

Meranie bioelektrických signálov v nerve

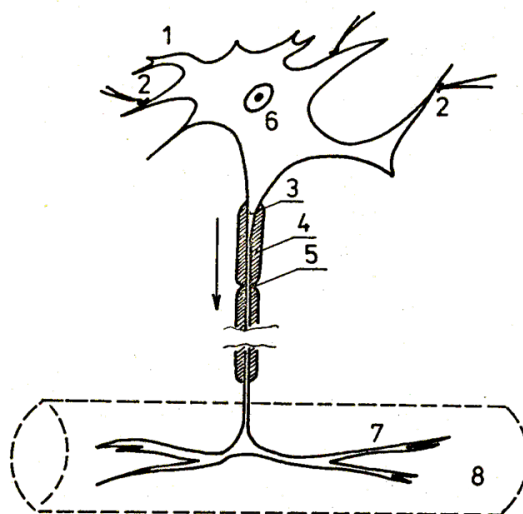
Teoretická časť

Generácia a šírenie nervových vzruchov (signálov v telách živočíchov), excitácia nervových a svalových buniek patria k najdôležitejším prejavom živých systémov.

Nervový vzruch sa šíri nervovými vláknami – axónmi. Nervovú sústavu vyšších organizmov možno všeobecne rozdeliť na centrálnu a periférnu. Práve periférnu časť nervovej sústavy, ktorá zahŕňa aj axóny, sprostredkúva vzájomný prenos informácií medzi zmyslovými orgánmi a svalmi na jednej strane a centrálnou nervovou sústavou na strane druhej.

Signály sa môžu axónmi šíriť jednak v smere zmyslové orgány → centrálna nervová sústava; v tomto prípade hovoríme o aferentných signáloch. Eferentné signály postupujú axónmi od centrálnej nervovej sústavy k svalom.

Z anatomického hľadiska axóny sú dlhé výrastky nervových buniek – neurónov. Schematický pohľad na neurón je na obrázku 6.1. V nervovej bunke sa schádzajú informácie vo forme elektrických signálov prichádzajúcich od mnohých susedných neurónov cez spojenia – synapsy – do jej kratších výbežkov – dendritov.



Obr. 6.1: Štruktúra nervovej bunky – neurónu (smer prenosu eferentných signálov do svalových motorických jednotiek je vyznačený šípkou) 1 – dendrit, 2 – synaptické spojenie, 3 – axón, 4 – myelínový obal, 5 – Ranvierove prstence, 6 – jadro neurónu, 7 – zakončenie motorického nervu, 8 – svalové vlákno.

Výskum generácie nervového impulzu a jeho šírenia v axóne je v biofyzike stará a tradičná úloha. Membránovú teóriu excitácie sformuloval v roku 1902 Bernstein. Podľa tejto teórie vzruch (excitácia) vzniká v dôsledku elektrochemických procesov lokalizovaných

v membráne nervových a svalových buniek. Tieto procesy sú viazané na prenos malých iónov Na^+ , K^+ , Cl^- (čiastočne Ca^{2+}).

Už dávno vedci pozorovali, že nervy a svaly sú schopné generovať elektromotorické napätia – biopotenciály. Elektrická aktivita buniek sa prejavuje vo forme krátkych impulzov (~ 1 ms) s opakovanou frekvenciou od 10 ms. Vo frekvencii a charaktere postupnosti impulzov je zakódovaná prenášaná informácia.

Vnútro nervového vlákna sa nazýva axoplazma. Jej merný odpor je zhruba $0,1 - 1,0 \Omega\text{m}$, t. j. pri vlákne s priemerom $1 \mu\text{m}$ vychádza odpor na 1 m dĺžky 10^{11} až $10^{12} \Omega$, čo je napr. v porovnaní s medeným drôtom zhodných rozmerov hodnota 10^8 -krát väčšia. Z toho vyplýva, že prenos elektrického signálu axoplazmou bez uváženia aktívnej úlohy membrány nervového vlákna by nebol možný.

Pre živé bunky je charakteristický rozdiel v koncentrácii iónov Na^+ , K^+ , Cl^- na oboch stranách ich membrán. Tieto koncentračné gradienty jednotlivých iónov sú udržiavané v ustálenom stave membrány pomocou mechanizmov aktívneho transportu, pri ktorom dochádza k prenosu iónov proti elektrochemickému gradientu na úkor väzbovej energie fosfátových zlúčenín (adenozíntrifosfát – ATP) prítomných v blízkosti membrány.

Elektrické napätie merané ako rozdiel potenciálov na vonkajšej a vnútornej strane membrány možno vyjadriť Hodgkin-Katzovým vzťahom

$$\Delta\varphi = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_{\text{K}}C_{\text{K}}^i + P_{\text{Na}}C_{\text{Na}}^i + P_{\text{Cl}}C_{\text{Cl}}^e}{P_{\text{K}}C_{\text{K}}^e + P_{\text{Na}}C_{\text{Na}}^e + P_{\text{Cl}}C_{\text{Cl}}^i} \quad (6.1)$$

kde F je Faradayov náboj, C_X^i , C_X^e sú koncentrácie príslušných iónov X zvnútra membrány (v axoplazme) a zvonka membrány, P_X je permeabilita membrány pre ión X , daná výrazom $P_X = u_X RT / (F \Delta x)$, pričom u_X je pohyblivosť iónov X , Δx je hrúbka membrány.

V ustálenom stave je pomer permeabilit pre ióny Na^+ , K^+ , Cl^- nasledovný:

$$P_{\text{K}} : P_{\text{Na}} : P_{\text{Cl}} = 1 : 0,04 : 0,45 \quad (6.2)$$

Po dosadení hodnôt koncentrácií z tabuľky 6.1 typických pre nervové vlákno membránové napätie je

$$\Delta\varphi_{\text{pokojuvé}} = +67 \text{ mV} \quad (6.3)$$

Tabuľka 6.1: Koncentrácie iónov v rôznych roztokoch

ión	koncentrácia (mmol/kg)		
	axoplazma	krv	morská voda
K^+	400	20	10
Na^+	50	440	460
Cl^-	40 – 150	560	540

Pri excitácii axónu dôjde k lokálnej zmene permeability membrány voči iónom Na^+ (vzrastie až 500-krát). Pomer permeabilit v tomto prípade je

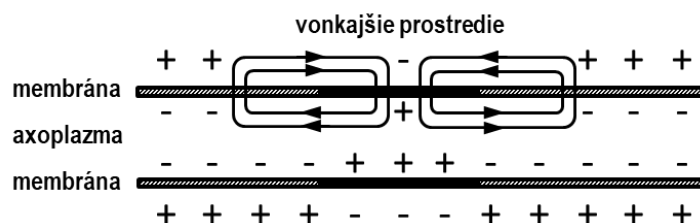
$$P_K : P_{\text{Na}} : P_{\text{Cl}} = 1 : 20 : 0,45 \quad (6.4)$$

a membránové napätie

$$\varphi_{\text{exc}} = -43 \text{ mV} \quad (6.5)$$

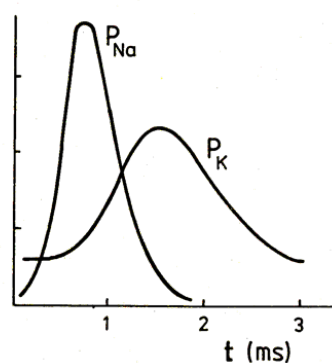
Rozdiel medzi napätím membrány v pokoji a pri excitácii sa v literatúre často uvádza ako akčný potenciál a jeho hodnota pre rôzne axóny sa pohybuje v rozmedzí 90 – 120 mV.

Pri depolarizácii úseku membrány vznikajú elektrické prúdy, ktoré pretekajú okolitým prostredím (obr. 6.2). Tieto prúdy excitujú susedné úseky membrány.



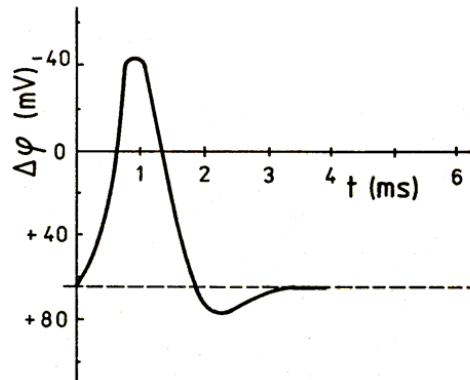
Obr. 6.2: Elektrické prúdy vznikajúce pri depolarizácii úseku axónu

Pri tvorbe potenciálu participujú 2 druhy kanálov, selektívne priepustných pre ióny sodíka a draslíka. Ich *otváranie* sa deje po sebe. V prvej fáze excitácie vzrastá permeabilita sodíka, v druhej fáze (s časovým oneskorením asi 1 ms) permeabilita draslíka. Časové priebehy P_K a P_{Na} sú znázornené na obrázku 6.3.

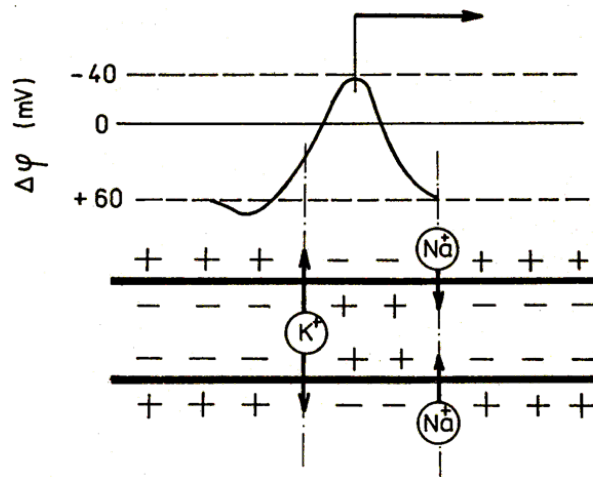


Obr. 6.3: Časová závislosť permeabilit iónov sodíka a draslíka v procese excitácie úseku nervového vlákna

Priebeh membránového napätia (vonkajšok voči vnútru) s vyznačenými etapami je na obrázku 6.4. Schéma šírenia excitácie nervovým vláknom je na obrázku 6.5.



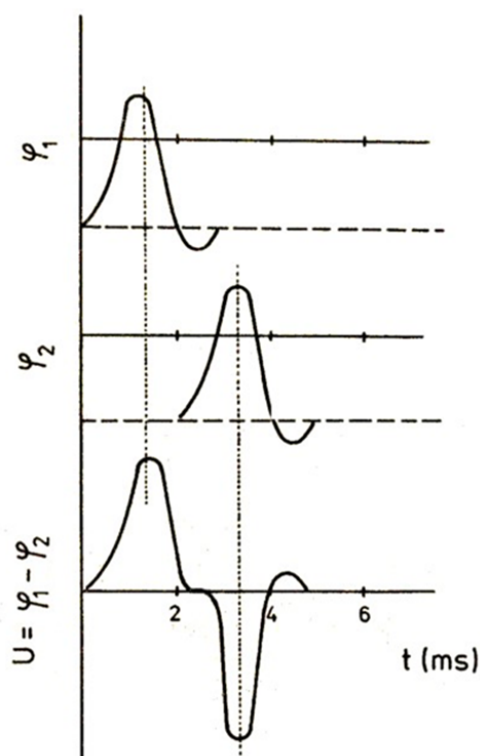
Obr. 6.4: Časová závislosť membránového napätia pri excitácii



Obr. 6.5: Mechanizmus šírenia excitácie axónom

Ak teda snímame potenciál jednej elektródy umiestnenej v blízkosti vonkajšieho povrchu membrány axónu vzhľadom na elektródu zasunutú do vnútra axónu, snímaný priebeh bude zodpovedať priebehu na obr. 6.4 (tzv. jednofázová registrácia akčného potenciálu). Ak snímame elektrické napätie dvoma elektródami uloženými na povrchu membrány vo vzájomnej vzdialenosti $\Delta\ell$, výsledný priebeh dostaneme podľa konštrukcie na obr. 6.6 ako rozdiel vzájomne posunutých časových priebehov z obr. 6.4. Interval $\Delta t = \Delta\ell/v$, kde v je rýchlosť šírenia sa vzruchu. V tomto prípade hovoríme o snímaní dvojfázového akčného potenciálu.

Excitáciu v určitom úseku nervového vlákna (axónu) možno generovať znížením jeho membránového napätia. Pri znížení pokojovej hodnoty o menej ako 20 mV (tzv. podprahová excitácia) membránový potenciál sa vráti na svoju pôvodnú hodnotu. No pri prekročení tejto hranice dochádza k depolarizácii membrány spojenej so všetkými dejmi opísanými v predchádzajúcom texte. Veľkosť depolarizačného napätia už nezávisí od veľkosti primárnej nadprahovej excitácie na danom úseku axónu.



Obr. 6.6: Časový priebeh potenciálov a meraného napätia pri aplikácii dvoch meracích elektród na povrch axónu

Experimentálna časť

Úloha

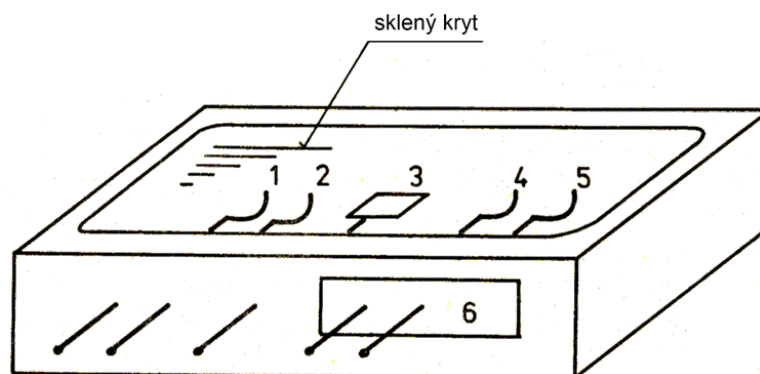
Pre vypreparovaný nerv skokana zeleného meraním stanovte rýchlosť šírenia sa excitácie, závislosť prahovej hodnoty amplitúdy stimulácií od frekvencie a z frekvenčných meraní odhadnite dobu refrakternosti nervu. Pri registrácii jednofázového akčného potenciálu určte jeho amplitúdu pomocou kalibračných impulzov.

Opis zariadenia a metóda merania

Merania akčných potenciálov v laboratórnej práci vykonávame na nerve izolovanom zo skokana zeleného. Z anatomického hľadiska nerv sa skladá zo zväzku súbežných axónov niekoľkých nervových buniek obalených vonkajšou membránou. Merané elektrické veličiny budú teda zodpovedať kolektívnemu správaniu spojených nervových vlákien v rámci daného nervu.

Vlastná meracia komôrka je znázornená na obr. 6.7. Je vyrobená z plexiskla, elektródy sú platinové. Generáciu impulzu (akčného potenciálu) vykonáme dvojicou elektród 1 a 2 (tzv. stimulačné elektródy), na ktoré sú privedené impulzy z impulzového generátora. Druhý pár meracích elektród (4 a 5) umožňuje dvojfázové snímanie akčného potenciálu

nervu. Umiestnenie dvojice 4 a 5 možno meniť posunom doštičky vo vodiacich drážkach, a tým možno prispôbiť vzájomnú vzdialenosť dvojíc elektród podľa dĺžky biologického preparátu. Medzi dvojicou dráždiacich sa meracích elektród je uzemnená platnička. Jej úlohou je odstránenie artefaktu dráždenia, ktorý sa pri elektrickej stimulácii šíri povrchom vlhkého nervu a mení odozvu registrovanú na elektródach 4 a 5.



Obr. 6.7: Meracia komôrka na snímanie akčných potenciálov nervov (opis prvkov 1 – 6 je uvedený v texte)

Prístroje a pomôcky

Dvojlúčový osciloskop, impulzový generátor, meracia komôrka na snímanie akčných potenciálov nervov, zosilňovač, Ringerov roztok, vypreparovaný nerv

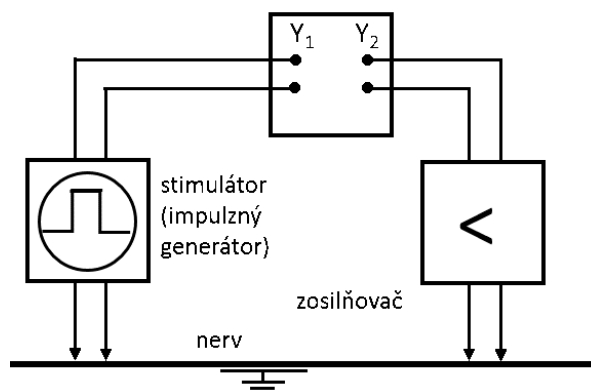
Postup merania a vyhodnotenie

Dvojfázový akčný potenciál nervu meriame v zapojení podľa schémy na obr. 6.8.

Preparát umiestnime na elektródy, pričom polohu dvojice meracích elektród volíme podľa jeho dĺžky. Dbáme na dobrý styk nervu s uzemnenou platničkou, aby sme pri registrácii odstránili artefakt stimulácie.

Stimuláciu uskutočňujeme vhodným impulzovým generátorom pravouhlých impulzov s nastavenou opakovacou frekvenciou $f = 50 \text{ Hz}$, amplitúdou $A = 0,5 \text{ V}$, šírkou impulzov do $\Delta = 1 \text{ ms}$. Zvyšujeme amplitúdu stimulačných impulzov a zapíšeme prahovú amplitúdu stimulácie, keď zaregistrujeme prvý signál na meracích elektródach. Pri ďalšom zvyšovaní amplitúdy veľkosť odozvy narastá (dochádza k *zapájaniu* do činnosti ďalších nervových vlákien zo zväzku v nerve) až po maximálnu hodnotu. Pri vyšších amplitúdach stimulačných impulzov odozva zostáva konštantná. Pre ďalšie merania nastavíme najmenšiu amplitúdu stimulácie, keď pozorujeme maximálny akčný potenciál.

Časovo zosynchronizuje, oba priebehy na osciloskope (privedením identických impulzov na oba vstupy Y_1 a Y_2) a zmeriame odstup medzi stimuláciou a odozvou v horizontálnom



Obr. 6.8: Schéma zapojenia pre meranie akčných potenciálov

smere. Na základe známej frekvencie stimulácie (50 Hz) urobíme prepočet zmeraného odstuhu (S) na časový interval (τ).

Rýchlosť šírenia vzruchu nervom vypočítame zo vzťahu

$$v = \frac{d}{\tau} \quad (6.6)$$

kde d je vzdialenosť stredov stimulačnej a meracej dvojice elektród.

Meranie opakujeme 10-krát pri zvyšujúcej sa amplitúde stimulačných impulzov až po dvojnásobnú hodnotu pôvodnej.

Namerané hodnoty zapíšeme do tabuľky a určíme priemernú hodnotu rýchlosti. V ďalšom meraní pri nastavenej hodnote šírky stimulačných impulzov Δ zistíme frekvenčnú závislosť prahovej hodnoty amplitúdy stimulácií. Uskutočníme 15 meraní pre frekvencie do 100 Hz. Uvedenú závislosť znázorníme graficky. Pri ďalšom zvyšovaní frekvencie stimulácií nad hranicu 100 Hz odhadneme dobu refrakternosti nervu.

Porušením nervu medzi meracími elektródami (rozrezaním, priložením rozžeravenej ihly) zaregistrujeme pri štandardných podmienkach stimulácie (prvá časť merania) jednofázový akčný potenciál. Na základe privedených kalibračných impulzov určíme amplitúdu takto registrovaného akčného potenciálu.

Literatúra

- [1] Beier, W.: Biofyzika – Úvod do fyzikální analýsy biologických systémů a soustav, Academia, Praha 1974
- [2] Burlakova, E.V.: Praktikum po pbšcej biofyzike 3–4, Issledovaniya bioelektričeskich javlenij v tkanjach i kletkach, Vyššaja škola, Moskva 191
- [3] Hille, B.: Membrany – jonnyje kanaly, ed. Ju. A. Čizmadžev, Mir, Moskva 1981
- [4] Volkenštejn, M.V.: Biofyzika, Izd. fiz. – mat. lit. Nauka, Moskva 1981