

Министерство образования и науки Российской Федерации

Нижегородский государственный университет
им. Н.И. Лобачевского
Национальный исследовательский университет

Учебно-научный и инновационный комплекс
«Физические основы информационно-телекоммуникационных
систем»

Мухина И.В.
Грибков А.Л.

РЕГИСТРАЦИЯ И ИЗМЕРЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ
ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ НЕРВА ЛЯГУШКИ
ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА

(Электронное учебно-методическое пособие)

Мероприятие 1.2. Совершенствование образовательных технологий, укрепление материально-технической базы учебного процесса

Учебная дисциплина: «Физиология и биофизика возбудимых систем»

Направления: «Биология», «Биофизика», «Радиофизика»

Нижегород
2010

УДК 591.181
ББК Е903.9
Р31

РЕГИСТРАЦИЯ И ИЗМЕРЕНИЕ ПАРАМЕТРОВ ПОТЕНЦИАЛА ДЕЙСТВИЯ
НЕРВА ЛЯГУШКИ: Практикум. Составители: Мухина И.В., Грибков А.Л. –
Нижний Новгород: Издательство Нижегородского госуниверситета, 2010. – 24
с.: ил.

Рецензент: доктор биологических наук В.А. Воденеев

Практикум содержит краткие теоретические сведения о механизмах проведения нервных импульсов в периферических нервах, изложены методики препарирования нервов и регистрации нервного импульса. Данная лабораторная работа входит в раздел большого практикума «биоэлектрические явления» .

Практикум предназначен для студентов старших курсов биологического факультета обучающихся по специальности «Биофизика. Может быть рекомендовано также для студентов радиофизического факультета, специализирующихся на кафедре нейродинамики и нейробиологии, в рамках проведения практических работ по электрофизиологии возбудимых структур.

Работа выполнена на кафедре нейродинамики и нейробиологии.

Ответственный за выпуск
председатель методической комиссии биологического факультета ННГУ
д.п.н., профессор И.М.Швец

УДК 591.181
ББК Е903.9

Глава 1. Электрические свойства нервных проводников

1.1. Вводные замечания

Нервное волокно (нервный проводник) представляет собой отросток нейрона, заключенный в глиальную оболочку. Совокупность нервных волокон образует нервные пучки, которые формируют нервный ствол, или нерв. Нервы являются составляющей частью периферической нервной системы.

Одним из методов электрофизиологических исследований периферической нервной системы является метод электрического раздражения и регистрации разности электрических потенциалов.

1.2. Краткое описание объекта исследований

Седалищный нерв лягушки выходит из спинного мозга животного и на некотором расстоянии разделяется на большеберцовый и малоберцовый, а также на боковые веточки, отходящие от всех трех нервов. Он иннервирует задние лапки лягушки и относится к периферическим нервам. Снаружи нерв покрыт соединительнотканной оболочкой периневрием. Периневрий образует своего рода каналы или периневральные трубки вдоль ствола нерва, в которых заключены определенные группы нервных волокон или пучки нервных волокон (рис.1).

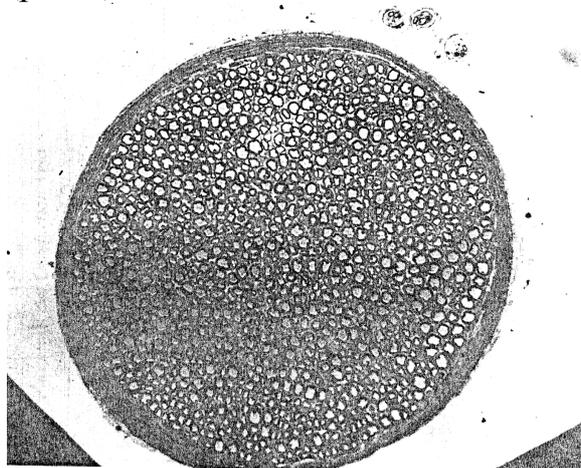


Рис.1. Микрофотография поперечного сечения одного из пучков седалищного нерва лягушки

Отдельные нервные волокна (аксоны и дендриты), входящие в состав пучков, имеют определенное анатомическое строение и функциональную значимость, и являются отростками тел нервных клеток - двигательных и чувствительных нейронов. Общее количество волокон, входящих в состав седалищного нерва, составляет $2 \cdot 10^3$, их диаметр варьирует от 3 до 29 мкм. В целом диаметр нерва может составлять от 0,8 мм и более. Длина нерва для наиболее крупных экземпляров лягушек может быть более 13 см.

Все нервные волокна подразделяются, в первую очередь, на миелинизированные, т.е. покрытые миелиновой оболочкой с перехватами Ранвье, и немиелинизированные, без миелиновой оболочки. Кроме того, нервные волокна подразделяются по диаметру волокна, скорости проведения нервного импульса и по порогу возбуждения волокна. Скорость распространения возбуждения для различных волокон в нерве изменяется от 0,4 м/с до 120 м/с.

Волокна седалищного нерва лягушки подразделяются на три большие группы: А—миелинизированные волокна с диаметром 2,5—16 мкм и скоростью проведения 15-90 м/с; В—миелинизированные вегетативные волокна с диаметром около 3 мкм и скоростью проведения 10-15 м/с и С - немиелинизированные волокна с диаметром не более 2 мкм и скоростью проведения 1-2 м/с. Группа А в свою очередь может быть разделена на три подгруппы: α , β и γ . Величины скоростей проведения для волокон группы А седалищного нерва лягушки составляют: A_α - 42 м/с, A_β - 25 м/с, A_γ - 16 м/с .

Нервы хладнокровных животных представляют удобный объект для исследований в силу их способности проводить нервные импульсы длительное время при помещении их во влажную среду раствора Рингера.

1.3. Физиологические основы проведения нервного импульса по нервному проводнику

Отдельное нервное немиелинизированное волокно можно рассматривать как цилиндрический проводник, внутреннее содержимое которого - аксоплазма отделена от внеклеточной жидкости, омывающей нерв, цитоплазматической мембраной. Мембрана нервного волокна имеет толщину порядка 80-100 Å. Таким образом, нервные волокна обладают кабельными (пассивными электрическими) свойствами, мембрана обладает электрической емкостью и сопротивлением, аксоплазма и внеклеточная жидкость - электрическим сопротивлением (рис. 2а), сопротивлением внеклеточной жидкости как правило, пренебрегают по сравнению с другими сопротивлениями.

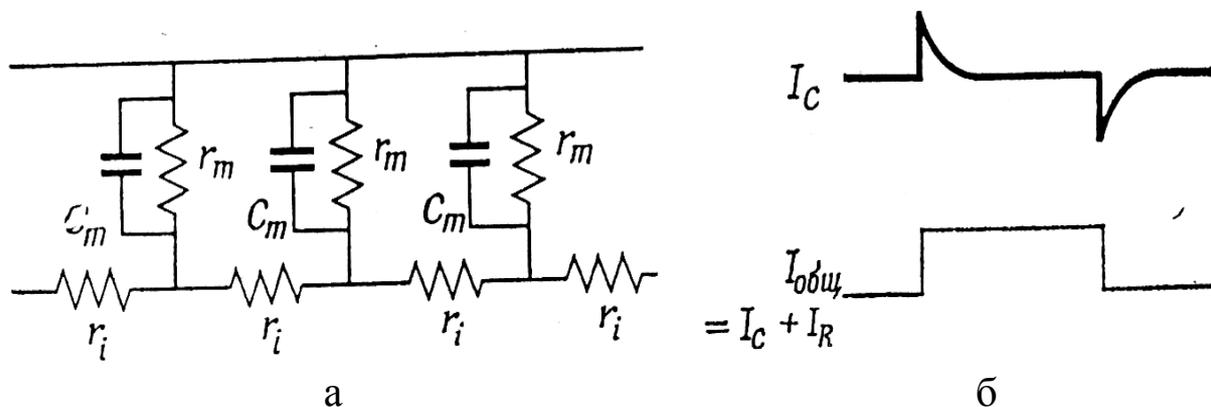


Рис. 2. а-эквивалентная электрическая схема для немиелинизированного нервного волокна. Здесь c_m -электрическая емкость мембраны на единицу длины, r_m - сопротивление мембраны на единицу длины, r_i - сопротивление аксоплазмы нерва на единицу длины. б-токи текущие через мембрану

Если в одиночный аксон ввести микроэлектрод и пропустить через него прямоугольный импульс тока положительной направленности и амплитуды ниже пороговой, то он может быть зарегистрирован отводящими электродами на определенном расстоянии от стимулирующего электрода. Общий ток протекающий через мембрану, показан на рис.2б, и состоит из емкостного тока

I_{cm} и тока I_{rm} , текущего через сопротивление r_m . Положительный импульс емкостного тока соответствует заряду емкости c_m , а отрицательный—разряду, после окончания прямоугольного импульса.

Сам пассивный импульс распространяется вдоль волокна с декрементом затухания от расстояния. Если амплитуда этого импульса превышает определенный порог, то возникает процесс генерации нервного импульса в месте расположения микроэлектрода. В этом случае мембрана нервного волокна ведет себя активно.

Нервный импульс или потенциал действия (ПД) представляет собой сложный биологический процесс, который распространяется с определенной скоростью от места раздражения вдоль нервного волокна.

В состоянии покоя внутренняя сторона мембраны волокна заряжена отрицательно по отношению к внешней стороне мембраны, разность потенциалов между ними составляет около 70 мВ и называется потенциалом покоя нервного волокна. Такая разность потенциалов обусловлена электрохимическим градиентом ионов. Основными потенциалобразующими ионами являются ионы калия K^+ , менее важную роль играют ионы Na^+ , Ca^{2+} и Cl^- . Кроме того, на потенциал покоя влияет избирательная проницаемость мембраны по отношению к потенциалобразующим ионам, обусловленная наличием в мембране высокоселективных ионных каналов. В состоянии покоя мембрана нервного волокна проницаема для ионов калия и почти не проницаема для ионов натрия. Потенциал покоя определяется также действием трансмембранных ионных насосов, поддерживающих определенную концентрацию этих ионов внутри и вне нервного волокна. Активный транспорт ионов против градиента концентрации связан с затратой энергии, основным источником которой является аденозинтрифосфат (АТФ).

Для понимания механизма формирования потенциала на мембране удобно рассмотреть ее электрическую модель (рис.3), описанную А.Л. Ходжкиным, А.Ф. Хаксли и Б. Катцем.

Здесь сопротивление r представляет собой сопротивление осевого электрода, который связывает разные участки мембраны. Каждый элемент мембраны, представленный на рис. 3, содержит емкость мембраны C , калиевую и натриевую батареи E_K и E_{Na} и сопротивления R_K и R_{Na} . Сопротивление утечки R_l и батарея E_l введены для учета движения ионов, проходящих по каналам, которые не изменяются во время активности. Однако ток утечки мал, и в первом приближении его можно не принимать во внимание. Зная величину калиевого и натриевого тока, нетрудно оценить проводимость мембраны для каждого иона.

При подпороговых значениях деполяризации выходящий калиевый ток больше входящего натриевого, что препятствует достижению мембранным потенциалом порога. Как только входящий Na^+ -ток хотя бы слегка превысит выходящий K^+ -ток, мембранный потенциал неизбежно начнет смещаться регенеративным образом в сторону E_{Na} .

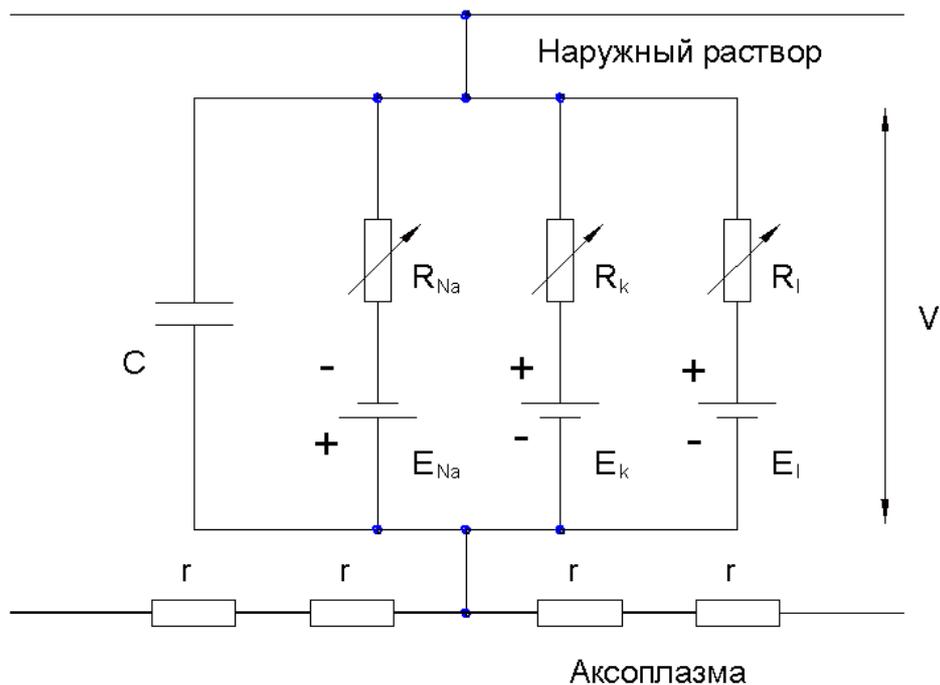


Рис. 3. Эквивалентная электрическая схема элемента возбудимой мембраны аксона: r – сопротивление осевого электрода, введенного в аксон, C – емкость мембраны, E_K и E_{Na} – калиевая и натриевая батареи, R_K и R_{Na} – сопротивления K^+ и Na^+ каналов, R_l – сопротивление утечки и E_l – батарея утечки [3]

Мембранный потенциал, при котором наблюдается равновесие входящих и выходящих токов ионов, называется потенциалом равновесия или равновесным потенциалом и рассчитывается согласно уравнению Нернста:

$$E_m = (RT/zF) \cdot \ln ([X]_o/[X]_i) \quad (1.1),$$

- где R – газовая постоянная,
- T – температура по Кельвину,
- z – валентность иона,
- F – константа Фарадея,
- $([X]_o, [X]_i)$ – концентрации ионов снаружи и внутри клетки,
- E_m – равновесный потенциал.

Расчетное значение мембранного потенциала покоя согласно формуле Goldman-Hodgkin-Katz равно:

$$E_{rest} = \frac{RT}{zF} \cdot \ln \frac{P_K[K^+]_o + P_{Na}[Na^+]_o + P_{Cl}[Cl^-]_i + \dots}{P_K[K^+]_i + P_{Na}[Na^+]_i + P_{Cl}[Cl^-]_o + \dots} \quad (1.2),$$

где $P_{K, Na, Cl}$ – коэффициент мембранной проницаемости для ионов, $P = \mu RT/dF$, где μ – подвижность иона в мембране, d – толщина мембраны, R – газовая постоянная, T – температура по Кельвину, F – константа Фарадея;

- $[K^+]_o, [Na^+]_o, [Cl^-]_o$ – внеклеточная концентрация ионов;
- $[K^+]_i, [Na^+]_i, [Cl^-]_i$ – внутриклеточная концентрация ионов.
- RT/zF равно 61 при $t=37^\circ C$, 58 - при $20^\circ C$.

Избирательная проницаемость для натрия и калия (без учета вклада других ионов), от которой зависит мембранный потенциал, сама находится под

влиянием трансмембранной разности потенциалов. Деполяризация увеличивает проницаемость для натрия за счет открытия потенциалзависимых ионных каналов по принципу положительной обратной связи - снижение мембранного потенциала ведет к увеличению натриевой проводимости, что, в свою очередь, приводит с дальнейшей деполяризации и т. д.

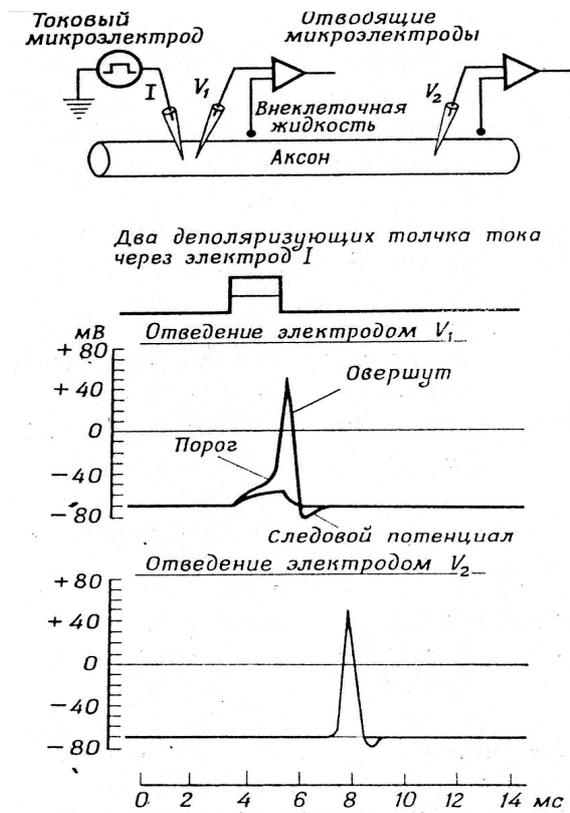


Рис. 4. Пример регистрации ПА от нервного волокна (одиночный аксон) при помощи внутриклеточных микроэлектродов [3]

Чтобы показать участие местных градуальных потенциалов при распространении нервного импульса, можно построить график распределения потенциала для какого-то момента времени. На рис. 5 импульс показан “остановившимся” во времени, в следующий момент он должен был бы сместиться вправо. Здесь точка максимума потенциала действия соответствует кратковременной реверсии потенциала покоя или овершуту, когда внутренняя сторона мембраны становится заряженной положительно по отношению к наружной. Такая смена полярности вызывает протекание токов от невозбужденных участков волокна к возбужденному. Для тех участков мембраны, где деполяризация была выше пороговой, суммарное перемещение положительных зарядов направлено внутрь, поскольку ионы натрия входят в волокно и деполяризуют соседний участок.

В участках, где деполяризация все еще не превышает порога, выходящий ток будет преимущественно емкостным; так же как для подпороговых токов,

Быстро протекающее колебание мембранного потенциала – потенциал действия или спайк имеет длительность 1-3 мс и может достигать амплитуды 100-120 мВ (рис. 4). Повышение проницаемости для натрия в результате деполяризации носит переходящий характер и прекращается вследствие процесса инактивации Na-канала и реполяризации через потенциалзависимые калиевые каналы.

Рост проводимости для калия приводит к достаточно быстрому возвращению мембранного потенциала к исходному уровню потенциала покоя. Однако возвращение к исходному уровню происходит не сразу, а с некоторым замедлением, которое называют отрицательным и положительным следовыми потенциалами.

положительные заряды скапливаются на внутренней и удаляются с наружной поверхности.

При достижении порога на соседнем участке волокна направление трансмембранного тока меняется на противоположное, начинает преобладать входящий натриевый ток. Так происходит перемещение импульса.

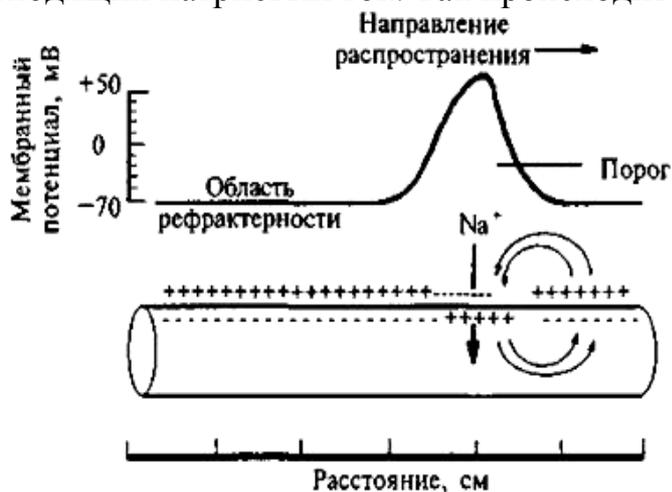


Рис. 5. Протекание токов во время проведения нервного импульса

Участок, через который импульс прошел, нельзя возбудить вновь из-за его рефрактерности, так как, это обусловлено инактивацией натриевых каналов. Токи, которые текут к возбужденному участку снаружи нервного волокна и от него, внутри аксоплазмы затухают в зависимости от расстояния до возбужденного участка, так как внеклеточная жидкость и аксоплазма имеют определенное сопротивление для токов.

Таким образом, при непрерывном проведении поверхность обладает электрогенными свойствами на всем протяжении. Поэтому малые круговые токи возникают на расстоянии в несколько микрометров. Возбуждение имеет вид постоянно бегущей волны. Размер участка мембраны, находящегося под влиянием ПД, зависит от его длительности и скорости проведения. Например, если длительность ПД равна 2 мс, а скорость его проведения 10 м/с, то потенциал действия будет на участке мембраны 2 см.

Поведение токов, текущих через мембрану аксона описывается системой уравнений Ходжкина—Хаксли:

$$\begin{aligned}
 C_M \frac{dV}{dt} &= -g_{Na} m^3 h (V - V_{Na}) - g_K n^4 (V - V_K) - g_{Cl} (V - V_{Cl}) + I_M; \\
 \frac{dm}{dt} &= \alpha_m (V) (1 - m) + \beta_m (V) m; \\
 \frac{dh}{dt} &= \alpha_h (V) (1 - h) + \beta_h (V) h; \\
 \frac{dn}{dt} &= \alpha_n (V) (1 - n) + \beta_n (V) n,
 \end{aligned}
 \tag{1.3},$$

где V - мембранный потенциал, I_M - полный ток через мембрану, $g_{Na,K,Cl}$ - величины проводимости мембраны для соответствующих типов ионов, $V_{Na,K,Cl}$ - равновесные потенциалы, m, n - переменные активации натриевых и калиевых каналов, h - переменная инактивации натриевых каналов, C_M - емкость мембраны на единицу площади, α, β - соответствующие константы скоростей [7].

Система имеет стабильное стационарное состояние в отсутствие внешних токов, но когда приложенный импульс тока выше порогового значения, демонстрирует регулярное периодическое возбуждение мембраны.

Для немиелинизированных нервных волокон скорость распространения потенциала действия зависит от диаметра нервного волокна. Скорость проведения пропорциональна квадратному корню из диаметра волокна $v \sim \sqrt{D}$. Эта экспериментально установленная зависимость находится в полном соответствии с предсказаниями кабельной теории проведения (кабельными уравнениями). Немиелинизированные волокна обладают относительно низкими скоростями проведения импульсов.

Для миелинизированных волокон характерны более высокие скорости проведения, так как происходит скачкообразное или сальтаторное проведение нервного импульса. Это обусловлено несколько другим анатомическим строением миелинизированного волокна. В волокнах этого типа аксоны покрыты миелином. На периферии ЦНС миелин образуют шванновские клетки, которые в процессе онтогенеза обвиваются вокруг аксонов. Так как плотно соприкасающиеся мембраны клеток имеют высокое сопротивление и малую емкость, такая оболочка действует как изолирующий материал. Удельное сопротивление ее составляет 500—800 мОм·см² при очень низкой емкости 0,0025—0,005 мкф/см². Через промежутки порядка 1 мм миелин прерывается, оставляя открытыми участки мембраны аксона (перехваты Ранвье) шириной порядка 1 мкм. Так как ионы не могут входить в нервное волокно или выходить из него через высокое сопротивление миелинизированных участков, ионные токи идут при возбуждении через участки с относительно низким сопротивлением в перехватах Ранвье, где находится максимальное количество управляемых потенциалчувствительных натриевых каналов - 12 000 на 1 мкм. Благодаря тому, что в этих участках участвует лишь очень небольшая область мембраны, для смещения мембранного потенциала достаточно небольшого количества зарядов. В результате импульс распространяется быстрее и перескакивает от перехвата к перехвату, отсюда термин сальтаторное проведение. Скорость распространения для миелинизированных волокон становится пропорциональной диаметру волокна, $v \sim D$. Такая прямая зависимость величины скорости проведения возбуждения от диаметра волокна объясняется следующим. Скорость сальтаторного проведения при данном диаметре волокна D зависит от длины L межперехватных участков: в определенных пределах с увеличением L скорость проведения возрастает. Длина же межперехватных участков, как показали морфометрические исследования, примерно пропорциональна диаметру волокна. Правда, у различных животных отношение L/D различно, но постоянно для определенного вида животного, например, для лягушки L/D равно 205.

Миелинизированные нервные волокна характеризуются еще фактором надежности распространения нервного импульса. Действительно, когда текут возвратные токи к возбужденному перехвату от невозбужденных участков снаружи и внутри аксоплазмы, они захватывают не только ближайший перехват, но и последующие. При поврежденном ближайшем перехвате ПД

может перескочить на последующие, минуя поврежденный. Фактор безопасности численно равен:

$$f = U_s / U_t \quad (1.4),$$

где U_s —амплитуда потенциала действия, а U_t — пороговый потенциал [7]. Таким образом, потенциал действия, схематически показанный на рис. 4, имеет следующие особенности:

1. Импульс в виде ПД не градуален, для него существует определенный порог. После того как импульс возник, его амплитуда не зависит от амплитуды стимула. Увеличение силы стимулирующего тока не ведет к увеличению амплитуды ПД, а увеличение длительности стимула не ведет к его удлинению. Потенциал действия представляет собой импульсный процесс, который протекает по принципу «все или ничего». Постоянство амплитуды импульса обусловлено тем, что в максимуме ПД проводимость для ионов натрия много больше проводимости для ионов калия, и он равен равновесному потенциалу для ионов натрия. Дальнейший ход событий зависит от градиентов ионных концентраций и от избирательной проницаемости мембраны.

2. Весь цикл изменений мембранного потенциала должен закончиться, прежде чем сможет возникнуть второй потенциал действия. За каждым ПД следует период рефрактерности, подразделяющийся на абсолютный и относительный рефрактерные периоды. В абсолютный рефрактерный период ПД не может возникнуть, а в относительный \square возникает, но меньшей амплитуды. Наличие рефрактерности и принципа «все или ничего» исключает возможность суммаций ПД.

3. Потенциал действия распространяется не затухая. Он имеет одну и ту же форму и амплитуду в любом месте нервного волокна. Пассивные электрические свойства нерва не приводят к искажению или уменьшению ПД, так как он возникает заново в каждой последующей точке мембраны.

1.4. Электрические проявления нервного импульса в целом нерве

Специфическая функция нервного волокна состоит в проведении сигналов. Оболочка нерва обладает определенной проводимостью, если нерв содержался в проводящем растворе Рингера, но по мере высыхания ее сопротивление увеличивается. Обычно, при работе с целыми нервами различных животных пользуются макроэлектродами (внеклеточными электродами), которые представляют собой проволоочки или крючки из проволоки диаметра $0,15 \square 0,3$ мм. Материалом для электродов может быть вольфрам, серебро, платина и нержавеющая сталь, так как эти металлы наименее токсичны для нерва и не подвержены коррозии. Электроды могут использоваться как для раздражения нерва, так и для отведения возникающих потенциалов.

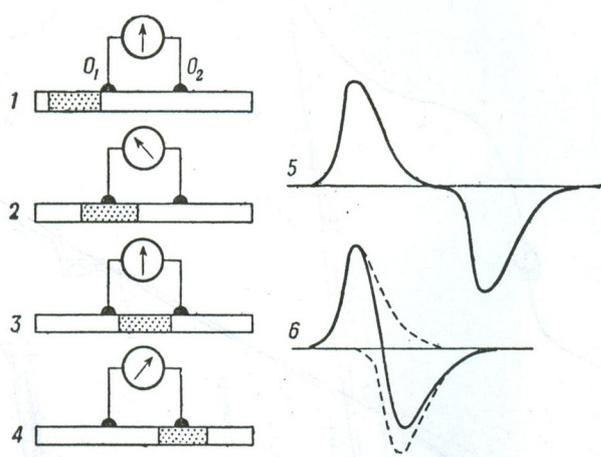
При внеклеточном отведении биопотенциалов от нервного ствола регистрируют не изменение потенциала на мембране, а падение напряжения на внеклеточном межэлектродном участке, вызванное протеканием локальных токов вдоль наружной поверхности аксонов от покоящихся участков к

активным. Сложный ПД нервного ствола создается за счет алгебраической суммы ПД отдельных волокон, образующих нерв.

Поскольку электрические токи текут вдоль нерва как для раздражающих, так и для отводящих электродов, то амплитуда потенциала между электродами зависит от падения напряжения на участке между электродами, зависящего от пассивной проводимости нерва. Так, для отводящих электродов при высыхании раствора Рингера на нерве амплитуда ПД должна возрастать, а при смачивании нерва, наоборот, падать. Участок, в котором находится в какой-то момент ПД, является электроотрицательным по отношению к остальной части нерва, возвратные токи втекают в него снаружи и оттекают внутрь аксоплазмы волокон. Поэтому, внеклеточный электрод, находящийся в месте возбуждения, показывает отрицательный потенциал по отношению к остальной части, где находится второй отводящий электрод.

Участок нерва, который оказывается в каждый данный момент электроотрицательным, имеет различную длину у разных нервов - от нескольких миллиметров до нескольких сантиметров и соответствует длине волны. Отрицательный заряд распространяется вдоль всего нерва, причем длина волны остается постоянной. После прохождения нервного импульса электрический потенциал данного участка возвращается к исходной величине.

Процесс формирования сигнала, регистрируемого с электродов, показан на рис. 6.



Электроды, на которых находится нерв, связаны с осциллографом для просмотра сигналов через усилитель. Когда нервный импульс находится вне участка, на котором расположены электроды (рис. 6-1) отклонение не регистрируется, так как между электродами O_1 и O_2 нет разности потенциалов. Когда нервный импульс достигает электрода O_1 (Рис. 6-2), расположенный под ним участок становится электроотрицательным.

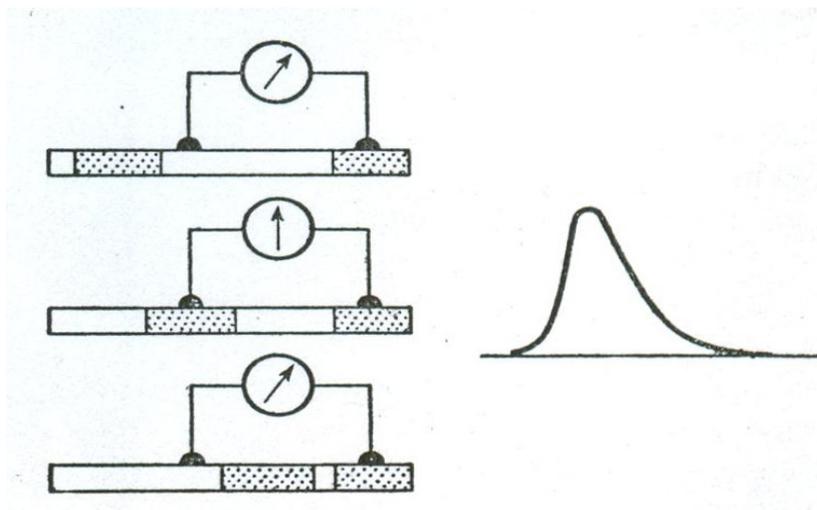
Рис. 6. Схема происхождения двухфазного потенциала действия нерва

Между электродами O_1 и O_2 возникает разность потенциалов, и осциллограф регистрирует эту разность в виде отклонения луча. На рис. 6-3 показан момент нахождения импульса между электродами. При этом ткань, расположенная под обоими электродами, имеет одинаковый потенциал и, следовательно, отклонение не регистрируется. Когда волна отрицательного потенциала достигает электрода O_2 (рис. 6-4), возникают условия, сходные с теми, которые изображены на рис. 6-2. Разница лишь в том, что теперь отклонение луча идет в обратном направлении, так как отрицательный потенциал расположен под вторым электродом. Если представить потенциал

как функцию времени, то получим кривую, изображенную на рис. 6-5. Так как отрицательный потенциал в определенной точке возникает и исчезает не мгновенно (для достижения максимума требуется какое-то время), то восходящий и нисходящий участки кривой имеют некоторый наклон. Для пояснения был приведен пример, который редко встречается в действительности. Обычно длина волны гораздо больше расстояния между электродами. Очевидно, что в таком случае между отклонениями, которые соответствуют появлению отрицательного потенциала под электродами O_1 и O_2 не будет изопотенциальной линии. В тот момент, когда волна отрицательного потенциала достигает второго электрода, под первым электродом она еще не успеет исчезнуть полностью и получится кривая, показанная на рис. 6-6. Аналогичные рассуждения приводят к заключению, что амплитуда отклонения тем меньше, чем меньше расстояние между электродами.

Потенциал действия, зарегистрированный таким образом, называют двухфазным. Отрицательный потенциал под электродом, расположенным ближе к месту раздражения, регистрируется в виде отклонения луча осциллографа вверх, а под вторым электродом (более удаленным) - в виде отклонения луча вниз. Вторую фазу двухфазного ПД часто называют положительной.

При изучении изменений потенциала удобнее регистрировать так называемый монофазный потенциал действия. На рис. 7 представлена схема регистрации монофазного потенциала действия. При такой регистрации предотвращается подход импульса ко второму электроду и регистрируется лишь прохождение импульса под первым электродом.



Это можно осуществить различными способами. В простейшем случае нерв пережимают пинцетом между электродами или помещают один из электродов на поврежденный конец нерва. Наиболее удобным и эффективным способом является деполяризация конечного участка нерва помощью изотонического раствора КСl.

Рис. 7. Схема происхождения монофазного потенциала действия

Глава 2. Проведение работы

2.1. Описание установки

Для регистрации ПД нервного волокна необходимо собрать лабораторную установку и препарировать нерв.

В состав установки входят: электростимулятор ЭСЛ-2, изолирующий трансформатор, усилитель биопотенциалов УБП1-02, двухканальный осциллограф С1-93, влажная камера с электродами для нерва, экранирующая камера из стали (экран), соединительные кабели и заземляющие провода. Блок-схема установки показана на рис. 8.

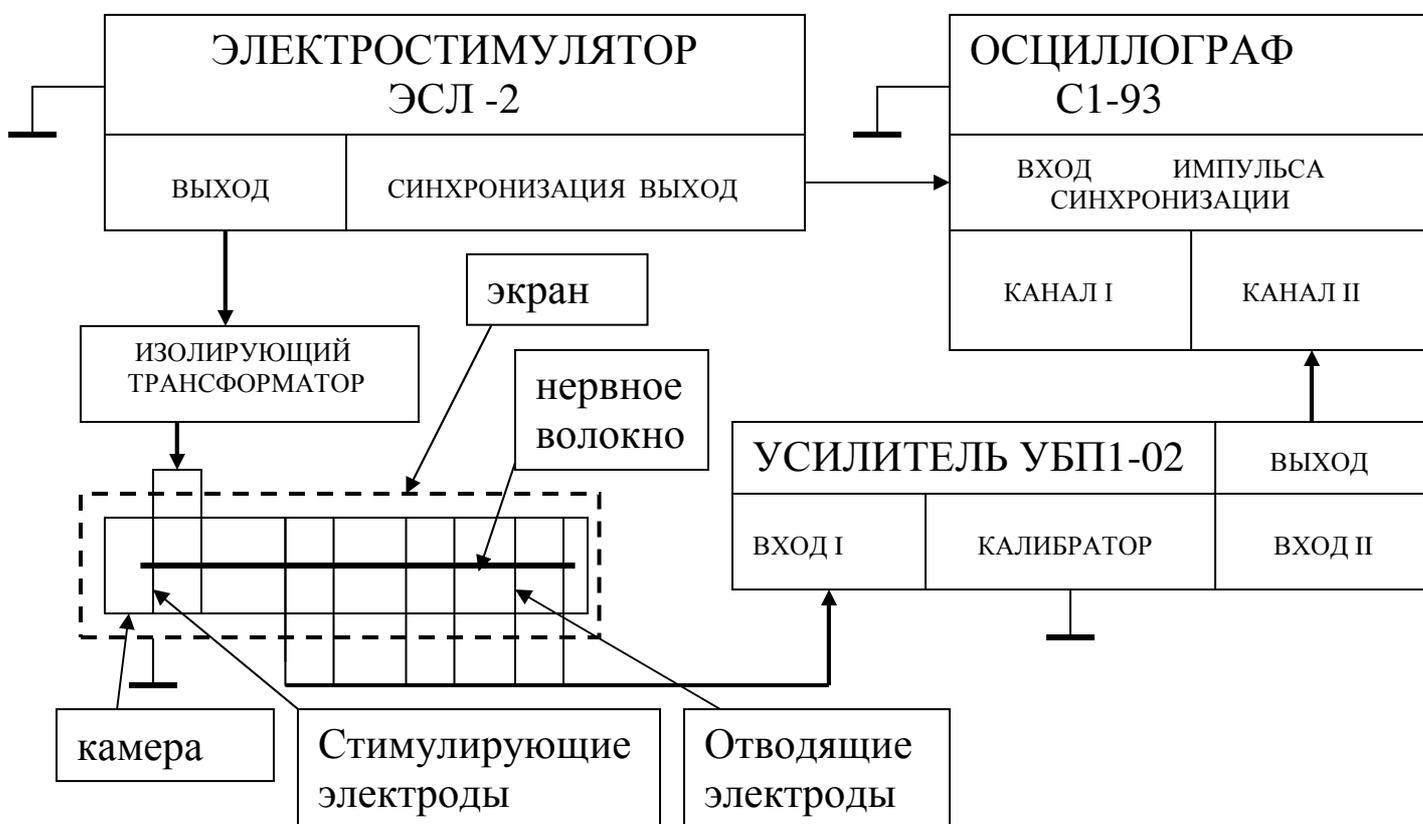


Рис. 8. Блок-схема установки для проведения эксперимента

Выход электростимулятора соединяется с раздражающими электродами влажной камеры через изолирующий трансформатор.

Влажная камера, в которую помещается нерв, сделана из оргстекла. Раздражающие электроды жестко закреплены на боковых выступах, три пары отводящих электродов закреплены на стенке на фиксированных расстояниях и могут подключаться поочередно на вход усилителя с помощью трех переключателей. Сбоку камеры приклеена линейка, которая измеряет расстояние между электродами. Отводящие и раздражающие электроды соединены проводами с разъемами, расположенными на подставке. Перед

проведением эксперимента в камеру заливается раствор Рингера для хладнокровных животных на две третьих объема камеры.

Камера для нерва помещается в свою очередь в экранирующую камеру из стали (экран) для уменьшения электрических наводок на высокоомный вход усилителя, а разъемы влажной камеры соединяются с внешними разъемами экранирующей камеры, к которым подключается усилитель и электростимулятор. Экранирующая камера имеет также клемму для заземления.

Электростимулятор имеет ручки управления, позволяющие устанавливать параметры стимулирующих импульсов, а также выход импульсов синхронизации, предназначенных для запуска ждущей развертки осциллографа.

Усилитель биопотенциалов имеет регулировки коэффициентов усиления, полосы пропускания и калибратор, а также два входа. Вход I предназначен для сигналов, имеющих амплитуду микровольты. Вход II предназначен для сигналов амплитудой в милливольтках. Оба входа являются дифференциальными, т.е. усиливают разность сигналов между двумя точками относительно земли. Выход усиленного сигнала имеет две клеммы, сигналы на которых находятся в противофазе относительно клеммы заземления. Сигнал снимается с одной из клемм относительно общей (клемма земля) и подается на один из входов осциллографа.

Осциллограф переводится в режим ждущей развертки, его вход синхронизации подключается специальным кабелем к выходу синхроимпульса электростимулятора. Этот режим необходим для синхронизации развертки осциллографа с моментом стимуляции нерва раздражающим импульсом.

2.2. Регистрация потенциала действия седалищного нерва лягушки

Собирают установку по вышеописанной схеме (Рис. 8):

а) К внешним разъемам камеры подсоединяют экранированные кабели, идущие на выход электростимулятора и на вход I усилителя, выход усилителя соединяют с входом осциллографа. Осциллограф синхронизируют от стимулятора. Все приборы заземляют на общую шину, экранирующую камеру заземляют на усилитель. Аппаратуру включают за 10 мин до начала измерений.

б) В усилителе ограничитель полосы частот сверху ставят на отметку 10 кГц, а ограничитель полосы снизу на отметку 10 Гц. Переключатель рода работ усилителя устанавливают в положение “Работа”. Ручки ступенчатой и плавной регулировки усиления ставят в среднее положение.

в) В стимуляторе устанавливают переключатель рода работ в положение “Внутренний запуск”, а регулятор частоты импульсов в положение 20-30 Гц. Длительность импульса стимуляции 0,1-0,2 мс. Регулятор “Амплитуда” в минимальное положение. Время развертки и усиление подбирают в процессе работы.

г) Готовят препарат седалищный нерв □ большеберцовый нерв (см. ПРИЛОЖЕНИЕ). Помещают нерв во влажную камеру на стимулирующие и отводящие электроды, подключают первую пару отводящих электродов, слегка растягивают его, закрывают ее крышкой и помещают в экранирующую камеру, соединив ее с внешними разъемами. Манипуляции с нервным волокном производятся с помощью стеклянных крючков.

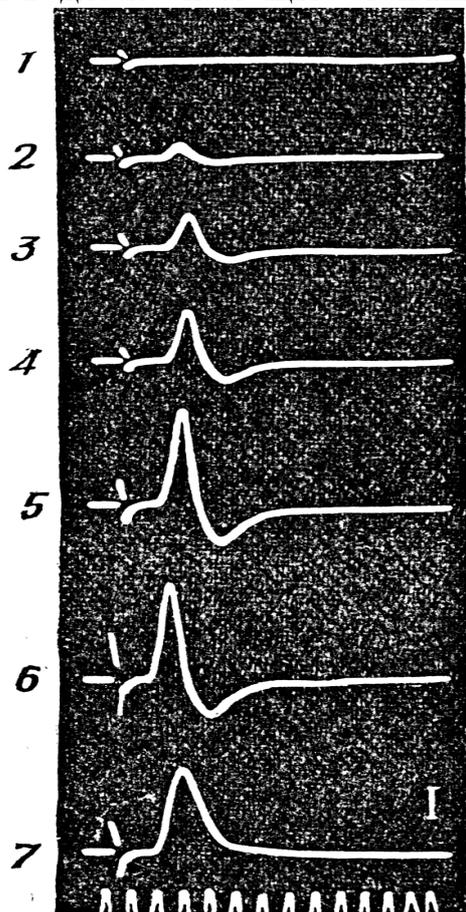


Рис. 9. Ответы седалищного нерва лягушки на постепенно возрастающий по силе раздражающий импульс [1]

Увеличивая постепенно амплитуду прямоугольных импульсов стимулятора, наблюдают на экране осциллографа форму регистрируемой кривой (рис. 9).

Сначала на экране возникает артефакт раздражения, т. е. петля раздражающего тока, которая достигает регистрирующих электродов за счет физического распространения тока. Петля отражает момент раздражения (рис. 9-1).

При дальнейшем повышении амплитуды раздражающего тока на кривой появляется небольшая волна; волна возрастает (рис. 9: 2-4) до тех пор, пока не возникнет выраженный потенциал действия (рис. 9: 5-6). Таким образом, регистрируется двухфазный потенциал действия нерва.

После того как потенциал действия получен, можно проводить измерения и устанавливать закономерности, свойственные нервному импульсу.

2.3. Определение амплитуды потенциала действия нерва

Для определения амплитуды ПД выставляют изолинию осциллограммы на середину экрана осциллографа, подбирают достаточное усиление, как усилителя, так и осциллографа для удобства наблюдения.

Измеряют амплитуду ПД (по числу клеток на экране с учетом положения входного делителя) в вольтах ($U_{вых\ по}$).

Затем подают на вход усилителя импульс известной амплитуды порядка 0,5-1 мВ и, не меняя коэффициентов усиления осциллографа и усилителя, измеряют в вольтах амплитуду этого импульса на экране осциллографа. Для этого необходимо перевести усилитель в режим калибровки.

Далее измеренную амплитуду в вольтах делят на амплитуду импульса в милливольтгах на входе. Полученная величина будет равна общему коэффициенту усиления усилителя и осциллографа, т.е.

$$K=U_{\text{вых}}/U_{\text{вх}}. \quad (2.1),$$

Зная величину ПД в вольтах и коэффициент усиления, легко вычислить истинную амплитуду на отводящих электродах по формуле

$$U_{\text{вх пд}}=U_{\text{вых пд}}/K. \quad (2.2),$$

В среднем амплитуда ПД нерва составляет около 2 мВ [1]. Существенно, что эта амплитуда зависит от степени влажности нерва в месте отводящих электродов.

Устанавливая амплитуду стимулирующего импульса подпороговой величины, регистрируют кривые зависимости амплитуды ПД нерва от амплитуды стимулирующего импульса до сверхпорогового раздражения, делают это для трех различных длительностей.

2.4. Определение временных параметров потенциала действия

К временным параметрам относятся длительность потенциала действия нерва и длительность его переднего и заднего фронтов. В силу того, что ПД нерва является суммой ПД от многих волокон, необходимо, чтобы были возбуждены все волокна, временные параметры при этом остаются постоянными.

На осциллографе устанавливают развертку, удобную для измерения. Подсчитывают число делений на изолинии при пересечении ее кривой ПД от переднего до заднего фронта. Полученная величина умножается на коэффициент развертки ($k=\text{время/деление}$). Измерение можно также производить по уровню 0,7 от амплитудного значения ПД.

Типичные данные: длительность около 2,5 мс, восходящая фаза продолжается 0,5–1 мс, нисходящая фаза – от 1 до 1,5 мс.

2.5. Определение скорости проведения ПД. Доказательство постоянства скорости распространения вдоль нервного волокна

Поскольку седалищный нерв является смешанным нервом с различными скоростями проведения, то для их измерения необходим достаточно длинный нерв – не менее 12 см, чтобы на экране осциллографа импульсы от разных групп волокон разделились на временной развертке. При использовании в эксперименте нервов менее 12 см измерение проводится только для группы волокон типа А. Для определения скорости проведения ПД необходимо знать: длину пути, которую проходит импульс от точки возникновения до первого регистрирующего электрода (S), время, затраченное на прохождение этого пути (T). Скорость вычисляется по известной формуле:

$$V=S/T \text{ (м/с)}. \quad (2.3),$$

Существует два метода определения скорости проведения ПД по нерву с одной парой отводящих электродов (как в данной работе), так и с двумя парами

отводящих электродов, расположенных на известном расстоянии друг от друга. Первый метод имеет недостатки в точности измерения. Поскольку положение точки возникновения нервного импульса между раздражающими электродами неизвестно, существует латентный период между нанесением раздражающего импульса и появлением ПД между электродами. Во втором случае измеряются время, требуемое на прохождение расстояния между двумя парами отводящих электродов и само расстояние, на основании чего вычисляется скорость. Этот метод сложнее в аппаратном отношении, так как требуется двухканальный усилитель и двухканальный осциллограф, однако, он более точный, так как исключаются ошибка, связанная с латентным периодом возбуждения нерва и ошибка, обусловленная неизвестным положением места возбуждения.

В проводимом эксперименте считаем, что расстояние, которое проходит импульс, равно расстоянию от первого раздражающего электрода до первого отводящего электрода. Это расстояние измеряется линейкой, приклеенной к боковой стенке камеры. Измерение времени прохождения ПД делается по экрану осциллографа - от начала артефакта до начала восходящей фазы ПД. Измерение скорости проведения проводят для двух или трех значений длин участков нерва: первая - 2 см, вторая длина - это промежуточная 4 см и третья, максимальная - 6 см.

Значения измеренной скорости проведения в быстрых волокнах А типа должны быть примерно одинаковыми, что и доказывает постоянство скорости проведения по нервному волокну и составляет ≈ 40 м/с.

2.6. Определение длины волны ПД

Длина волны ПД в нерве (l) - это длина возбужденного участка нерва. Возбужденный участок нерва электроотрицателен по отношению к остальной части нерва. Зная скорость проведения V м/с и длительность отрицательной фазы ПД τ (с) (восходящая фаза) можно вычислить длину волны возбуждения по формуле:

$$l = V \cdot \tau (м) \quad (2.4),$$

Типичные значения составляют $\approx 6 \cdot 10^{-2}$ м.

2.7. Измерение зависимости «сила – длительность». Определение хронаксии и реобазы

Кривая «сила \square длительность» это зависимость между силой (амплитудой) раздражающего тока и минимальной длительностью его действия, необходимой для возникновения возбуждения, описывается кривой Гoorвейга-Вейса-Лапика, которая представляет собой гиперболу. Пороговая сила раздражающего тока зависит от длительности его действия (рис. 10).

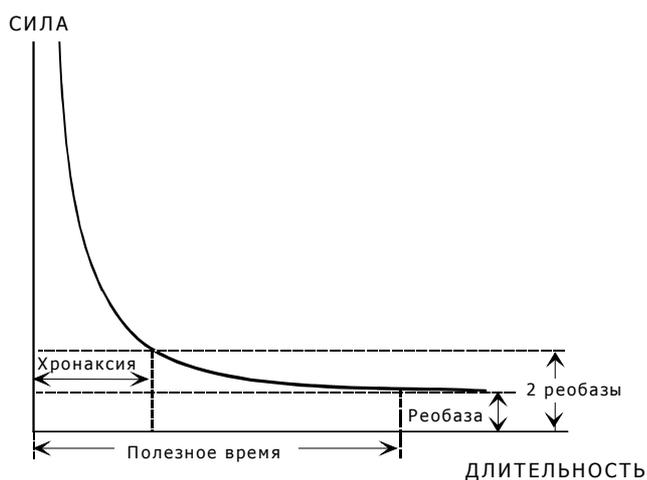


Рис. 10. Кривая сила—длительность

Полезное время - наиболее короткий интервал времени, в течение которого должен действовать ток, равный по величине реобазе, чтобы вызвать возбуждение.

Асимптотическое приближение гиперболы к оси ординат означает, что для возникновения импульса необходимо некоторое минимальное время действия раздражителя (абсолютный порог времени).

Хронаксией называется время, в течение которого должен действовать ток, равный по силе удвоенной реобазе, чтобы вызвать возбуждение. С помощью хронаксии можно сравнивать возбудимость различных тканей: чем меньше хронаксия, тем больше возбудимость. Например, хронаксия нервных волокон ниже, чем мышечных.

Ход работы

Устанавливают на электростимуляторе длительность раздражающего импульса 0,08 мс и определяют его пороговую силу. Пороговой называется такая сила раздражения, достаточная для появления минимальной активности волокон группы А. Затем постепенно увеличивают длительность импульса и для каждого времени определяют его пороговую силу. Величины силы можно выразить в вольтах, длительность в миллисекундах.

По полученным данным строят график. По экспериментальной кривой определяют хронаксию и реобазу.

2.8. Лабильность по Н.Е. Введенскому

Впервые Н.Е. Введенский ввел понятие лабильности как функциональной подвижности возбудимых тканей. Лабильность – это способность биосистемы в течение времени развертывать одиночный процесс возбуждения. Мерой лабильности является максимальное число возбуждений или ПД, которое способна генерировать возбудимая биосистема за единицу времени в связи с навязанным ритмом возбуждения. В среднем лабильность нервного волокна –

1000 имп/с, мышцы – 200 имп/с. Лабильность возбудимых биосистем практически обусловлена длительностью фазы абсолютной рефрактерности. Так, фаза абсолютной рефрактерности нервного волокна лягушки равна в среднем 1,5 мс, то есть в 1 секунду при ритмическом раздражении с частотой 660 Гц нерв может воспроизвести 660 импульсов[1]. Необходимо также учитывать те общие изменения в нервной ткани, которые накапливаются в ходе длительных восстановительных процессов после проведения нервного импульса. Если частота раздражающих импульсов превышает максимальный ритм раздражения, то происходит снижение амплитуды нервных импульсов или трансформация ритма, когда из ответной последовательности выпадают отдельные импульсы.

Ход работы

Для определения лабильности нерва необходимо использовать сверхпороговые по амплитуде импульсы, подаваемые с различной частотой. Эксперимент проводят с препаратом седалищный □ большеберцовый нервы. Седалищный нерв должен лежать на раздражающих электродах, а большеберцовый - на отводящих. В этом случае раздражаться будут только волокна седалищного нерва.

Включают стимуляцию, получают максимальное значение ПД и начинают постепенно увеличивать частоту раздражающих импульсов.

Смотрят, при каком значении частоты происходит уменьшение амплитуды импульсов, определяя максимальное значение частоты.

2.9. Закон двустороннего проведения возбуждения по нерву

Для препарированного нерва справедлива двусторонняя передача импульсов. Для доказательства этого достаточно поменять раздражающие и отводящие электроды местами. В этом случае раздражается другой конец нерва, импульсы идут в противоположном направлении и регистрируются отводящими электродами.

2.10. Регистрация монофазного потенциала действия

Для получения монофазного ПД инактивируют участок нерва, находящийся между двумя отводящими электродами. Это можно сделать путем аппликации ватного шарика, смоченного спиртом или изотоническим раствором КСl, к участку нерва, другой вариант - нарушить функционирование нерва путем сдавливания нерва пинцетом.

Через 5-10 мин наблюдают исчезновение нисходящей фазы ПД соответственно рисунку 9-7.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приготовление препарата изолир ованных седалищного и большеберцового нервов лягушки

Объект исследования: лягушка.

Оборудование: раствор Рингера для хладнокровных, препаровальный набор, дощечка для препарата, булавки для его закрепления, большая чашка Петри со слоем парафина на дне и маленькая без парафина для выделенных нервов.

Ход работы

1. Обездвижить лягушку бескровным методом путем введения препаровальной иглы в позвоночный канал и полость черепа через атлanto-окципитальное отверстие. Для этого необходимо обернуть марлей наркотизированную эфиром лягушку так, чтобы лапки ее были прижаты к туловищу, а голова оставалась свободной. Большим пальцем наклонить вперед голову лягушки и найти углубление, соответствующее атлanto-окципитальному отверстию. Ввести в субокципитальное отверстие конец препаровальной иглы на глубину 1-2 мм, повернуть ее параллельно центральному каналу, ввести в него и продвинуть до крестцово-копчикового соединения, круговыми движениями разрушая спинной мозг. Критерием разрушения является полная релаксация всех групп мышц лягушки. Извлечь иглу из центрального канала и, повернув ее на 180°, разрушить головной мозг.

2. Вскрыть грудо – брюшную полость и перерезать позвоночник на уровне подмышечных впадин. Мышцы и внутренности удалить вместе с передним отделом туловища.



3. Снять кожу с задних лапок, удалить уростиль, разделить препарат на две части продольным разрезом позвоночника и поперечным - лонного сочленения. При этом следует избегать соприкосновения кожи с раствором, в котором будет препарироваться нерв.

4. Полученный таким образом препарат (рис.1) поместить в чашку Петри со слоем парафина на дне (0,5 см), фиксировать на вентральной стороне с помощью булавок и полностью залить раствором Рингера для хладнокровных животных. всю процедуру выделения нерва проводят под слоем раствора Рингера.

Рис.1. Приготовление нервно-мышечного препарата

5. Основные этапы выделения нервов показаны на рис.2. Большеберцовый нерв перерезают выше голеностопного сустава и все его веточки отсекают. Удаляют также все веточки седалищного нерва и перерезают малоберцовый нерв. После освобождения от боковых ветвей большеберцовый и седалищный нервы можно легко поднять стеклянным крючком. Удалять соединительную ткань в области коленного и тазобедренного суставов не обязательно.

6. Перерезать спинной мозг, и препараты готовы. Желательно не нарушать связи между седалищным нервом и спинным мозгом. Кусочек позвоночника, с которым связан седалищный нерв, используется для того чтобы держать препарат пинцетом при дальнейших манипуляциях.

7. Наложить лигатуру на дистальный конец нерва и перерезать его ниже лигатуры. За лигатуру и кусочек позвоночника нерв переносят во влажную камеру.

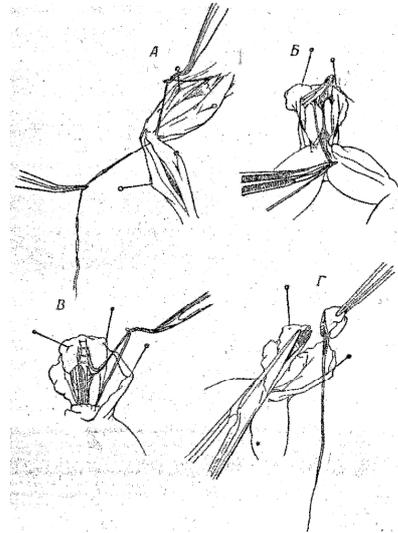


Рис. 2. Приготовление препарата изолированных нервов лягушки

КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ

1. Какой вид транспорта ионов создает мембранную разность потенциалов: активный или пассивный?
2. Дать определение равновесного потенциала для ионов данного вида.
3. Что больше: скорость распространения по толстым или тонким миелинизированным нервным волокнам? Почему?
4. Механизм распространения ПД в миелинизированном волокне.
5. Механизм распространения ПД в немиелинизированном волокне.
6. Что такое пассивные свойства мембраны (эквивалентная схема)?
7. Что такое активные свойства мембраны (эквивалентная схема)?
8. Что описывают уравнения Ходжкина—Хаксли?
9. Вычислить латентный период возбуждения, зная времена распространения ПД до первой и второй пар отводящих электродов и соответствующие им расстояния.

ЛИТЕРАТУРА

1. Буреш Я., Петрань М., Захар И. Электрофизиологические методы исследования. М.: ИЛ, 1962.
2. Катц Б. Нерв, мышца и синапс. - М.: Мир, 1968.
3. Николлс Дж., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. Пер. с англ. /Под ред. Балабана П.М., Гиниатуллина Р.А. – М.: Едиториал УРСС, 2003.
4. Рубин А.Б. Биофизика: В 2-х томах. – М.: Изд-во Московского университета, 2004.
5. Руководство по физиологии. Общая физиология нервной системы. - Л.: Наука, 1979.
6. Физиология человека: В 3-х томах. Пер. с англ. /Под ред. Р. Шмидта и Г. Тевса. - М.: Мир, 2004.
7. Ходоров Б.И. Общая физиология возбудимых мембран. - М.: Изд-во Наука, 1975.

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|---|----|
| Глава 1. Электрические свойства нервных проводников..... | 3 |
| 1.1. Вводные замечания..... | 3 |
| 1.2. Краткое описание объекта исследования..... | 3 |
| 1.3. Физиологические основы проведения нервного импульса по нервному проводнику..... | 4 |
| 1.4. Электрические проявления нервного импульса в целом нерве..... | 10 |
| Глава 2. Проведение работы..... | 13 |
| 2.1. Описание установки..... | 13 |
| 2.2. Регистрация потенциала действия седалищного нерва лягушки.... | 14 |
| 2.3. Определение амплитуды потенциала действия нерва..... | 15 |
| 2.4. Определение временных параметров потенциала действия..... | 16 |
| 2.5. Определение скорости проведения ПД. Доказательство постоянства скорости распространения вдоль нервного волокна..... | 16 |
| 2.6. Определение длины волны ПД..... | 17 |
| 2.7. Измерение зависимости «сила – длительность». Определение хронаксии и реобазы | 17 |
| 2.8. Лабильность по Н.Е. Введенскому..... | 18 |
| 2.9. Закон двустороннего проведения возбуждения по нерву..... | 19 |
| 2.10. Регистрация монофазного потенциала действия..... | 19 |
| ПРИЛОЖЕНИЕ..... | 20 |
| КОНТРОЛЬНЫЕ ВОПРОСЫ..... | 22 |
| ЛИТЕРАТУРА..... | 23 |