ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

CARLO DOLCINI, BIANCAMARIA DOLCINI

Un metodo per la determinazione rapida della "tensione isometrica" nei preparati muscolari di rana esculenta

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 34 (1963), n.2, p.
210-215.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1963_8_34_2_210_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Fisiologia. — *Un metodo per la determinazione rapida della « tensione isometrica » nei preparati muscolari di rana esculenta* ^(*). Nota di CARLO DOLCINI e di BIANCAMARIA DOLCINI, presentata ^(**) dal Socio G. AMANTEA.

La necessità di tenere in considerazione, quantitativamente, il *carico* (P) in rapporto alla *tensione isometrica* (Po) del preparato, in occasione di ogni esperimento di derivazione isotonica dell'attività meccanica muscolare, non è così ovvia come sembrerebbe, se la maggior parte dei ricercatori ritiene sufficiente, descrivendo prove del genere, limitarsi a parlare di *carico opportuno*, mentre altri addirittura non riferiscono esplicitamente nulla circa la suddetta condizione sperimentale. Tralasciando di occuparci più a lungo del secondo modo di procedere, manifestamente ingiustificato, abbiamo indagato in letteratura per vedere se la dizione *carico opportuno* potesse avere qualche riferimento quantitativo, almeno convenzionale, con i fattori *carico* e *tensione isometrica*, o meglio con il loro rapporto, cioè con il *carico* espresso come frazione della *tensione isometrica*. Ma per *carico opportuno* non intendono altro che quel *determinato carico*, per di più non sempre specificato quantitativamente, impiegando il quale il fenomeno in studio può essere osservato. E ciò è insufficiente; non si afferma infatti niente più di una generica opportunità.

In prove dove i fattori che intervengono, oltre a quelli di volta in volta studiati, sono numerosi e spesso difficilmente controllabili, non vediamo come si possa fare a meno di valutare quantitativamente e standardizzare quel poco per cui tale possibilità sussiste. Pertanto il modo di procedere in questione va senz'altro considerato un rifiuto operativo a pervenire a risultati di qualche importanza, né vediamo come giudicare altrimenti tale condotta sperimentale.

Chiariamo il nostro pensiero con un esempio: il materiale di registrazione isotonica riguardante il *fenomeno della scala* nel muscolo scheletrico può essere studiato riportando il profilo ascendente dei tracciati su un sistema di assi cartesiani; in tal modo la pendenza delle curve viene utilizzata per una valutazione dell'intensità del fenomeno stesso in funzione di eventuali trattamenti. Ma tale pendenza, come si può dimostrare sperimentalmente, è anche funzione del *carico* espresso come frazione di Po. Se non si prende in considerazione tale rapporto ⁽¹⁾, sarà poi impossibile distinguere tra le modificazioni indotte dal trattamento e quelle dovute esclu-

(*) Lavoro eseguito nell'Istituto di Fisiologia Umana dell'Università di Perugia.

(**) Nella seduta del 12 gennaio 1963.

(1) U. ZINGONI « Archivio di Fisiologia » 54, 197 (1954).

sivamente alla diversità delle condizioni meccaniche. Ricerche più proficue ⁽²⁾ sono infatti eseguite, sempre sul *fenomeno della scala*, in condizioni isometriche, cioè con rapporto *carico/Po* sempre uguale ad 1; i trattamenti sperimentali pertanto saranno in tal caso legittimamente confrontabili.

Ma una parziale giustificazione del comportamento operativo criticato si può trovare nel fatto che le misurazioni di *Po* non sono in effetti agevoli se debbono essere ottenute direttamente o mediante la formula $P_{1, \max} = Po/3,3$ dove $P_{1, \max}$ indica il *carico* con il quale è stato ottenuto l'effetto meccanico (*lavoro*) *massimale* ⁽³⁾. In entrambi tali casi sono necessarie prove relativamente numerose, eseguite facendo sollevare al preparato pesi scalari e, distanziate nel tempo, onde assicurarsi che ciascuna scossa non risenta della precedente. Il fattore tempo viene dunque ad assumere considerevole importanza.

Quanto riferito ci ha indotti a prendere in considerazione l'opportunità di poter accedere alla misura di *Po* in modo molto più rapido ed agevole mediante una derivazione della equazione di Hill (la cosiddetta equazione di stato del muscolo), particolarmente adatta al nostro scopo, essendo stata definita mediante esperimenti condotti proprio sul muscolo scheletrico della *rana esculenta* ⁽²⁾.

$$(1) \quad (P + a)(V + b) = (Po + a)b = K$$

Nella (1) *P* simbolizza la *tensione* o *carico*, *V* la *velocità di contrazione*, *Po* la *tensione isometrica*; *a* e *b* sono costanti che hanno rispettivamente le dimensioni di una forza e di una velocità e che sono calcolabili mediante le relazioni:

$$(2) \quad a = (1/4) Po$$

$$(3) \quad b = (a/Po) \cdot V_{\max} = (1/4) V_{\max}$$

dove $V_{\max}$ indica la velocità di contrazione del preparato senza alcun carico. Anche le relazioni (2) e (3) sono state definite sperimentando ad una temperatura di 0° C. sul gastrocnemio isolato di *rana esculenta* ⁽⁴⁾. Sostituendo nella (1) le costanti *a* e *b* con le espressioni relative ricavate dalla (2) e dalla (3) si ottiene:

$$(4) \quad (P + 1/4 Po)(V + 1/4 V_{\max}) = K.$$

Siccome per prove successive opportunamente distanziate possiamo dimostrare sperimentalmente (vedi oltre) che le costanti caratteristiche dell'equazione di stato del muscolo (*Po*, *a* e *b*) non si modificano, almeno in modo

(2) S. HAJDU e A. SZENT-GYÖRGYI «Amer. J. Physiol.», 168, 159, (1952).

(3) R. MARGARIA e L. DE CARO, *Principi di Fisiologia Umana*, vol. II, p. 1474.

(4) A. V. HILL, «Proc. Roy. Soc. Lond.», B 136 (1938).

apprezzabile, tale cioè da dare differenze significative all'analisi delle medie, siamo autorizzati ad utilizzare il seguente sistema:

$$(5) \quad \begin{cases} (P_1 + 1/4 P_0)(V_1 + 1/4 V_{\max}) = K \\ (P_2 + 1/4 P_0)(V_2 + 1/4 V_{\max}) = K \end{cases}$$

da cui eguagliando le due equazioni si ottiene:

$$(6) \quad (P_1 + 1/4 P_0)(V_1 + 1/4 V_{\max}) = (P_2 + 1/4 P_0)(V_2 + 1/4 V_{\max})$$

e quindi:

$$(7) \quad \frac{P_1 + 1/4 P_0}{P_2 + 1/4 P_0} = \frac{V_2 + 1/4 V_{\max}}{V_1 + 1/4 V_{\max}}$$

che esplicitata rispetto a P_0 dà:

$$(8) \quad P_0 = \frac{P_2(4V_2 + V_{\max}) - P_1(4V_1 + V_{\max})}{V_1 - V_2}$$

Ne deriva che, per pervenire a misure di P_0 sono necessarie soltanto tre prove, due eseguite rispettivamente con carico P_1 e P_2 e l'ultima con carico uguale a zero per la valutazione di $V_{\max}$.

Tecnicamente tali prove vanno eseguite ad intervalli di $2'$, su chimo-grafo ruotante a velocità tale da consentire una registrazione cronografica dei centesimi di secondo.

A questo punto è opportuno notare come, con il procedimento descritto, si pervenga alla valutazione della *tensione isometrica* indirettamente, cioè mediante calcolo a partire dai dati ottenuti da misurazioni eseguite sul substrato in attività isotonica. Tali misurazioni inoltre, appunto per la struttura del sistema di equazioni utilizzato, non possono essere eseguite contemporaneamente. Donde la necessità di ricercare se durante gli intervalli di tempo intercorrenti avvengano modificazioni della *tensione isometrica* stessa, e di studiare eventualmente il modo di ovviare all'inconveniente o quanto meno quello di tenerne il debito conto.

Altre considerazioni poi ci hanno guidati nella scelta della condotta operativa.

Sono infatti ben noti insieme con le relative numerose ipotesi esplicative il *fenomeno della scala* ⁽⁵⁾ ed altre manifestazioni analoghe, quali ad esempio il *potenziamento post-extrasistolico* ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾, rilevabili in condizioni sperimentali generalmente caratterizzate da stimolazione ripetuta di varia frequenza e di intensità massimale o sopramassimale. Meno noto è tuttavia, a giudicare

(5) H. P. BOWDITCH, « Ludwigs Art. », 6, 139, (1891).

(6) A. S. SIEBENS, B.F. HOFFMANN, P. F. CRAMFIELD. « Amer. J. Physiol. », 183, 662 (1955).

(7) K. MCCAHEL, H. GOLD, « Amer. J. Physiol. », 182, 307 (1955).

dai riferimenti espliciti riscontrati in letteratura, come in tali fenomeni, consistenti in modificazioni dell'ampiezza delle singole scosse di una serie, non possa verificarsi altro che una variazione di P_0 in funzione del tempo, quando l'esperimento è eseguito in condizioni meccaniche ed elettriche costanti e controllate.

Ciò riferiamo nella eventualità che le tre prove, necessarie ad ottenere i dati da introdurre nell'espressione (8) per il calcolo P_0 , vengano eseguite ad intervalli di tempo che non garantiscano da interferenze. Poco studiato, infatti, e quindi incerto, risulta il limite minimo di frequenze per cui i ricordati fenomeni di graduazione si realizzano. Per tali fenomeni nel nostro caso risulta preclusa ogni possibilità di valutazione anche approssimata, perché le tre scosse muscolari sono ottenute in condizioni meccaniche varie, con i carichi P_1 , P_2 e 0. Anche se ciò non fosse, risulterebbe comunque problematica la correzione del valore P_0 calcolato per gli effetti della graduazione, a meno di non voler considerare tale valore, un po' troppo semplicisticamente, una media dei valori effettivi e sconosciuti in atto al momento di ciascuna delle tre prove.

La soluzione migliore sembra pertanto quella di operare ad intervalli studiati sperimentalmente e tali da escludere l'inconveniente suddetto, tenendo inoltre presente, al fine di garantirsi da altri e per l'ovvia ragione del risparmio di tempo, la esigenza opposta di dare il minore intervallo possibile alle prove in questione.

Appunto le prove i cui risultati sono riassunti ed analizzati nella Tabella I ci hanno permesso di stabilire l'intervallo di tempo minimo tra le tre contrazioni successive, necessario a garantire che l'influenza della precedente sulla seguente si annulli con certezza.

A tale scopo abbiamo eseguito 10 replicazioni di 8 esperimenti, impiegando preparati neuromuscolari di *rana esculenta*, in camera umida a temperatura di 0°C , caricati con $1/3 P_0$, (dove P_0 rappresenta la *tensione isometrica*, previamente determinata con metodo diretto) e stimolati a corrente costante nel preparato ed a voltaggio sopramassimale, con fattore sperimentale *intervallo di tempo fra le scosse* ed effettuando rilevamenti sul carattere *ampiezza delle singole scosse*.

Il fattore sperimentale si presenta così secondo tre modalità:

- A) intervallo di tempo da una scossa precedente praticamente infinito;
- B) intervallo di tempo da una scossa precedente variabile da $2''$ a $2'$;
- C) intervallo di tempo da una serie di due scosse, precedenti ed ugualmente distanziate, variabile da $2''$ a $2'$.

Pertanto abbiamo potuto stabilire nell'ambito di ciascun esperimento tre confronti tra le medie ottenute per le 10 replicazioni dello stesso trattamento.

Per quanto riguarda invece il rilevamento del carattere sperimentale *ampiezza delle manifestazioni meccaniche* i dati sono stati semplificati considerando uguale a zero l'oscillazione minore e sottraendo il suo valore dalle altre due, nell'ambito di ciascuna replicazione.

TABELLA I
 Confronti e risultati dell'analisi delle medie (spiegazioni nel testo).

Numero ordine esper.	Fattore sperimentale	Replicazioni	A	{A-B}	B	{B-C}	C	{A-C}
			t_{calc} t_{tab} P %	t_{calc} t_{tab} P %	t_{calc} t_{tab} P %	t_{calc} t_{tab} P %	t_{calc} t_{tab} P %	t_{calc} t_{tab} P %
I	(2'')	10	$\bar{X}_{AI} = 18,2$ $D_{AI} = 157,6$	$\bar{X}_{BI} = 6,6$ $D_{BI} = 128,4$	$\bar{X}_{CI} = 0,0$ $D_{CI} = 0,0$	$13,787 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)	$13,787 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)	$13,787 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)
II	(5'')	10	$\bar{X}_{AII} = 38,3$ $D_{AII} = 1030,1$	$\bar{X}_{BII} = 8,8$ $D_{BII} = 449,6$	$\bar{X}_{CII} = 0,0$ $D_{CII} = 0,0$	$3,928 > 3,922 < 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)	$11,331 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)	$11,331 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)
III	(10'')	10	$\bar{X}_{AIII} = 13,8$ $D_{AIII} = 125,6$	$\bar{X}_{BIII} = 6,7$ $D_{BIII} = 28,1$	$\bar{X}_{CIII} = 0,0$ $D_{CIII} = 0,0$	$11,960 > 3,922 < 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)	$11,695 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)	$11,695 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)
IV	(15'')	10	$\bar{X}_{AIV} = 13,5$ $D_{AIV} = 350,6$	$\bar{X}_{BIV} = 5,4$ $D_{BIV} = 196,4$	$\bar{X}_{CIV} = 0,0$ $D_{CIV} = 0,0$	$3,660 > 2,878 < 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)	$6,852 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)	$6,852 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)
V	(30'')	10	$\bar{X}_{AV} = 14,4$ $D_{AV} = 508,4$	$\bar{X}_{BV} = 5,7$ $D_{BV} = 180,1$	$\bar{X}_{CV} = 1,3$ $D_{CV} = 60,1$	$2,699 > 2,552 < 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++)	$5,219 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)	$5,219 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)
VI	(1')	10	$\bar{X}_{AVI} = 9,1$ $D_{AVI} = 66,9$	$\bar{X}_{BVI} = 5,10$ $D_{BVI} = 146,9$	$\bar{X}_{CVI} = 2,50$ $D_{CVI} = 146,5$	$1,733 > 1,330 < 20^{\circ}/_{\infty}$ (++)	$4,285 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)	$4,285 > 3,922 > 1^{\circ}/_{\infty}$ (+++++)
VII	(1'30'')	10	$\bar{X}_{AVII} = 8,2$ $D_{AVII} = 145,6$	$\bar{X}_{BVII} = 4,7$ $D_{BVII} = 112,1$	$\bar{X}_{CVII} = 3,50$ $D_{CVII} = 186,5$	$0,659 > 0,534 < 60^{\circ}/_{\infty}$ (+)	$2,447 > 2,101 > 5^{\circ}/_{\infty}$ (++)	$2,447 > 2,101 > 5^{\circ}/_{\infty}$ (++)
VIII	(2')	10	$\bar{X}_{AVIII} = 2,10$ $D_{AVIII} = 30,9$	$\bar{X}_{BVIII} = 2,20$ $D_{BVIII} = 27,6$	$\bar{X}_{CVIII} = 2,10$ $D_{CVIII} = 38,9$	$0,117 < 0,127 < 90^{\circ}/_{\infty}$ —	$0,000 < 0,127 < 90^{\circ}/_{\infty}$ —	$0,000 < 0,127 < 90^{\circ}/_{\infty}$ —

Per i simboli introdotti nella testata della Tabella specifichiamo quanto segue: P = probabilità che le differenze tra medie analizzate sia dovuta al caso, $t_{\text{calc.}}$ = *indice di Fischer* calcolato secondo la formula:

$$t = \frac{\bar{X}_0 - \bar{X}_1}{\sqrt{\left(\frac{1}{N_0} + \frac{1}{N_1}\right) \frac{D_0 + D_1}{g_0 + g_1}}}$$

dove rispettivamente N, D e g indicano la *numerosità*, la *devianza* ed i *gradi di libertà*. I segni (+), presenti in numero di 0, 1, 2, 3, 4, 5, si riferiscono ai livelli di significatività rispettivamente maggiori al 10%, pari al 10%, 5%, 2%, 1%, ed all'1/∞.

La non significatività tra la differenza delle medie ottenute per tutti i confronti dell'ultimo esperimento, indica che con l'intervallo di 2', fattore sperimentale in questo caso, le differenze stesse sono dovute con probabilità molto elevata al caso piuttosto che al trattamento, in altre parole che l'intervallo di 2' è sufficiente ad abolire gli effetti delle scosse precedenti sulle seguenti, limitatamente alla serie di *tre*, da noi presa in considerazione. Ciò significa che i dati necessari per il calcolo di P_0 possono essere legittimamente utilizzati anche se ottenuti non contemporaneamente, cioè mediante prove distanziate di 2', tempo sufficiente a che meccanismi operanti in senso contrario compensino quegli altri responsabili dei fenomeni di graduazione ricordati, in particolare del *fenomeno della scala*.

Qualora la tecnica di misura proposta venga applicata utilizzando un dispositivo nel quale il preparato contraendosi solleva parte del proprio peso (1/2 come generalmente si ammette), ovviamente non si perviene a valori assoluti di P_0 poichè la prova per la valutazione di V_{max} non è eseguita come previsto con carico P uguale a zero. Esiste comunque in tal caso la possibilità di valutare percentualmente gli scarti tra i valori ottenuti secondo le due modalità e di determinare quindi un fattore di correzione.

Riteniamo la tecnica proposta vantaggiosa, oltre che per l'evidente risparmio di tempo, soprattutto perchè le prove necessarie per il calcolo, tre soltanto, non modificano assolutamente ai fini dei risultati quantitativi e qualitativi eventualmente studiati, le condizioni iniziali del preparato.

Riferendoci ancora a quanto abbiamo voluto rilevare nella introduzione alla presente Nota, sottolineiamo la necessità di procedere comunque a valutazione del carico, in rapporto a P_0 , all'inizio ed alla fine di qualsiasi esperimento di registrazione isotonica dell'attività meccanica del muscolo, ed a riferirne esplicitamente.

Precisiamo altresì che la tecnica studiata è legittimamente applicabile soltanto ai preparati di *rana esculenta* a meno di una previa accurata verifica delle costanti a e b per eventuali preparati di altra provenienza o degli stessi studiati in ambiente a temperatura superiore a 0°C.