apparentemente disordinato.

Evoluzione Tecnologica degli Elettrodi

Vorrei soffermarmi su come, negli ultimi 50-100 anni, diverse scoperte tecnologiche abbiano guidato le scoperte nelle neuroscienze. Dall'uso dei primi **fili di tungsteno** (che abbiamo già visto) ai **tetrodi**, fino ai cosiddetti **Silicon Probes** (sonde in silicio).

Dai Fili di Tungsteno alle “Cellule di Jennifer Aniston” Ogni tecnologia ha abilitato scoperte specifiche: * Con i **fili di tungsteno** sono state scoperte le **Place Cells** nell'ippocampo (il “GPS del cervello”), come vi ho accennato nelle prime lezioni. * Con i **tetrodi** (quattro microfilamenti intrecciati), ricercatori come **Rodrigo Quijano Quiroga** hanno trovato nella corteccia di pazienti svegli le cosiddette **“Cellule di Jennifer Aniston”**.

È un risultato molto interessante (pubblicato su *Nature* o *Science* diversi anni fa): mostrando a un paziente diverse foto di Jennifer Aniston – con acconciature diverse, da angolazioni diverse – quella specifica cellula sparava selettivamente solo per lei. C’era anche la “cellula di Bill Clinton”. Questa scoperta ha riaperto il dibattito sulla teoria delle “**Cellule della Nonna**” (*Grandmother Cells*), che ipotizza una iper-specializzazione della codifica neurale: una singola cellula che spara solo quando si percepisce un concetto specifico (la vista, il profumo o il ricordo di una persona specifica, come la propria nonna).

Integrazione Spaziale e Stabilità Temporale A seconda dell’applicazione (ricerca di base o clinica), può essere importante avere dispositivi che garantiscano un’integrazione spaziale specifica o una stabilità temporale a lungo termine. Esistono diverse categorie di elettrodi:

1. **Tetrodi:** Sono fabbricati artigianalmente in laboratorio attorcigliando quattro fili piccolissimi (dell’ordine del micrometro), che vengono poi tagliati all’estremità. Nonostante l’isolamento, resta scoperta solo una piccola parte della punta. Essendo quattro punti di registrazione molto vicini, permettono una triangolazione efficace dei segnali.
2. **Politrodi:** Sono più raffinati dal punto di vista industriale. Hanno uno *shank* (un ago) di vetro o quarzo con elettrodi “annegati” al suo interno che emergono in superficie in punti specifici. Offrono una geometria riproducibile: se ne compro dieci, hanno tutti le stesse caratteristiche.
3. **Utah Arrays:** Sviluppatisi negli anni ’70 all’Università dello Utah. Sono matrici rigide di aghi (es. 10x10) che penetrano nel tessuto. Sono stati ampiamente utilizzati e validati.

Sonde in Silicio (*Michigan Probes*) e Neuropixels

La classe tecnologicamente più avanzata è quella dei **Silicon Probes**, chiamati anche **Michigan Probes** perché concepiti originariamente all’Università del Michigan. Sono costruiti interamente con le metodiche della **microfotolitografia**, le stesse usate per i circuiti stampati (PCB) e i microprocessori: maschere, *photoresist*, deposizione di metalli. Lo *shank* è in silicio (o poliammide flessibile in alcuni modelli) e ha dimensioni microscopiche: larghezza di qualche decina di micrometri e spessore di pochi micrometri.

Vantaggi della Microfabbricazione La cosa interessante è che permettono di integrare piste e contatti con precisione estrema. * Se zoomassimo sulla punta, vedremmo elettrodi e piste simili a quelle di un PCB. * Tutto è ricoperto da uno strato isolante, tranne i punti specifici dove il metallo deve essere esposto alla soluzione salina per registrare. * Le dimensioni degli elettrodi (es. 50 micrometri o meno) sono comparabili a quelle dei neuroni. * Possono essere prodotti in serie commercialmente.

Neuropixels: Il “Non Plus Ultra” Il problema principale delle sonde tradizionali è il connettore: se ho centinaia di contatti, devo avere centinaia di fili in uscita. La soluzione attuale più avanzata (per ora solo sperimentale su animali, non in clinica umana) sono i **Neuropixels**. Sviluppatisi da un consorzio

internazionale che include l'**IMEC** di Leuven, in Belgio, (una *foundry* di silicio no-profit dove ho lavorato anch'io), utilizzano la tecnologia **CMOS**.

- Hanno **migliaia di contatti** lungo lo shank.
- Non hanno migliaia di fili in uscita. Funzionano come i sensori **CCD** delle telecamere: possiedono un circuito elettronico integrato che **multiplexa** i segnali.
- Non leggono tutti i siti contemporaneamente in analogico, ma scansionano e digitalizzano i segnali (es. riga per riga) ad altissima velocità, inviando fuori un flusso di dati digitale compatto.

Applicazioni Cliniche: “Utah Array” e Interfacce Neurali

Lo **Utah Array**, pur essendo tecnologicamente meno sofisticato dei moderni Neuropixels, è stato sviluppato negli anni '70 ed è stato così tanto impiegato e studiato da ottenere l'approvazione degli enti di certificazione (come la **FDA**) per l'impianto nell'uomo.

Quindi, quando Elon Musk afferma di essere stato il primo, l'anno scorso o due anni fa, a impiantare un'interfaccia neurale in un paziente, non è esatto. Circa 15 anni fa – forse ve lo ricordate dalla prima o seconda lezione – c'era già un paziente che giocava a *Pong* con la mente, o una paziente paralizzata che muoveva un braccio robotico per bere da una cannuccia (progetto *BrainGate*). Questi pazienti avevano impiantato nella corteccia motoria proprio uno Utah Array (o le sue variazioni, in cui la lunghezza degli aghi non è uniforme per registrare da diversi strati corticali).

Catena di Acquisizione del Segnale

Una volta ottenuti i segnali extracellulari o intracellulari, bisogna processarli. Questa è una parte che sarà stata ampiamente discussa in altri corsi, ma di cui dovrete avere un'infarinatura essenziale.

1. **Pre-amplificazione:** I segnali sono piccolissimi (ordine dei microvolt o decine di microvolt). È necessario amplificarli, e bisogna farlo **il più vicino possibile alla sorgente** (pre-amplificazione *headstage*) per evitare che il rumore lungo i cavi sovrasti il segnale.
2. **Filtraggio:** Amplificando il segnale, si amplifica anche il rumore. A un certo punto è necessario filtrare.
3. **Campionamento e Digitalizzazione:** Per utilizzare un computer, dovete campionare il segnale nel tempo e digitalizzarlo in ampiezza (renderlo discreto).

Il Teorema del Campionamento (Nyquist-Shannon) Tutti i sistemi di acquisizione, dai più costosi ai microcontrollori economici (come un Arduino da 2-3 euro), possiedono un convertitore Analogico-Digitale (ADC). La regola fondamentale è data dal **Teorema di Nyquist-Shannon**: per campionare correttamente un segnale a banda limitata, la frequenza di campionamento f_s deve essere almeno il doppio della frequenza massima f_{max} contenuta nel segnale:

$$f_s \geq 2f_{max}$$

Vi rammento un modo intuitivo per ricordare questo concetto, che a me non spiegarono da studente ma che trovo utile. Campionare un segnale significa, nel dominio del tempo, moltiplicarlo per un **treno di impulsi di Dirac** (Delta di Dirac equispaziate). Poiché un prodotto nel dominio del tempo corrisponde a una **convoluzione** nel dominio delle frequenze, e poiché la trasformata di Fourier di un treno di impulsi è a sua volta un treno di impulsi, l'effetto del campionamento è creare delle **repliche** dello spettro del segnale originale a intervalli regolari (centrate sui multipli della frequenza di campionamento). Se le repliche si sovrappongono (aliasing), l'informazione è persa.

Conversione Analogico-Digitale (ADC) e Risoluzione

Oltre al campionamento temporale, c'è la **quantizzazione** dell'ampiezza. I sistemi digitali hanno una “parola” di lunghezza fissa (bit) che impone una risoluzione finita nella rappresentazione dei numeri. Non posso rappresentare differenze di potenziale arbitrariamente piccole; devo “accontentarmi” di livelli discreti.

Bit Depth e Livelli di Quantizzazione La risoluzione dipende dal numero di bit (N) del convertitore ADC: * **12 bit:** $2^{12} = 4096$ livelli discreti. * **16 bit:** $2^{16} = 65.536$ livelli discreti.

Ovviamente, passare da 12 a 16 bit aumenta i costi esponenzialmente (da pochi euro a migliaia di euro per schede professionali come quelle della *National Instruments*).

Range Dinamico e LSB (*Least Significant Bit*) C'è un altro parametro cruciale: il **range dinamico** (es. $\pm 5V$, $\pm 10V$, $\pm 1V$). Spesso è selezionabile. Supponiamo di avere un range di $\pm 5V$ (escursione totale di $10V$) e un ADC a **12 bit**. La risoluzione minima (LSB) sarà:

$$\text{LSB} = \frac{10\text{ V}}{4096} \approx 2.4\text{ mV}$$

Questo significa che ogni step digitale è di 2.4 mV . * **Caso Intracellulare (Amplificato):** Se ho un potenziale d'azione di 100 mV e lo amplifico di $100\times$, diventa 10 V . In questo caso, riempio tutto il range e ho tantissimi livelli per descriverlo. Sono contento. * **Caso Extracellulare (Piccolo segnale):** Se ho un segnale extracellulare di $100\mu\text{V}$ (0.1 mV) e lo amplifico poco (o se il range è troppo ampio), potrei trovarmi con un segnale che, anche amplificato, è dell'ordine di pochi millivolt. Se il mio segnale finale è, per esempio, 10 mV , con una risoluzione di 2.4 mV ho a disposizione solo **4 o 5 livelli** per descriverlo. Il risultato sarebbe un segnale “seghettato”, una scalinata digitale molto brutta con una perdita enorme di informazione (*quantization noise*).

Ecco perché, quando i segnali sono piccoli, è necessario o un'amplificazione elevata (guadagno) o un convertitore con un numero di bit molto maggiore (16 o 24 bit) per ridurre l'ampiezza dello step di quantizzazione. Nel computer, quando plottate i dati, vedete tanti punti e non vi accorgete della quantizzazione, ma se fate uno zoom verticale estremo, scoprireste che non esistono valori intermedi tra i livelli discreti dell'ADC.

Ricostruzione del Segnale e Teorema del Campionamento

C'è un'immagine che ho trovato su Wikipedia che, sebbene solo indirettamente legata a Nyquist-Shannon, illustra bene il concetto. Mostra una forma d'onda in cui, con pochi campioni, si prova a ricostruire la traccia originale. Ricordatevi che il concetto del teorema del campionamento è che voi potete esprimere una traccia continua con un insieme discreto di campioni, ma dovete avere un modo per “tornare indietro”. Il modo per tornare indietro matematicamente è la moltiplicazione (o convoluzione) con l'antitrasformata di un filtro passa-basso ideale (un *box* in frequenza), che nel tempo corrisponde alla famosa funzione **sinc**:

$$\text{sinc}(x) = \frac{\sin(x)}{x}$$

Questa funzione vale 1 a zero e poi dovrebbe essere 0 dappertutto, ma in realtà ha questi *ripples* (oscillazioni) che portano ad avere un *overlap*. Se fate le cose per bene e la frequenza di campionamento è sufficientemente elevata, tutte le altre *sinc* traslate (usate per rappresentare gli altri campioni) si annullano nei punti di campionamento, permettendo la ricostruzione perfetta. Se avete pochi punti (o sono troppo distanti), l'approssimazione è sbagliata: la traccia ricostruita non corrisponde a quella originale.

Filtraggio: Causale vs A-Causale

Ora, prima di fare la pausa, volevo rappresentare un aspetto critico dell'analisi degli spike: il tipo di filtro utilizzato. Quanti di voi sanno cos'è un **filtro causale** e un **filtro a-causale**?

Filtri Causali e Ritardo di Fase I filtri causali sono quelli che hanno una risposta all'impulso causale, ovvero nulla per tempi $t < 0$. Sono quelli fisicamente realizzabili in tempo reale. Se vi ricordate la storia che vi ho raccontato, in cui avete un ingresso e l'uscita che “insegue” l'ingresso (pensate a un semplice filtro passa-basso RC):

$$\tau \frac{dX}{dt} = -X + U$$

In questo caso, l'uscita X segue l'ingresso U con una certa attenuazione e un certo ritardo (sfasamento). * Se l'input varia molto lentamente, X lo copia quasi perfettamente. * Se l'input varia molto rapidamente, X ci prova ma resta **ritardato**.

Questo ritardo è una caratteristica importante quando fate il filtraggio passa-banda o passa-basso per estrarre LFP o MUA. Semplicemente parlando della forma dello spike extracellulare, **il filtro causale ne altera la forma d'onda**. Introduce distorsioni di fase che possono spostare il picco o cambiarne la simmetria.

Un filtro causale è tuttavia necessario se dovete lavorare in **tempo reale** (es. interpretare il segnale per una protesi neurale *on-the-fly*), perché non potete conoscere il futuro del segnale.

Filtraggio A-Causale (Zero-Phase Filtering) Se invece avete una traccia preregistrata (analisi *offline*), non siete vincolati alla causalità. Potete usare un filtraggio a-causale che elimina il ritardo di fase. Tipicamente si fa così (algoritmo *filtfilt*): 1. Si filtra la traccia una prima volta in avanti (introducendo un ritardo Δt). 2. Si prende la traccia filtrata, la si **inverte nel tempo** (il primo campione diventa l'ultimo). 3. La si fa passare di nuovo attraverso lo stesso filtro.

In questo modo, il secondo passaggio introduce lo stesso ritardo ma nella direzione temporale opposta, compensando esattamente il ritardo del primo passaggio. L'effetto netto è un filtraggio con **ritardo di fase nullo**.

L'Aneddoto del Reviewer e i Nanotubi di Carbonio Qualche anno fa, descrivendo in un articolo sperimentale l'effetto di un elettrodo ricoperto con un film sottile di **nanotubi di carbonio**, la mia dimostrazione era: “Vedi, la forma del potenziale extracellulare è indistinguibile da quella di un elettrodo standard senza strato”. Un *reviewer* mi ha “ammazzato” il manoscritto dicendo: “Tu hai usato un filtraggio causale, quindi la forma d'onda è alterata in entrambi i casi, rendendo il confronto poco affidabile sui dettagli fini”. Aveva ragione (è un purista), anche se io stavo confrontando due quantità alterate allo stesso modo. Da quel momento in poi, se posso, uso sempre il filtraggio a-causale per preservare la forma d'onda reale dello spike.

Introduzione allo Spike Sorting Multisito

Passiamo ora all'analisi dei treni di spike. Partendo dal segnale grezzo, passiamo al segnale MUA (passa-alto o passa-banda $> 100\text{-}200\text{ Hz}$). Questo rimuove la componente continua (offset nullo) ed esalta le variazioni rapide.

Immaginiamo di avere quattro tracce da un elettrodo **politrodo** (quattro contatti vicini). 1. **Ampiezze Diverse:** Vedo che su ciascun elettrodo ci sono segnali grandi e segnali piccoli. Con le considerazioni fatte nelle ore precedenti, posso dire: “Probabilmente queste sono unità diverse. Quelli grandi sono neuroni vicini a questo contatto, quelli piccoli sono più lontani”. 2. **Triangolazione:** La cosa interessante accade quando i contatti sono molto vicini (come nei **tetrodi**, dove la distanza è minima). Potrebbe essere che io veda lo **stesso identico neurone** su più canali contemporaneamente.

Se vedo un segnale nello stesso identico istante temporale (senza ritardi apprezzabili, dato che il mezzo è puramente resistivo e non capacitivo) ma con ampiezze o forme diverse su elettrodi diversi, ho un'informazione potentissima. Posso fare una specie di **triangolazione**.

Questo concetto è alla base dello **Spike Sorting** moderno: se l'elettrodo permette di vedere il segnale da più siti, posso usare la variabilità spaziale della forma d'onda per separare le sorgenti. Questo migliora drasticamente la capacità di distinguere due neuroni che magari, su un singolo elettrodo, avrebbero forme d'onda simili e confuse (es. uno “alto e magro” e uno “basso e grasso”), ma che visti da quattro angolazioni diverse rivelano la loro identità distinta.

Esempio di Registrazione Ippocampale

Vi mostro un altro esempio in cui si vedono i **Local Field Potentials (LFP)** e la **Multi-Unit Activity (MUA)** che si intravede. La traccia è grezza e proviene da un elettrodo che è stato inserito all'interno dell'**ippocampo**. Si tratta di una sonda con tante metallizzazioni (elettrodi indipendenti), ciascuna delle quali è rappresentata da una traccia con un colore diverso.

Vedete che soltanto in corrispondenza della zona dell'ippocampo chiamata **CA1** (dove risiedono i somi dei neuroni piramidali del CA1) sembra esserci anche questa componente *multi-unit*. Le tracce corrispondenti mostrano questi segnali frastagliati, che sono spike. Per il resto, negli altri strati, si osservano quasi esclusivamente componenti molto lente (LFP).

Algoritmi di Detezione degli Spike (*Spike Detection*)

Torniamo all'analisi della traccia MUA (grezza a media nulla). Presto avrete la necessità di detettare quando ci sono gli spike. Tipicamente si fa con un algoritmo di **attraversamento della soglia** (*threshold crossing*), che è di una banalità sconvolgente. Scegliete una soglia (un valore di ampiezza in microvolt). Poi, per ogni "santo" campione del vostro vettore (dove avete i numeri digitalizzati), verificate la condizione: "*È l'ampiezza minore della soglia?*" (se la soglia è negativa). Se no, continuo; se sì, ho trovato un evento. La prima volta che questo accade, dovete segnarvi l'evento. Altrimenti, registrereste l'attraversamento per tutti i campioni consecutivi che rimangono oltre la soglia durante il picco. Quindi, usate una variabile booleana per ricordare che siete "al di là" della soglia; la volta successiva, l'unica condizione che vi interessa è quando ritornate sopra (o sotto) per riarmare il detector.

Il Problema della Scelta della Soglia Qualunque sia l'intuizione dietro l'algoritmo, essa si scontra con la scelta della soglia. **Che soglia metto?** * Se la metto troppo alta (in valore assoluto), perdo i picchi più piccoli (i due spike piccoli nel disegno alla lavagna). * Se la metto troppo bassa, rilevo il rumore.

L'unico modo razionale è **stimare la banda del rumore**. Se ipotizzo che il rumore abbia una distribuzione **gaussiana** (normale), posso stimare la sua **deviazione standard** (σ). Dato che il valore medio è zero, posso definire un evento come tutto ciò che supera, per esempio, 3σ o 5σ . Ciascuna di queste scelte ha un'implicazione statistica: se il rumore fosse puramente gaussiano, prendendo 5σ (sulle code estreme della distribuzione), avrei un **falso positivo** una volta "ogni morte di papa". Matematicamente la gaussiana tende a zero ma non è mai zero, quindi in teoria potrebbe esserci una fluttuazione estrema, ma nei casi reali è rarissimo.

Il Problema della Non-Stazionarietà e degli Outliers Tuttavia, sorgono due problemi: 1. **Stazionarietà:** Il rumore è stazionario? Se stimo la banda adesso, tra qualche minuto sarà uguale? (Elettrodi diversi non preoccupano, ma il tempo sì). 2. **Presenza del Segnale:** Non posso dire ai neuroni: "Zitti tutti, ascolto solo il rumore". Il rumore stesso è composto da attività neuronale di fondo. Inoltre, devo stimare la deviazione standard del rumore **mentre c'è attività di spiking**.

Gli spike hanno un'ampiezza grande. Anche se durano poco, sono degli **outliers** rispetto alla distribuzione del rumore di fondo. Se la frequenza di sparo è elevata, questi picchi iniziano a pesare sulla stima classica della deviazione standard (basata sulla media quadratica), facendola aumentare (“gonfiandola”). Se la stima del rumore aumenta, la mia soglia (5σ) si alza, e rischio di diventare “sordo” ai segnali più piccoli proprio quando c’è tanta attività.

Stimatori Robusti: La Mediana e il MAD

Da qualche anno, il metodo d’elezione – particolarmente per distribuzioni che sono **asimmetriche** (*skewed*) o contaminate da outliers – non usa la deviazione standard classica, ma una stima basata sulla **mediana**.

Voi sapete che media e mediana sono diverse: * **Media:** È la somma dei valori diviso il numero, pesata dalle probabilità. È molto sensibile alle code (agli spike). * **Mediana:** È il valore che crea uno spartiacque numerico (il 50% dei campioni sta sopra, il 50% sta sotto).

Se ho una distribuzione con una coda lunga (gli spike), la media viene “tirata” verso la coda. La mediana, invece, resta ancorata al centro del rumore di fondo. Io voglio che la stima del rumore sia **robusta** e non risenta dell’attività neuronale che voglio detettare.

Median Absolute Deviation (MAD) Per stimare la variabilità (la banda del rumore), si usa il **MAD** (*Median Absolute Deviation*), definito come la mediana degli scarti assoluti dalla mediana:

$$\text{MAD} = \text{median}(|x - \text{median}(x)|)$$

Per rendere questo valore comparabile alla deviazione standard classica (σ), si usa un fattore di scala. Si dimostra che per una distribuzione gaussiana:

$$\sigma \approx \frac{\text{MAD}}{0.6745} \approx 1.4826 \cdot \text{MAD}$$

Questo stimatore è **non polarizzato** e consistente. In letteratura (incluso nel nostro laboratorio), utilizziamo questo criterio: calcoliamo il MAD, lo scaliamo per ottenere una σ stimata, e fissiamo la soglia a **5 volte** questo valore.

Confronto di Robustezza: Varianza vs MAD Simulando dati artificiali con frequenze di sparo crescenti: * **Stima con Varianza Classica:** Appena aumentano gli spike (5, 10, 30 Hz), la stima del rumore cresce rapidamente. La soglia si alza e smetto di vedere gli spike piccoli. * **Stima con MAD:** La soglia rimane praticamente costante fino a frequenze di sparo molto alte (10-15 spike al secondo). Poiché fisiologicamente i neuroni corticali raramente sparano sopra i 20 Hz mediamente, questo metodo è molto più robusto. È “sordo” agli spike e ascolta solo il rumore.

Soglia Adattiva ed Estrazione delle Forme d’Onda

È possibile rendere la soglia **adattiva**: ogni 10 secondi rifaccio il calcolo del MAD e aggiorno la soglia. Questo compensa eventuali *drift* (derive) dovuti

a cambiamenti di temperatura, polarizzazione dell'elettrodo o adsorbimento di molecole biologiche sulla superficie, che potrebbero alterare l'impedenza e quindi il rumore termico.

Una volta calcolata la soglia (es. $5 \times \sigma_{MAD}$):

1. **Detezione:** Identifico l'istante di attraversamento. Posso lavorare sul valore assoluto del segnale $|V(t)|$ per catturare sia picchi positivi che negativi.
2. **Allineamento (Taglia e Cuci):** Dopo essermi segnato l'istante, vado a prendere un segmento temporale (*chunk*) che inizia qualche millisecondo prima e finisce qualche millisecondo dopo l'evento.

Voglio allinearli per cogliere l'intera forma d'onda (*waveform*). Se ho un tetrodo (quattro tracce), per ogni evento rilevato su un canale, estraggo i segmenti corrispondenti su **tutti e quattro i canali** simultaneamente. Questo crea una "famiglia" di curve per ogni elettrodo, pronte per la fase successiva: lo *spike sorting*.

Estrazione delle Feature e Spazio delle Caratteristiche

Una volta allineate le forme d'onda, cosa ne facciamo? Se le sovrapponiamo tutte, vediamo un "groviglio". In alcuni casi (come nell'esempio del tetrodo), si distinguono chiaramente due gruppi: uno con ampiezza grande (magari fluttuante) e uno con ampiezza piccola. Ha senso farlo a occhio? Forse no. Ha senso estrarre delle **feature** (caratteristiche) quantitative.

Feature Intuitive vs Data-Driven

1. **Feature Intuitive:** Ampiezza al picco, durata (half-width), area sottesa.
2. **Feature Spettrali:** Potrei prendere la trasformata di Fourier di ogni singola forma d'onda e usare come feature l'ampiezza o la fase dei coefficienti alle frequenze dominanti.

La speranza è che, proiettando ogni spike in uno spazio definito da queste feature (es. un grafico 2D con Ampiezza su X e Durata su Y), i punti non si distribuiscano in un continuum (come l'altezza delle persone in un'aula), ma formino dei **blob** (nuvole) separati. Una distribuzione **bimodale** mi permette di tracciare una linea di separazione: "Tutto quello che sta sotto è l'unità 1, quello che sta sopra è l'unità 2".

Analisi delle Componenti Principali (PCA) Nel caso più generale, abbandonano l'idea di scegliere io le feature a priori (potrei sbagliare o scegliere feature correlate, come ampiezza e area) e chiedo ai dati: "Qual è il set migliore di feature per discriminare le waveform?". Qui entra in gioco l'**Analisi delle Componenti Principali (PCA)**.

Se consideriamo ogni forma d'onda (composta da N campioni) come un punto in uno spazio a N dimensioni, la PCA trova una base ortonormale che massimizza la varianza dei dati. * La **Prima Componente Principale (PC1)** è la direzione lungo la quale i dati variano di più. * La **Seconda Componente (PC2)** è ortogonale alla prima e cattura la massima varianza residua, e così via.

Spesso, usando solo le prime 2 o 3 componenti principali, si riesce a spiegare il 94-95% della varianza del segnale. Questo è un formidabile algoritmo di **compressione** e di estrazione di feature *data-driven*.

Clustering e il Problema Inverso

Proiettando gli spike nello spazio delle prime componenti principali (es. PC1 vs PC2), posso finalmente vedere se i blob si separano. Se vedo 5 blob distinti (rossi, gialli, verdi, blu, fucsia), potrei dire: “Ci sono 5 neuroni”. Ma qui sorge il problema inverso: * **Quante classi ci sono davvero?** Sono 5 o sono 21? * **Adattamento e Bursting:** E se due blob vicini fossero in realtà **lo stesso neurone** che cambia forma d’onda nel tempo? Come vi ho raccontato parlando dell’adattamento, quando un neurone spara un treno di spike (*burst*), i canali del Sodio si inattivano parzialmente. L’ultimo spike del treno è più “basso” e ha una velocità di salita minore rispetto al primo. Un algoritmo “stupido” vedrebbe due forme diverse e le classificherebbe come due neuroni diversi (sovrastima delle unità). * **Sovrapposizione:** Se due spike avvengono quasi contemporaneamente, la forma d’onda risultante è la somma. L’algoritmo la vedrà come una forma strana e la classificherà come un “neurone N+1” o la scarcerà come rumore.

L’Esperimento dell’“Elettrodo Fagocitato” Per risolvere l’ambiguità del “chi è chi”, qualche anno fa in un progetto europeo abbiamo tentato un approccio radicale: costringere il neurone a “mangiare” l’elettrodo. Abbiamo usato elettrodi a forma di funghetto (*gold mushroom*), con un gambo e una testa di circa 1 micrometro, decorati con peptidi che stimolano l’**endocitosi** (o fagocitosi/pinocitosi). La cellula riconosce i peptidi e cerca di inglobare la particella d’oro. Crea un anello di actina che stringe il collo del funghetto, sigillando la giunzione .

Il risultato? Un accoppiamento elettrico perfetto. Da quell’elettrodo registravamo **solo ed esclusivamente una unità**. Non c’era bisogno di *spike sorting* o di algoritmi complicati: la corrispondenza era 1:1. Questo è l’unico modo (oltre al patch clamp) per avere la certezza assoluta della sorgente.

Algoritmi di Clustering Automatico

Tornando al caso standard (senza fagocitosi), esistono algoritmi per automatizzare la separazione dei blob: 1. **K-Means:** Dovete dirgli a priori quanti cluster (K) cercare. 2. **Mixture of Gaussians:** Modella i dati come sovrapposizione di distribuzioni gaussiane (media e varianza). 3. **Superparamagnetic Clustering (SPC):** Inventato da **Rodrigo Quian Quiroga** (il “tizio” delle cellule di Jennifer Aniston). Sfrutta un’analogia con la fisica dei sistemi magnetici (transizioni di fase) per identificare cluster anche di forma irregolare o non sferica, senza dover specificare a priori il numero di classi. È uno dei metodi più potenti attualmente.

Tuttavia, nessun metodo è perfetto (“There is no free lunch”). Il problema dello *spike sorting* rimane un problema mal posto.

Analisi dei Segnali Intracellulari

Infine, chiudiamo con l'analisi dei dati intracellulari (dove siete voi con l'elettrodo dentro la pancia del neurone). Qui l'analisi è molto più potente perché potete **stimolare** la cellula.

Protocolli di Stimolazione Nei dati che avete o in un esperimento reale, potete iniettare diverse forme d'onda di corrente per caratterizzare la cellula: 1. **Gradini (Steps)**: Correnti costanti positive (depolarizzanti) o negative (iperpolarizzanti) di ampiezza variabile. 2. **Rampe**: Corrente che cresce linearmente per trovare la soglia esatta di sparo. 3. **Sinusoidi (Chirp)**: Oscillazioni a frequenza crescente (come abbiamo visto per le sinapsi elettriche e la risonanza). 4. **Rumore**: Iniezione di una traccia fluttuante stocastica (ne parleremo l'anno prossimo per chi sopravvive, ha senso per l'analisi teorica dell'informazione).

Estrazione di Feature per la Classificazione Da queste risposte potete estrarre parametri quantitativi (*feature*) per classificare il neurone: * **Costante di tempo della membrana** (τ_m): Dal fit dell'esponenziale di carica/scarica. * **Reobase**: La minima corrente necessaria per far sparare il neurone. * **Adattamento**: Quanto rallenta la frequenza di sparo durante un treno di spike. * **After-Hyperpolarization (AHP)**: La profondità e la durata dell'iperpolarizzazione dopo lo spike. * **Larghezza dello Spike**: Distingue piramidali (larghi) da interneuroni *fast-spiking* (stretti).

Mettendo queste feature in un classificatore, potete dire: “Tu sei un neurone piramidale dello strato 5”, “Tu sei un interneurone Martinotti”, ecc.

Conclusione del Corso

And that's it. Sapete dove trovarmi. Non esitate a contattarmi se avete domande o problemi, sono ben lieto di rispondere. Prendiamo un appuntamento. È facile che durante le feste natalizie io non risponda alle email, ma da gennaio in avanti contate su di me.

Grazie a tutti e buona fortuna.