



# NERVENPHYSIOLOGIE

## EINFÜHRENDE BEMERKUNGEN

Nervensysteme sind aus einzelnen Nervenzellen aufgebaut. Im Gegensatz zu vielen anderen Körperzellen sind Nervenzellen erregbar, d. h. sie antworten bei Depolarisation des Membranpotentials nach Überschreiten der Schwelle mit Aktionspotentialen, die im Axon (Nervenfasern) fortgeleitet werden. Solche Depolarisationen werden in der biologischen Situation bei Nervenzellen durch postsynaptische Potentiale im Bereich der Synapsen und bei Rezeptoren durch physikalische oder chemische Reize erzeugt. Im physiologischen Experiment können sie durch elektrische Reize ausgelöst werden.

Einige Eigenschaften der Erregungsvorgänge bei Nervenzellen sollen in diesem Versuchsabschnitt experimentell untersucht werden. Leider können Sie nicht - was didaktisch besonders günstig wäre - am einzelnen Axon mit intrazellulärer Ableitetechnik arbeiten. Aus methodischen Gründen müssen wir einen Nerv mit vielen Axonen (N. ischiadicus des Krallenfrosches) verwenden und extrazelluläre Summenaktionspotentiale ableiten.

## THEORETISCHE VORAUSSETZUNGEN

Folgende Kenntnisse aus der Vorlesung "Einführung in die Tierphysiologie" und aus der Wirbeltieranatomie sind für eine erfolgreiche Durchführung des Kurses unerlässlich:

**Neuroanatomie:** Anatomie eines motorischen, eines sensorischen und eines gemischten Nerven (afferente, efferente Fasern), Neuron, Soma, Dendrit, Axon, Kollaterale, Synapse, myelinisierte und unmyelinisierte Axone, Ranvier'scher Schnürring.

**Ruhepotential:** Intrazelluläre Potentialmessung, Ionenverteilung an der Axonmembran,  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Gleichgewichtspotential, Leitfähigkeit (Permeabilität) für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$ , Ionenpumpen, elektrisches Ersatzschaltbild für die Entstehung des Ruhepotentials, Nernst- und Goldman-Gleichung, Veränderung des Ruhepotentials bei Änderung der  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentration.

**Elektrische Reizung:** Elektrotonische Ausbreitung, Membranzeitkonstante, Membranlängskonstante, lokale Antwort.

**$\text{Na}^+/\text{K}^+$ -Aktionspotential (AP):** Zeitverlauf des APs, Erregungsschwelle, Alles-oder-Nichts-Regel, Permeabilität für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  während des APs, schnelles  $\text{Na}^+$ -System mit Inaktivierung, Hodgkin-Huxley Zyklus, relative und absolute Refraktärzeit, Veränderung des APs bei Änderung der  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Konzentration, Unterschied zwischen intrazellulär und extrazellulär abgeleiteten APs.

**Fortleitung des APs:** Unterschied zwischen lokaler und fortgeleiteter Erregung, Erregungsleitung an myelinisierten und unmyelinisierten Axonen, Abhängigkeit der Leitungsgeschwindigkeit vom Axondurchmesser.

**Summenaktionspotential (SAP):** Unterschied zwischen dem AP einer Einzelfaser und dem SAP eines Nerven, Form und Ableitung eines diphasischen SAP, Beziehung zwischen Amplitude des SAP und Reizintensität.

**Erregungsübertragung:** Bau einer chemischen Synapse, Mechanismus der Transmitterausschüttung, postsynaptische Transmitterwirkung, Transmitterinaktivierung.

**Methodische Kenntnisse, die im Praktikum erworben werden sollen:**

Verkabelung einer elektrophysiologischen Messapparatur, Bedienung des Oszilloskops und eines Reizgeräts, extrazelluläre Ableitung eines Summenpotentials, Auswertung und Aufbereitung elektrophysiologischer Daten.

**LITERATUR**

SCHMIDT/THEWS: Einführung in die Physiologie des Menschen, Springer. -- Hervorragendes Lehrbuch für die gesamte allgemeine Physiologie und die Physiologie des Menschen. Leider ohne vergleichende tierphysiologische Aspekte.

ECKERT/RANDALL: Animal Physiology, Freeman. -- Gutes Lehrbuch für allgemeine und vergleichende Physiologie. (Deutsche Übersetzung: Thieme)

MÜLLER: Tier- und Humanphysiologie, Springer -- Gutes Lehrbuch für allgemeine und vergleichende Physiologie

KANDEL/SCHWARZ/JESSEL: Neurowissenschaften, Spektrum. -- Hervorragend verständliche Zusammenfassung der gesamten Neurowissenschaften mit Betonung der Verhältnisse beim Säuger.

Weiterhin empfehlenswert (für Spezialisten):

ZIGMOND/BLOOM/LANDIS/ROBERTS/SQUIRE: Fundamental Neuroscience. – Modernes Standardwerk für angehende Neurobiologen mit Schwerpunkt Physiologie und zelluläre Mechanismen.

KANDEL/SCHWARZ: Principles of Neural Sciences, 4th Edition. (2000) – Ebenfalls ein Standardwerk mit Schwerpunkt Säuger/Mensch. Achtung - ältere Auflagen sind wirklich veraltet!

**PRÄPARIERBESTECK**

1 spitze Pinzette, 1 feine spitze Schere, 1 größere Schere.

**VERSUCHE****1. Übungen zum Kennenlernen des Reizgerätes und des Oszilloskops**

Mit dem Reizgerät lassen sich elektrische Einzel- und Doppelreize (Rechteckimpulse) erzeugen, deren Parameter zum Teil fest eingestellt sind (Reizdauer 0,2 ms), bzw. eingestellt werden müssen (Reizamplitude). Grundkenntnisse über den Aufbau und die Funktion eines Oszilloskops werden vorausgesetzt. Eine Einweisung in die Bedienung des Reizgerätes und des Oszilloskops erfolgt am Arbeitsplatz durch den Kursbetreuer.

Folgende Fähigkeiten sollen geübt werden:

Bestimmen der Dauer und der Amplitude von Signalen, speichern eines Signals auf dem Bildschirm, externes Triggern.

## 2. Passive Eigenschaften der Nervenzellmembran

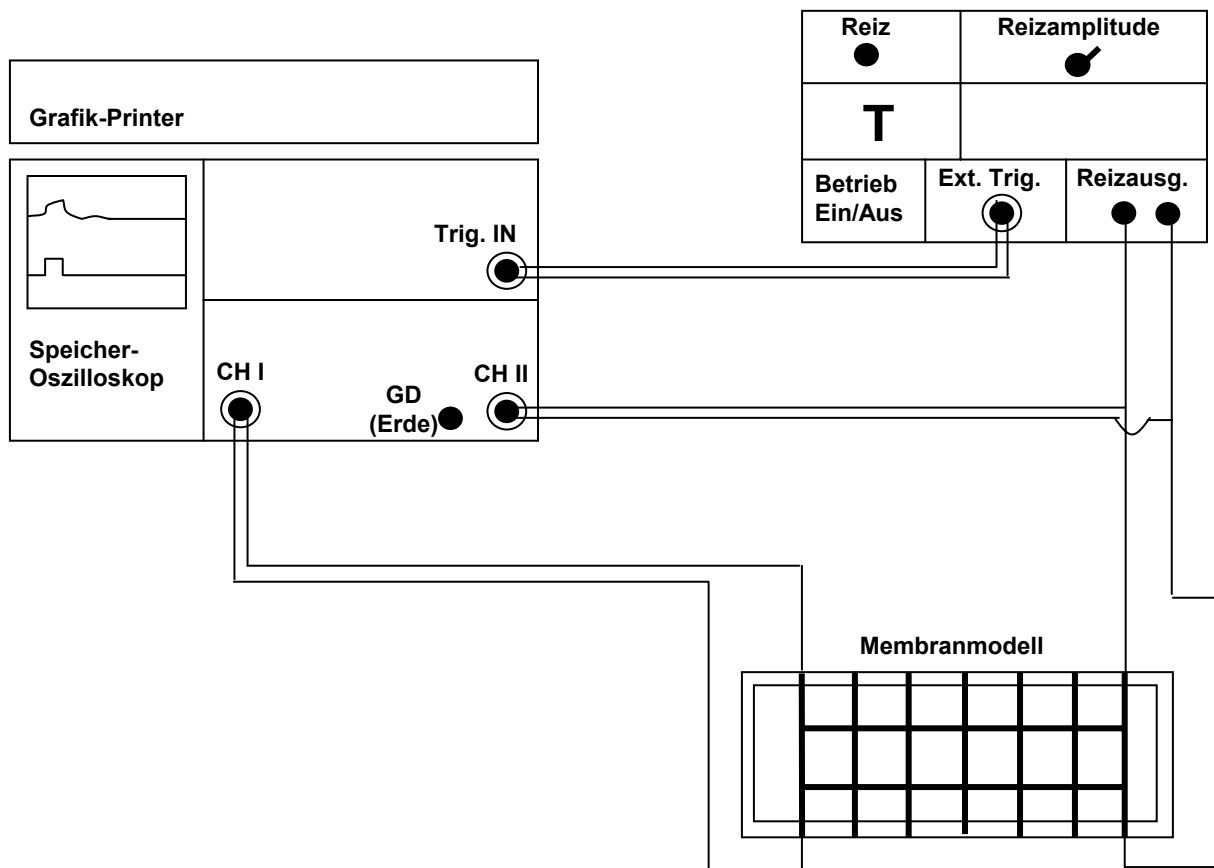
### Modell der passiven Eigenschaften der Nervenmembran

Dieser Versuchsteil dient dem Kennenlernen der Ableitmethode und der Messung von passiven Membraneigenschaften einer Nervenzelle.

Die Messungen werden an einem Modell der Nervenzellmembran (Kette von RC-Gliedern) durchgeführt. Jedes Glied dieser Kette repräsentiert einen kleinen Membranabschnitt mit Membranwiderstand und Membrankapazität. Die einzelnen Glieder sind durch den Innenwiderstand der "Intrazellulärflüssigkeit" verbunden. Der Außenwiderstand der Extrazellulärflüssigkeit wird als sehr klein angenommen.

### Versuchsdurchführung

Verkabeln Sie anhand der folgenden Skizze den Versuchsaufbau für die Messungen am Membranmodell. Stellen Sie eine Reizamplitude von 5 V und eine Reizdauer von 200 ms ein.



2a) Registrieren Sie den Spannungsverlauf, der sich an den verschiedenen Messpunkten des Modells ergibt mit dem Oszilloskop und notieren Sie die Amplitudenwerte in einer Tabelle. Beschreiben Sie die charakteristischen Unterschiede.

2b) Ermitteln Sie aus der Maximalamplitude an den verschiedenen Messpunkten die Längskonstante des Modells, indem Sie die Werte in ein MatLab Skript („konstante“) eingeben. Wie könnte dieser Wert verändert werden?

2c) Bis zu welchem maximalen Abstand vom Reizort würde in diesem Modell ein Aktionspotential ausgelöst werden, wenn man einen Schwellenwert von 0,4 V annimmt ?

2d) Bestimmen Sie die Zeitkonstante des Spannungsverlaufs am ersten Messpunkt nach dem Reizort und drucken Sie den Verlauf für Ihr Protokoll aus. Vergleichen Sie diesen Wert mit den Membranzeitkonstanten, die bei Nervenzellmembranen auftreten.

2e) Diskutieren Sie die Auswirkungen der Zeitkonstante auf die Geschwindigkeit der Erregungsleitung.

2f) Wie sieht der Spannungsverlauf über Ort **und** Zeit aus (siehe Matlab Skript „efun“)?

### ABLEITUNG EINES SUMMENAKTIONSPOTENTIALS (SAP)

#### Präparation des Nervus ischiadicus

##### - wird vom Kursbetreuer durchgeführt

Ein Frosch wird mit einer Guillotine dekapitiert und sein Rückenmark durch Einführen einer Sonde in den Rückenmarkskanal zerstört. Anschließend wird das Präparat enthäutet und mit Ringerlösung abgespült. Nach diesem Arbeitsgang sollten auch alle Instrumente und die Hände sorgfältig gereinigt werden, um das giftige Hautsekret zu entfernen.

Die Bauchhöhle des Frosches wird geöffnet und die Eingeweide entnommen. Die beiden nun freiliegenden Ischiadicus-Nerven werden mit einem Bindfaden abgebunden. Dazu wird vorsichtig eine kleine Pinzette unter einen Ischiadicus kurz hinter seinem Austritt aus dem Wirbelkanal durchgeschoben und ein mit Ringerlösung angefeuchteter Zwirnsfaden unter dem Nerven durchgezogen und fest um den Nerv geknotet. Das kürzere Ende des Fadens wird dicht am Knoten abgeschnitten, das andere Ende dient später als Haltegriff. Die Nerven werden nun proximal vom Knoten mit einer kleinen Schere durchtrennt und bis zum Eintritt in den Oberschenkel freipräpariert. Nun wird das Becken durch einen Schnitt in der Medianebene halbiert. Jede Gruppe führt nun an einem der beiden Froschbeine die Präparation fort.

##### - weitere Präparation wird von den Praktikanten durchgeführt

Ein isolierter Nerv ist ein lebendes und sehr empfindliches Gewebe; er sollte daher schonend behandelt werden. Dehnen Sie oder fassen Sie den Nerven niemals mit den Fingern oder einer Pinzette an.

Die dorsale Oberschenkelmuskulatur wird nun mit den Daumen auseinandergedrückt bis der Nerv sichtbar wird. Präparieren Sie den Nerven über die ganze Länge des Oberschenkels von Blutgefäßen und Bindegewebe frei. Beim Anheben des Nerven mit dem Haltefaden (nicht dehnen!) können seitlich abgehende Nervenäste mit einer kleinen Schere durchtrennt werden. Beim Abschneiden sollte die Schere vom Nerven weg weisen. Entfernen Sie mit einer kleinen Schere alle restlichen Bindegewebskontakte und durchtrennen Sie Kollaterale direkt am Nerven, indem Sie vom Nerven weg schneiden.

Wenn Sie am Kniegelenk angelangt sind, durchtrennen Sie den Nerven und legen Sie ihn in eine Petrischale mit Ringerlösung. Den Rest des Froschbeines legen Sie bitte in eine Präparierschale, decken es mit ringer-feuchtem Filtrierpapier ab und stellen es in den Kühlschrank. Eventuell kann es von den Studenten des "Muskel-Versuches" noch als Ersatzpräparat verwendet werden.

### Versuchsaufbau Ableitapparatur

Verkabeln Sie den Versuchsaufbau. Eine nahezu detailgetreue Wiedergabe der Verschaltung finden Sie in der folgenden Abbildung "Versuchsaufbau Nerv". Verbinden Sie dabei die Reizelektroden mit dem Reizgerät so, dass die Kathode (schwarze Buchse) benachbart zu den Ableitelektroden liegt (warum?).

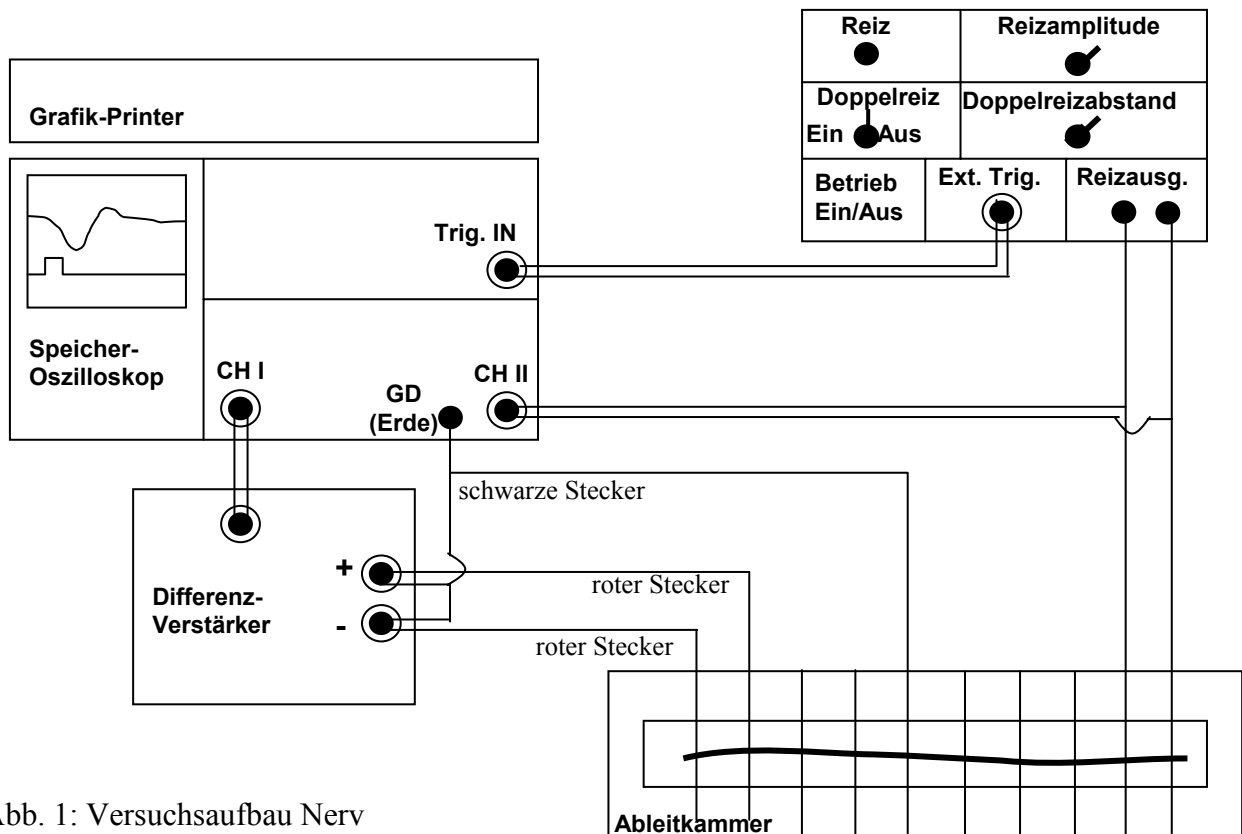


Abb. 1: Versuchsaufbau Nerv

### 3. Messung des Reizartefakts

Legen Sie einen feuchten Faden über die Elektroden der Ableitkammer und reizen Sie mit einer Serie von Einzelreizen mit einer Reizamplitude von 3 V. Speichern Sie das abgeleitete Signal und drucken Sie es aus (Achsenbeschriftung und –skalierung!). Wie lässt sich dieses erklären?

#### **4. Ableitung eines fortgeleiteten diphasischen Summenaktionspotentials bei unterschiedlichen Reizstärken**

Ein Summenaktionspotential (SAP) entsteht bei synchroner Erregung mehrerer oder sämtlicher Axone eines Nerven. Die Ableitung erfolgt extrazellulär. Die Amplitude des SAPs hängt von der Anzahl und Dicke der erregten Axone und damit von der Reizamplitude ab. Bei der Reizamplitude unterscheidet man zwischen der *Schwellenreizstärke* (kleinste Reizamplitude, die eben noch ein messbares SAP auslöst) und der *Maximalreizstärke* (Reizamplitude, ab der eine weitere Vergrößerung keine Zunahme der SAP-Amplitude bewirkt).

##### **Versuchsdurchführung und Auswertung:**

Bevor der Nerv jeweils für eine Messreihe in die Ableitkammer quer über die Reiz- und Messelektroden gelegt wird, müssen Sie sich über die gesamte Aufgabe klar geworden sein und alle Geräte richtig eingestellt haben. Erst dann wird der Nerv platziert, eine Messreihe zügig durchgemessen, und dann der Nerv in die Ringerlösung zurückgelegt. Zwischen zwei Messreihen – jedoch nie innerhalb einer Messreihe – kann der Nerv auch mit Ringerlösung beträufelt werden. Das Beträufeln mit Ringerlösung, das Bewegen des Nerven auf den Elektroden, sowie das Antrocknen des Nerven bei langen Messzeiten verändern die Ableitbedingungen und somit die Messergebnisse innerhalb einer Messreihe!

Stellen sie das Reizgerät auf Einzelreize ein mit einer Amplitude von 0 mV. Überlegen Sie sich sinnvolle Einstellungen für die Zeitachse und die Reizamplitudenachsen am Oszilloskop.

**4a)** Platzieren Sie nun das Präparat und erhöhen Sie schrittweise langsam die Reizamplitude. Messen Sie die Amplitude des SAPs in Abhängigkeit von der (ebenfalls gemessenen) Reizamplitude und tragen Sie die Werte in eine Tabelle ein.

**4b)** Speichern Sie ein typisches SAP auf dem Oszilloskop und drucken Sie es aus. Skalieren und beschriften Sie beide Achsen auf dem Ausdruck (mit Reiz).

**4c)** Zeichnen Sie ein Diagramm über die Zunahme der SAP-Amplitude in Abhängigkeit von der Reizamplitude. Bestimmen sie die *Minimal-* und *Maximalreizstärke*.

#### **5. Bestimmung der Geschwindigkeit der Erregungsleitung**

In diesem Experiment sollen Sie feststellen, wie groß die Geschwindigkeit ist, mit der Aktionspotentiale im Froschnerven weitergeleitet werden.

Das Prinzip der Geschwindigkeitsmessung besteht darin, dass das vom Reiz ausgelöste SAP einmal nahe am Reizort und einmal in einem weiteren Abstand vom Reizort registriert wird. Aus dem Abstand zwischen den beiden Ableitelektrodenpaaren (s) und dem ermittelten Zeitunterschied (t) zwischen den abgeleiteten SAPs kann die Leitungsgeschwindigkeit (v) errechnet werden ( $v=s/t$ ). Die Reizung sollte mit der Maximalreizstärke erfolgen.

**Durchführung und Auswertung:**

**5a)** Leiten Sie mit einer Serie von Einzelreizen erst das SAP an reiznahen Ableitelektroden ab, speichern Sie es auf dem Bildschirm und drucken Sie es aus. Stecken Sie die Ableitelektroden in eine reizfernere Position um, speichern und drucken Sie die 2. Ableitung. Die Elektrodenpaare sollten bei diesem Versuch möglichst weit auseinander stehen, um die Länge des Nerven maximal zu nutzen. Verändern Sie die Oszi-Einstellungen zwischen den beiden Messungen möglichst nicht, um die Abbildungen hinterher besser vergleichen zu können.

**5b)** Bestimmen Sie die Zeitdifferenz zwischen den beiden SAP-Gipfeln und den Abstand zwischen den beiden Ableitelektrodenpaaren. Errechnen Sie daraus die Leitungsgeschwindigkeit in m/s.

**5c)** Vergleichen Sie Ihre Werte mit den Literaturwerten für die verschiedenen Fasertypen des Froschnerven.

**6. Bestimmung der Refraktärzeit beim Froschnerven**

Die Refraktärzeit eines Nerven ist die Zeitspanne, in der er während und nach einer Erregung überhaupt nicht (absolute Refraktärzeit) oder aber nur mit höheren Reizamplituden (relative Refraktärzeit) erneut erregt werden kann bzw. in der bei gleicher Reizamplitude die Amplitude des zweiten SAPs kleiner ist. Zum Nachweis dieses Phänomens werden zwei Reize (Doppelreize) benötigt, deren zeitlicher Abstand (Doppelreizabstand) variiert werden kann. Mit dem zweiten Reiz wird das refraktäre Verhalten des Nervs nach dem ersten Reiz bestimmt.

Für diese Messungen verwenden Sie Doppelreize mit knapp maximaler Reizamplitude. Der Doppelreizabstand wird systematisch variiert.

**Durchführung und Auswertung:**

**6a)** Registrieren Sie mit dem Oszilloskop beide SAP-Antworten auf den Doppelreiz auf einem Bildschirm. Messen Sie die Amplituden des zweiten SAPs und tragen Sie die Werte in Abhängigkeit vom Doppelreizabstand in eine Tabelle ein.

**6b)** Drucken Sie einige repräsentative Messungen aus (Achsen beschriften!)

**6c)** Zeichnen Sie ein Diagramm der Amplitude des zweiten SAPs in Abhängigkeit vom Doppelreizabstand. Bestimmen Sie aus dieser Messreihe die absolute und relative Refraktärzeit.

**6d)** Überlegen Sie, welche maximale Reizfrequenz der vorliegende Froschnerv ohne Ausfall von Aktionspotentialen beantworten kann. Bedenken Sie, wie sich bei einem SAP der Ausfall von Aktionspotentialen einzelner Axone äußert.

**7. Umwandlung des diphasischen SAPs in ein monphasisches SAP**

Ein diphasisches SAP kommt durch Wandern der Erregungswelle entlang der Axone über zwei Ableitelektroden hinweg zustande. Zuerst wird die erste Elektrode und dann die zweite Elektrode negativ gegenüber der jeweils anderen. Das diphasische SAP lässt sich folglich dadurch in ein monphasisches umwandeln, dass die zweite Elektrode an eine unerregbare Stelle des Nerven gelegt wird.

**Durchführung und Auswertung:**

Der Nerv wird zwischen den beiden Ableitelektroden dadurch unerregbar gemacht, dass er dicht vor der zweiten Elektrode mit einem Faden abgebunden oder mit einer Pinzette kräftig gequetscht wird. Dabei möglichst die Lage des Nerven nicht verändern.

**7a)** Leiten Sie zuerst ein diphasisches SAP ab und drucken Sie es aus (Achsen beschriften!). Quetschen Sie dann den Nerv zwischen den beiden Ableitelektroden ab und leiten Sie erneut ein SAP ab (Ausdruck!).

**7b)** Welche Unterschiede bestehen zwischen einem diphasischen und einem monophasischen SAP? Wie lässt sich die Form des diphasischen SAP aus den monophasischen SAPs erklären? Bestimmen Sie die Dauer des monophasischen und des diphasischen SAPs. Wodurch wird die Dauer dieser Potentiale beeinflusst? Überprüfen Sie, ob das SAP mehrere Gipfel (Schultern) aufweist, und versuchen Sie solche Gipfel zu erklären.

**8. Leitungsanästhesie am peripheren Nerven**

Sprechen Sie sich untereinander so ab, dass eine Teilgruppe mit ihrem Präparat Versuch 8, die andere Versuch 9 durchführt. Vergleichen Sie danach Ihre Ergebnisse.

Die meisten von Ihnen haben schon einmal die angenehme Wirkung einer örtlichen Betäubung (Lokalanästhesie) verspürt. Die dabei verwendeten Lokalanästhetika sind Medikamente, die eine reversible Blockade der Nervenleitung bewirken. Sie wirken nicht schlagartig, sondern es wird eine gewisse Zeit benötigt, bis ihre Wirkung eintritt. Dies liegt daran, dass die verschiedenen Fasern eines gemischten Nervenstammes nicht alle zur selben Zeit vom Lokalanästhetikum erfasst werden. Seit den dreißiger Jahren wird als Lokalanästhetikum das von Ihnen hier im Praktikum benutzte Xylocain (Wirkstoff: Lidocain) verwendet, ein Abkömmling des Kokains.

**Durchführung und Auswertung:**

Besprühen Sie den Nerven in der Ableitkammer im Bereich zwischen Reiz - und Ableitelektroden mit Xylocain und beginnen sie dann sofort mit den Messungen.

**8a)** Reizen Sie das Präparat mit Einzelreizen von gleicher Reizamplitude im Abstand von 30 s und drucken Sie die resultierenden SAPs aus. Setzen Sie die Messung fort, bis kein SAP mehr ausgelöst werden kann. Falls sich nach 2 min. noch kein Amplitudenabfall des SAPs zeigt, sprühen Sie erneut Xylocain auf und wiederholen die Messung. Skalierung auf den Ausdrucken nicht vergessen!

**8b)** Erstellen Sie ein Diagramm der SAP-Amplitude als Funktion der Zeit vor und während der Xylocaineinwirkung. Worauf beruht die Wirkung von Xylocain? Wie lange dauert es bis Xylocain den Nerven vollständig betäubt hat?

## 9. Betäubung eines Nerven mit Äther

### **Durchführung und Auswertung:**

Legen Sie ein Stück Filterpapier zwischen Kammer und Abdeckplatte, das mit etwas Äther getränkt wurde (feucht, aber nicht tropfend).

**9a)** Reizen Sie das Präparat mit Einzelreizen von gleicher Reizamplitude im Abstand von 10 s und drucken Sie das resultierende SAP aus. Setzen Sie die Messung fort, bis kein SAP mehr ausgelöst werden kann. Entfernen Sie anschließend das Filterpapier und legen Sie es unter den Abzug.

**9b)** Zeichnen Sie ein Diagramm der SAP-Amplitude als Funktion der Zeit vor und während der Äthereinwirkung. Wie lange dauert es, bis Äther den Nerven vollständig betäubt hat?

**9c)** Worauf beruht die Wirkung von Äther?

### **ERFOLGSKONTROLLE**

Nach diesem Praktikumsteil sollten Sie in der Lage sein:

- den Aufbau eines peripheren Nerven am Beispiel des Nervus ischiadicus zu beschreiben,
- die nacheinander ablaufenden Vorgänge von der synaptischen Reizung eines Motoneurons bis hin zur synaptischen Übertragung an der motorischen Endplatte zu erläutern,
- den Unterschied zwischen einem AP und einem SAP zu erklären,
- den Entstehungsmechanismus des diphasischen SAPs zu erklären,
- die Größenordnung der Amplitude eines vom Froschnerven abgeleiteten SAPs anzugeben,
- die ungefähre Dauer eines mono- und diphasischen SAPs anzugeben,
- eine Methode zur Umwandlung eines diphasischen in ein monophasisches SAP erklären zu können,
- anzugeben, wie man die Nervenleitungsgeschwindigkeit bestimmt,
- die Leitungsgeschwindigkeit der schnellen Fasern anzugeben,
- die Bedeutung der Längskonstante bei der elektrotonischen Erregungsausbreitung zu erklären,
- den Zusammenhang zwischen Axondurchmesser und Leitungsgeschwindigkeit zu beschreiben,
- die Dauer der absoluten und relativen Refraktärphase am Froschnerven zu nennen,
- zu erklären, weshalb das SAP in der relativen Refraktärphase kleiner wird,
- die Ursache der relativen und absoluten Refraktärzeit zu nennen,
- den Versuchsaufbau zu skizzieren,
- die Versuchsanordnung selbständig zu verschalten,
- die in Ihrem Protokoll aufgeführten Kurven zu skizzieren.