

Versuch N2: Ableitung von Nervenaktionspotenzialen am intakten Regenwurm

Betreuer: Naynert

Raum: S 703

1. Versuchsziel:

In diesem Versuch sollen Nervenaktionspotenziale dargestellt und die Leitungsgeschwindigkeit solcher Potenziale in den Riesenfasern des Bauchmarks beim Regenwurm gemessen werden. Die Versuche werden am intakten, festgelegten Tier durchgeführt. Dafür soll zunächst eine Apparatur zur Messung der Aktionspotenziale selbständig aufgebaut werden. Dieser Versuch baut auf dem Versuch N1 auf und erweitert ihn um die Erregungsweiterleitung. Die Studierenden sollen erfahren, welche Unterschiede zwischen Computersimulationen und eigenem experimentellen Arbeiten bestehen.

Da in diesem Versuch mit einem lebenden Tier gearbeitet wird, ist eine Durchführung nur sinnvoll, wenn die Studierenden die theoretischen Grundlagen (N1) verstanden haben. Zur besseren Vorbereitung sollten folgende Begriffe und Vorgänge verstanden und präsent sein, d.h. erläutert werden können:

Entstehung des Ruhepotenzials einer Zelle.
Kanaltypen in Nervenzellmembranen.
Mögl. z. Untersuchung von Kanälen (Fugu!)
Rezeptorpotenziale/ synaptische Potenziale
Depolarisation/Hyperpolarisation.

Elektrotonische Potenziale.
Vorgänge während eines
Aktionspotenzials.
Refraktärphase, absolut/relativ.

Der Regenwurm: Rekapitulation des Stoffes aus Anatomie und Morphologie der Tiere (system. Stellung, Aufbau, Muskulatur, etc.)

2. Theoretische Vorbereitung:

Erregungen werden im Nervensystem mit Hilfe von Aktionspotenzialen über Axone (Nervenfasern) weitergeleitet und an Synapsen von einer Zelle auf die nächste übertragen. Aktionspotenziale entstehen, wenn Nervenzellen so stark depolarisiert werden, daß ein Schwellenwert erreicht wird. An diesem Schwellenwert öffnen sich spannungsgesteuerte Natrium-Kanäle, so daß Natrium in die Zelle gelangt und diese weiter depolarisiert. Die anschließend ablaufenden Mechanismen (hauptsächlich auf Grund von Änderungen der Membranleitfähigkeit für Natrium- und Kaliumionen) führen zu einer Alles-oder-Nichts-Antwort, dem Aktionspotenzial.

Die Fortleitung von Aktionspotenzialen (auch Nervenimpulse genannt) erfolgt teilweise über weite Strecken. Dabei spielen die Kabeleigenschaften der Nervenfasern eine große Rolle (siehe Eckert, Kap. 6; der Begriff der Längskonstante Lambda (λ) sollte verstanden sein!). Bei „einfachen“ Axonen laufen die Aktionspotenziale kontinuierlich als Wanderwelle über die gesamte Axonmembran; diese Art der Erregungsweiterleitung ist in den (meistens sehr dünnen) Nerven relativ langsam. Um schnelle Reaktionen auszuführen, die für das Überleben des Organismus entscheidend sind (Fluchtreaktionen, Schutzreflexe), wurden im Laufe der Evolution zwei Wege entwickelt, die Geschwindigkeit der Aktionspotenzial-Weiterleitung zu erhöhen. Beide Wege beruhen auf dem Effekt, den Potenzialverlust über die Membran zu verringern. Bei Vertebraten entstand die saltatorische Erregungsleitung: Längere Abschnitte des Axons wurden durch Myelinisierung (Umwicklung mit Membranen) isoliert, so daß keine Potenzialverluste über die Membran erfolgen können. In den myelinisierten

Abschnitten kommt es zur ausschließlich longitudinalen, elektrotonischen Ausbreitung des Stroms. In den "Lücken" der Myelinschicht, den Ranvierschen Schnürringen, erfolgt dann wieder ein neues Aktionspotenzial. Ein Aktionspotenzial wird damit nicht kontinuierlich entlang einer Axonmembran fortgeleitet, sondern „springt“ von einem Ranvierschen Schnürring zum nächsten (=>saltatorisch). Da die elektrotonische Fortleitung der Depolarisation entlang des Axons schneller vor sich geht als die Wanderwellengeschwindigkeit des Aktionspotenzials, konnte damit die Nervenleitungsgeschwindigkeit gesteigert werden.

Der andere Weg, die Leitungsgeschwindigkeit von Axonen zu erhöhen, ist u.a. bei den Arthropoden, Anneliden und Cephalopoden entstanden. Dort existieren Riesenfasern, die bis zu mehreren Millimetern dick sein können und vor allem zur schnellen Aktivierung lokomotorischer Reflexe dienen (Fluchreflexe o.ä.). Durch die Vergrößerung des Axondurchmessers haben die Riesenfasern einen geringeren Längswiderstand als dünne Fasern. Der elektrotonischen Ausbreitung des Stroms entlang der Längsachse wird daher weniger Widerstand entgegengesetzt, und damit wird gleichzeitig der Anteil der Leckströme über die Membran reduziert. Die elektrotonische Fortleitung der Depolarisation entlang des Axons ist also erleichtert, und dadurch können weit entfernte Membranbereiche des Axons bis zur Schwelle depolarisiert werden => die Wanderwelle des Aktionspotenzials läuft sehr viel schneller als bei dünnen Fasern.

Der Regenwurm besitzt, wie alle Oligochaeten, drei solcher Riesenfasern im Dorsalbereich des Bauchmarks: zwei laterale und eine mediane. Sie sind von einer dicken Markscheide umgeben und segmental durch schräggestellte Septen unterbrochen (vgl. Abb. 1; Überlegung: macht das eigentlich Probleme bei der Aktionspotenzialweiterleitung?). Die einzelnen Faserabschnitte bestehen aus Riesenzellen, die durch die Verschmelzung mehrerer Einzelzellen entstanden sind und dementsprechend viele Zellkerne besitzen (wie heißen solche Riesenzellen, und wo findet man sie noch?). Die lateralen Fasern werden bis zu 50 µm, die mediane bis zu 70 µm dick. Die Fasern sind funktionell verschieden: die mediane leitet die Erregung von den Mechanorezeptoren des Vorderendes (vordere 40 Segmente) nach hinten, wo die Muskulatur aktiviert wird. Die lateralen Fasern leiten die Erregung von den Mechanorezeptoren des Hinterendes (hintere 40 Segmente) zur Muskulatur nach vorn. Die Riesenfasern bilden kräftige Aktionspotenziale aus, die sogar von der Außenseite des Wurmes abzuleiten sind. Auch bei elektrischer Stimulation verhalten sich die Riesenfasern unterschiedlich: die mediane Faser kann schon durch relativ geringe Ströme zur Aktionspotenzialbildung stimuliert werden, die laterale Faser benötigt höhere Ströme (Warum?)

c) Literatur:

Eckert R. Tierphysiologie 2 Aufl. (1993) Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 148-164

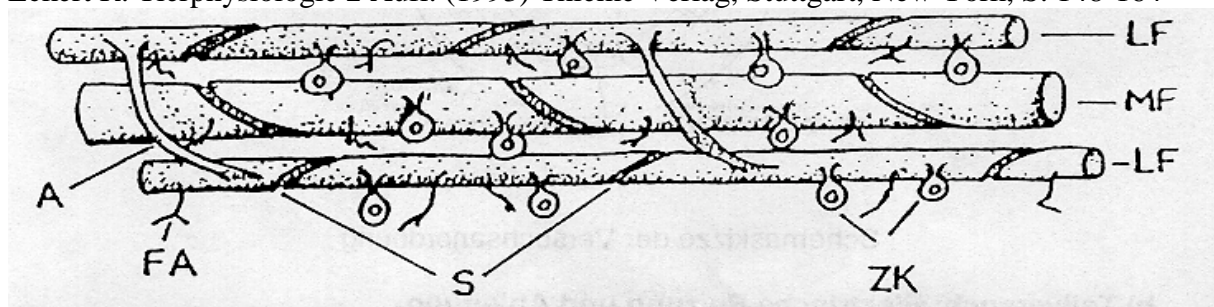


Abb.1: Skizze der dorsalen Riesenfasern von *Lumbricus*

(Ansicht von oben - nach Bullock, 1945, aus Bullock and Horridge, 1965, S. 703).

(A Anastomosen zwischen den lateralen Fasern; LF laterale Fasern; MF mediane Faser; S Septe; ZK Zellkörper; FA Faseraufzweigung zu den Muskeln)

3. Benötigte Materialien und Geräte

Versuchskammer, Faraday-Käfig, Reizgerät, Isolator, Differenzverstärker, 2-Kanal-Oszilloskop; Kabel mit LEMO-, BNC- und Bananenstecker-Anschlüssen

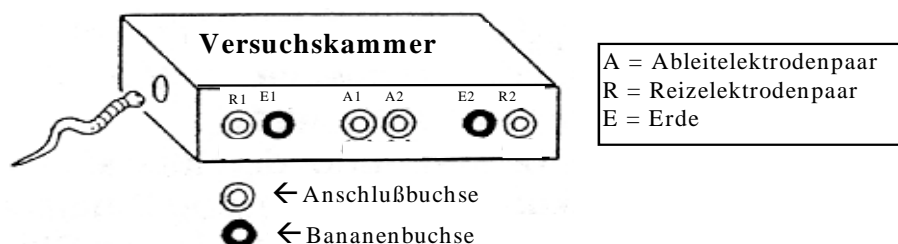


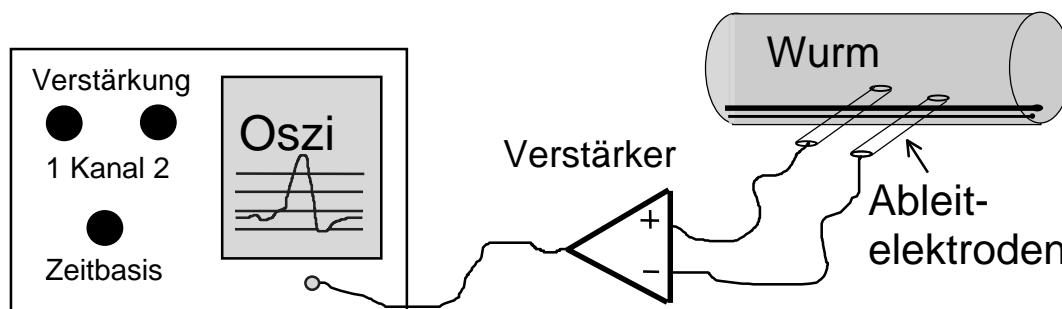
Abb. 2: Skizze der Versuchskammer

Versuchstiere: Regenwürmer (*Lumbricus terrestris*) oder Tauwürmer (*Eisenia foetida*)

4. Versuchsaufbau:

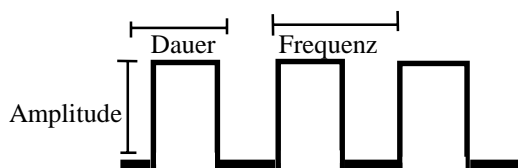
4.1 Ableitkette des Aufbaus

Wie oben bereits erwähnt, können die Aktionspotenziale der Riesenfasern selbst von der Oberfläche des Wurmes her abgeleitet werden. Die Höhe der Potenziale beträgt allerdings nur noch wenige MicroVolt, da die dazwischenliegenden Muskelschichten die ursprüngliche Höhe des Aktionspotenzials (wieviel mV normalerweise?) stark abdämpfen. Die abgeleiteten Potenziale müssen also verstärkt werden, um sie auf einem Oszillographen darstellen zu können. Als Ableitelektroden dienen jeweils 2 Metalldrähte, die sich in der Ableitkammer befinden und auf denen der Wurm liegt. Diese werden über Kabel mit dem Differenzverstärker verbunden, der die Potentialdifferenz zwischen den beiden Elektroden verstärkt und über ein weiteres Kabel auf einem Oszillographen darstellt.



4.2 Stimulationskette des Aufbaus

Der Wurm wird in der Apparatur nicht mechanisch gereizt, sondern durch elektrische Stimulation werden die Riesenfasern direkt erregt und zur Aktionspotenzialbildung gebracht. Als elektrische Stimuli dienen meist Rechteckreize:



Alle drei Parameter (Amplitude, Dauer und Frequenz) der elektrischen Stimuli können an dem Reizgerät eingestellt werden. Dieses kann entweder Einzelreize (single) oder repetitive Stimuli mit der eingestellten Frequenz produzieren. Diese Stimuli werden dann über einen Isolator auf die Versuchskammer geleitet und stimulieren über zwei Kontakte das Tier.

Da die abgeleiteten Aktionspotenziale nur von sehr kurzer Dauer sind, muß die Darstellung auf dem Oszilloskop jeweils nur den Zeitbereich darstellen, in dem auch ein Aktionspotenzial zu erwarten ist. Da dieses unmittelbar nach der Stimulation kommen sollte, können wir das Oszilloskop auf die Stimulation triggern: Jeweils bei Produktion eines Elektrostimulus durch das Reizgerät läuft auch die Oszilloskopdarstellung los. Dazu muß der Synchronisationsausgang des Reizgerätes mit dem Triggereingang des Oszilloskop verbunden werden.

Einstellung am Oszilloskop: Zeitablenkung: 1 ms/div; Verstärkung. 20 mV/div bei 1000x Vorverstärkung; Trigger: extern, AC, negativ.

Bauen Sie die Apparatur jetzt selbst auf. Bevor Sie allerdings den Wurm stimulieren, lassen Sie die Anlage auf jeden Fall vom Versuchsassistenten kontrollieren!

5. Versuchsdurchführung:

a) Beobachtung des Zuckreflexes:

- Beobachten Sie die normalen Bewegungen des Regenwurms auf der Unterlage (Tisch).
- Lösen Sie den Zuckreflex durch mechanische Reizung (kurzes Antippen) des vorderen, mittleren und hinteren Körperabschnitts und beobachten Sie die Reaktion des Regenwurms.

b) Elektrische Reizung, fixierter Wurm:

Generell: Stimulieren Sie das Tier nicht öfter als notwendig, vor allem nicht mit überschwelligem Reizen, da diese für das Tier eine Stresssituation darstellen!

b1) Schwellenbestimmung für die mediane Riesenfaser: Reizfrequenz: 2 Hz; Impulsbreite: 0.2 ms. Lassen Sie jetzt den gesäuberten und mit Fließpapier abgetupften Regenwurm in die Versuchskammer kriechen. Verschließen Sie die Enden der Kammer mit den Plastikstopfen.

Achtung Fehlerquelle: Achten Sie darauf, daß sich zwischen Regenwurm und den Elektrodendrähten keine Luftblasen befinden, da es sonst keinen elektrischen Kontakt gibt!!

Erhöhen Sie jetzt die Reizamplitude von 0 aus langsam bei Multiplikatorstellung x1 (Die Schwelle liegt bei ca. 4V). Zeichnen Sie die Signale ab und interpretieren Sie, welches Signal von der medianen Nervenfaser stammt und welches vom Muskel.

b2) Hemmung der Muskelaktivität (falls vorhanden) durch Ermüdung der neuromuskulären Synapsen: Bei überschwelliger Reizamplitude (Schwelle aus Versuch b1 + 0.5 V) erhöhen Sie die Reizfrequenz solange, bis das Muskelsignal verschwindet.

b3) Schwellenbestimmung für die lateralen Riesenfasern: Reizfrequenz: 2 Hz; Impulsbreite: 0.2 ms; Zeitablenkung am Oszilloskop 1 oder 2 ms/div. Erhöhen Sie die Reizamplitude über den Wert des vorigen Versuches hinaus, bis Sie das Signal der lateralen Riesenfasern erhalten (Schwelle ca. 8 V. Die Schwellenwerte für die mediane und laterale Fasern lassen sich nicht immer so deutlich trennen) Sollten die lateralen Fasern auch bei Spannungen über 10 Volt nicht erregbar sein, halten Sie Rücksprache mit dem Assistenten.

b4) Messung der Leitungsgeschwindigkeiten: Es sollen die Signale der medianen und, falls möglich, auch der lateralen Riesenfasern sichtbar sein. Benutzen Sie außer dem Elektrodenpaar A1 auch noch das Elektrodenpaar A2 zum Ableiten. Wie kann man damit die Leitungsgeschwindigkeit ermitteln?

b5) Benutzen Sie jetzt die noch nicht verwendete Reizelektrode zur Stimulation. Was beobachten Sie bei überschwelliger Reizung (Schwelle aus Versuch b3 + 0.5 V)?

b6) Erstellen Sie eine Reizzeit-Spannungs-Kurve zur Bestimmung von Chronaxie und Rheobase (Erklärung durch Assistenten): Reizfrequenz: 2 Hz; Bestimmen Sie minimale Reizspannungen für die Impulsbreiten: 1.0 - 0.8 - 0.6 - 0.4 - 0.3 - 0.25 - 0.2 - 0.15 - 0.1 - 0.05 ms.

Am Ende des Versuches geben Sie den Regenwurm bitte wieder in die Dose zurück.

6. Auswertung und Protokoll

1. Beschreiben Sie die Bewegung und die Reaktionen des Regenwurms auf mechanische Reizung. Gibt es Unterschiede bei Reizung des vorderen bzw. hinteren Endes?
2. Charakterisieren Sie die am Oszilloskop sichtbaren Signale. Welche Form, Größe und Polarität haben sie? Wie groß sind die Stimulationsschwellen für die mediane bzw. die lateralen Fasern? Bei welcher Reizfrequenz verschwindet das Muskelpotenzial? In welche Richtung wird die Erregung geleitet?
2. Berechnen Sie aus Versuch b4 die Leitungsgeschwindigkeit für die mediane und (ggflls) die lateralen Riesenfasern (Werte in m/s angeben) aus dem zeitlichen Abstand zwischen dem Beginn des Reizartefakts und dem jeweiligen Potenzial und dem Abstand der Ableitelektrodenpaare.
3. Stellen Sie die gewonnenen Meßwerte aus Versuch b6 als Funktion der Reizimpulsbreite in einem Graphen auf Millimeterpapier dar, und zeichnen Sie jeweils Rheobase und Chronaxie ein. Achten Sie auf den "Alles-oder-Nichts"-Charakter der Reizantworten!

Diskutieren Sie kurz die von Ihnen gewonnenen Ergebnisse der Versuche b1-b6 und stellen Sie diese in Zusammenhang mit den folgenden Fragen:

1. Welchen physiologischen Sinn hat der Zuckreflex?
2. Erklären Sie die bipolare Form der Aktionspotenziale mit Hilfe der von Ihnen angewandten Ableittechnik. Fertigen Sie dazu eine Skizze der Ableitung an.
3. Vergleichen Sie die von Ihnen ermittelten Werte für die Leitungsgeschwindigkeit der medianen und lateralen Riesenfasern mit Literaturwerten. Diskutieren Sie den Einfluß des Kontraktionszustandes des Wurms auf die berechnete Leitungsgeschwindigkeit. Vergleichen Sie die Leitungsgeschwindigkeiten der Riesenfasern mit denen von schnell leitenden Nervenfasern bei Vertebraten (z.B. Mensch). Welche Lösung des Problems "Erhöhung der Nervenleitungsgeschwindigkeit" erscheint Ihnen effektiver, die der Invertebraten oder die der Vertebraten? Warum? (Zusatzfrage: Warum, glauben Sie, haben Invertebraten dennoch nur Riesenfasern?).
4. Wie läßt sich das Verschwinden des Muskelpotenzials bei hoher Reizfrequenz erklären?
5. Warum ist die Reizschwelle der medianen Faser (normalerweise) kleiner als die der lateralen Fasern?

8. Übungsfragen (diese müssen nicht im Protokoll aufgeführt werden, sollten aber problemlos beantwortet werden können. Falls Sie diese in das Protokoll aufnehmen wollen, haben Sie jedoch eine zusätzliche Kontrolle Ihres Wissensstandes durch den Assistenten!)

1. Was ist das Membranpotenzial, durch welche Ionen wird es bestimmt?
2. Wie entsteht ein Aktionspotenzial?
3. Wie funktionieren spannungsabhängige Natrium- und Kaliumkanäle?
4. Welche Funktion hat die Myelinscheide, und wie erfolgt die Myelinisierung einer Nervenfasers?
5. Wie funktioniert synaptische Übertragung?