

Яковлева О.В., Яковлев А.В., Хазипов Р.Н., Ситдикова Г.Ф.

**Учебно-методическое пособие
Физиология возбудимых систем
Часть 1**

Казань 2012

УДК 612.813

*Печатается по решению Редакционно-издательского совета
ФГАОУВПО*

«Казанский (Приволжский) федеральный университет»

*методической комиссии института фундаментальной медицины и
биологии*

Протокол № 3 от 18 октября 2012 г.

заседания кафедры физиологии человека и животных

Протокол № 3 от 26 сентября 2012г.

Рецензенты:

канд. биол. наук, ст. преп. кафедры нормальной физиологии КГМУ
- Петров А.М

канд. биол. наук, доц. кафедры физиологии человека и животных
КФУ - Еремеев А.М.

Яковлева О.В., Яковлев А.В., Хазипов Р.Н., Ситдикова Г.Ф.

**Физиология возбудимых систем Часть 1: Учебное пособие /
Яковлева О.В., Яковлев А.В., Хазипов Р.Н., Ситдикова Г.Ф. –
Казань: Казанский университет, 2010. – 43 с.**

В настоящее учебно-методическое пособие включены теоретические материалы и лабораторные работы по физиологии возбудимых систем, включающие главы: «Механизмы транспорта ионов и веществ через мембрану», «Потенциал покоя» и «Потенциал действия». Работы рассчитаны на самостоятельное выполнение их студентами. Каждая лабораторная работа включает в себя методические указания и практические задачи. После выполнения работы студенты делают выводы на основании полученных экспериментальных исследований. Для контроля уровня знаний студентов по пройденному материалу в пособии имеются контрольные вопросы. Практикум предназначен для студентов-специалистов, бакалавров, магистров, обучающихся на биологических и медицинских факультетах ВУЗов при изучении таких курсов как физиология, нормальная физиология, биофизика, физиология возбудимых систем, нейрофизиология и др.

© Казанский университет, 2012

© Яковлева О.В., Яковлев А.В.,
Хазипов Р.Н., Ситдикова Г.Ф. 2012

Введение

Возбудимыми тканями, являются такие ткани, клетки которых способны в ответ на раздражение генерировать специфическую реакцию - возбуждение. К ним относятся нервные, мышечные и некоторые секреторные клетки. **Возбуждение** – это процесс перехода живой клетки из состояния покоя в состояние активности, с появлением в клетке высокоамплитудного, электрического сигнала - потенциала действия или, как его иногда называют, нервного импульса. **Раздражение**, это процесс действия раздражителя – фактора внешней или внутренней среды, который, действуя на возбудимую клетку, вызывает возбуждение. **Раздражитель** вызывает возбуждение только тогда, когда его сила равна или превышает определенную величину – **порог раздражения**. Поэтому способность возбуждаться (**возбудимость**) обратно пропорциональна порогу раздражения. В основе свойств возбудимых тканей лежат особенности строения мембран, обеспечивающие избирательную проницаемость для ионов и веществ, градиент концентраций ионов, создание мембранного потенциала покоя и генерацию потенциала действия. Настоящее учебно-методическое пособие включает три главы, посвященные свойствам мембран живых клеток, создания потенциала покоя и генерации потенциала действия. Каждая глава содержит теоретические материалы, лабораторные работы по соответствующей тематике и контрольные вопросы.

Данное пособие может быть использовано студентами-специалистами, бакалаврами, магистрами биологических и медицинских специальностей при изучении курсов физиология, биофизика, спецкурсов «Физиология возбудимых систем», «Нейрофизиология» и др. Часть работ выполняется с использованием электрофизиологического учебного аппарата Вiorac (США).

Оглавление

Глава 1	Механизмы транспорта ионов и веществ через мембрану	5
	Лабораторная работа № 1 Изучение активного транспорта ионов натрия через кожу лягушки	8
	Лабораторная работа № 2 Исследование односторонней проницаемости кожи лягушки или иной живой ткани для метиленового синего	9
	Лабораторная работа № 3 Исследование влияния рН на проницаемость кожи лягушки	12
Глава 2	Потенциал покоя	14
	Лабораторная работа № 4 Зависимость величины потенциала покоя мышцы лягушки от точки приложения электродов к поперечному разрезу и продольной поверхности	16
	Лабораторная работа № 5 Потенциал покоя мышцы лягушки, изменение во времени, явление освеживания разреза	17
	Лабораторная работа № 6 Влияние ионов калия на потенциал покоя мышцы	18
	Лабораторная работа № 7 Потенциал покоя слизистой языка лягушки	18
	Лабораторная работа № 8 Измерение мембранного потенциала диафрагмальной мышцы мыши	19
Глава 3	Потенциал действия	21
	Лабораторная работа № 9 Исследование потенциала действия нервной цепочки дождевого червя	29
	Лабораторная работа № 10 Регистрация потенциала действия от брюшного нервного ганглия мадагаскарского таракана	32
	Лабораторная работа № 11 Потенциал действия седалищного нерва лягушки	34
	Лабораторная работа № 12 Проведение потенциала действия по нервным волокнам	36
	Лабораторная работа № 13 Особенности ритмического возбуждения нервных волокон	37
	Лабораторная работа № 14 Оценка порогов раздражения в различных двигательных точках у различных испытуемых	39
	Лабораторная работа № 15 Исследование зависимости между силой раздражителя и его длительностью	41

Глава 1. Механизмы транспорта ионов и веществ через мембрану

Мембраны клеток ответственны за выполнение многих важнейших функций живой клетки. Их главная роль - служить барьером и поддерживать неравновесную концентрацию веществ в цитоплазме. В возбудимых клетках особенности строения мембран лежат в основе формирования потенциалов в живой ткани. Мембраны способны избирательно пропускать заряженные частицы - ионы и электроны. Этот селективный транспорт делает возможным генерацию и распространение нервного импульса. В мембранах расположены многочисленные рецепторы, которые поддерживают контакты клетки с окружающей средой. В мембране непрерывно идут разнообразные биохимические реакции. Мембрана для клетки является основой ее существования. Клеточные мембраны состоят из липидов и встроенных в липиды белковых молекул. Молекулы липидов организованы в двухслойную мембрану (бислой) толщиной около 6 нм. Полярные гидрофильные головки липидов обращены к поверхностям мембраны, а гидрофобные хвосты вытянуты к середине бислоя. Липиды очень плотно упакованы, поэтому мембрана плохо пропускает воду, практически непроницаема для ионов, не говоря уже о других крупных молекулах. Белковые молекулы частично погружены в слой липидов либо с внеклеточной, либо с цитоплазматической стороны. Некоторые белки целиком пронизывают мембрану. Именно пронизывающие мембрану трансмембранные белки образуют структуры, обеспечивающие движение ионов через мембрану (переносчики и ионные каналы). По весу примерно половина бислоя приходится на различные фосфолипиды, половина - на белки. Белки значительно крупнее, их молекулярный вес в среднем на два порядка больше, чем у липидов. Это значит, что концентрация белков на два порядка ниже, чем концентрация липидов. Снаружи мембрана, как правило, имеет слой гликокаликса, а внутри она связана с мембранным или цито-скелетом.

Существует два принципиальных механизма перемещения веществ через мембрану – посредством **простой диффузии** и при помощи специфических переносчиков, встроенных в мембрану и представляющих собой трансмембранные интегральные белки. К последнему относят **облегченную диффузию** и **активный транспорт** (первично активный и вторично активный). С помощью простой диффузии через мембрану перемещаются водонерастворимые

соединения непосредственно через липидный бислой мембраны, ионы по градиенту концентрации через ионные каналы и молекулы воды (осмос). Несмотря на то, что молекулы воды являются полярными, они диффундируют через липидный бислой очень быстро, что связано с наличием специфических трансмембранных белков – **аквапоринов**, формирующих каналы для воды.

Рассмотрим более подробно строение и функции **ионных каналов**. Ионный канал - это крупный белок, образующий центральную водную пору, которая сообщает наружную и внутреннюю среду клетки. Канал имеет наружное устье, обращенное в сторону межклеточной среды, и внутреннее, которое обращено в сторону цитоплазмы. Кроме этого канал имеет ворота - специальный участок, который может конформационно меняться и перекрывать водную пору. При помощи этого воротного механизма канал может открываться и закрываться. Существуют несколько классификаций каналов, которые в разных соотношениях учитывают свойства и характеристики работы каналов, молекулярную организацию и гены, кодирующие, структуру каналов, участие в определенной клеточной функции, регуляцию, чувствительность к химическим блокаторам и др.. Все каналы возбудимых клеток можно разделить **на два основных типа**. Первый тип – это **каналы покоя**, которые спонтанно открываются и закрываются без всяких внешних воздействий. Они важны для генерации МП покоя. Второй тип - это, так называемые, **gate-каналы, воротные каналы** (gate - ворота). В покое эти каналы закрыты и могут открываться под действием тех или иных раздражителей. Раздражители могут действовать непосредственно на канал или опосредовано через систему вторичных посредников. Некоторые разновидности таких каналов принимают участие в генерации электрических сигналов возбудимых клеток (ПД, синаптических и рецепторных потенциалов) .

Большинство ионных каналов характеризуются избирательностью (селективностью), то есть через определенный вид каналов проходят только определенные ионы. По этому признаку различают натриевые (Na-), калиевые (K-), кальциевые (Ca-), хлорные (Cl-) каналы. Селективность каналов определяется размерами поры, размерами иона и его гидратной оболочки, зарядом иона, а также зарядом внутренней поверхности канала. Однако, встречаются и неселективные каналы, которые могут пропускать сразу несколько различных ионов, например, калий и натрий или хлор и калий. Есть каналы, через которые могут проходить все ионы и даже более крупные молекулы.

Простая диффузия не подходит для молекул (например, для аминокислот, глюкозы и ряда других), которые слишком полярны, чтобы проходить через бислой, и слишком велики, чтобы проникать через ионные каналы. Эти молекулы, а также ионы могут переходить через мембрану посредством **облегченной диффузии**, с помощью трансмембранных интегральных белков-переносчиков по градиенту концентрации. В мембранах существует много типов переносчиков, каждый из которых имеет специфические места связывания, специфичные для определенных веществ либо классов связываемых соединений. Например, хотя и аминокислоты, и сахар подвергаются переносу с помощью переносчика, белок, транспортирующий аминокислоты, не транспортирует сахар, и наоборот. Мембраны различных клеток содержат различные типы переносчиков и, таким образом, отличаются по типам транспортируемых веществ и скорости их транспорта.

Активный транспорт опосредован переносчиком, потребляющим энергию, чтобы переместить вещество против электрохимического градиента. При **первично активном** транспорте переносчик прямо использует энергию АТФ, а при **вторично активном** - разницу концентрации ионов относительно мембраны, на создание и поддержание которой была ранее затрачена энергия АТФ. Поскольку эти переносчики перемещают вещество против градиента концентрации, они называются «насосами». Примерами переносчиков, обеспечивающих первично активный транспорт являются Са-АТФаза и Na/K-АТФаза. Первая поддерживает низкую внутриклеточную концентрацию Са, вторая - низкую концентрацию ионов Na и высокую концентрацию ионов K внутри клетки.

Во вторично активном транспорте движение натрия всегда идет по градиенту концентрации, в то время как движение активно транспортируемого вещества на том же самом транспортном белке всегда осуществляется против градиента концентрации. Движение активно транспортируемого вещества при вторично активном транспорте может быть или в клетку (в том же самом направлении, как натрий), тогда этот процесс называется **симпортом** или из клетки (против направления движения натрия), тогда это называется **антипортом**. Например, в большинстве клеток аминокислоты активно транспортируются в клетку симпортом с ионами натрия, повышая внутриклеточную концентрацию от 2 до 20 раз по сравнению с внеклеточным раствором.

Лабораторная работа №1. Изучение активного транспорта ионов натрия через кожу лягушки.

Клетка постоянно осуществляет обмен с окружающей средой. Такой обмен возможен благодаря способности клетки пропускать различные вещества через свою оболочку. Эта способность называется **проницаемостью**. На примере кожи лягушки можно убедиться, что в организме совершается ряд процессов, связанных с активным переносом веществ, в частности, ионов натрия, против концентрационного градиента. Возникающая при этом разность потенциалов между поверхностями кожи может быть скомпенсирована внешней электродвижущей силой (ЭДС). При этом перенос ионов через кожу под влиянием полей невозможен, так же, как и путем диффузии, если растворы по обе стороны кожи идентичны. Между тем однонаправленный поток ионов натрия продолжает осуществляться; о его величине можно судить по току компенсационной цепи. Активный перенос ионов связан с обменом веществ. Метаболические яды приводят к существенному снижению или прекращению переноса ионов натрия и исчезновению разности потенциалов.

Цель работы: изучить активный транспорт ионов натрия через кожу лягушки.

Для работы необходимо: экспериментальная камера, иономер, микроамперметр, батарея, потенциометр, раствор Рингера для холоднокровных животных.

Ход работы:

1. Поместить кожу лягушки на предварительно смазанное вазелином резиновое уплотнение одной из половин камеры. Затем смазать вазелином уплотнение второй половины и соединить камеру, вставляя шпильку в отверстие и плотно затягивая клеммами.

2. В рабочие отделения камеры залить раствор Рингера для холоднокровных животных.

3. Подключить приборы по схеме (рис. 1). Источник напряжения подключить так, чтобы его ЭДС была противоположной ЭДС кожи лягушки (регулировать потенциометром, пока показания микроамперметра не будут равны 0).

4. Измерить разность потенциалов на коже лягушки и регистрировать ее динамику в течение 15 минут.

5. Включив компенсационную цепь и, постепенно увеличивая напряжение, компенсировать разность потенциалов на коже, добиваясь нулевого показания иономера. Величина тока в цепи позволит

рассчитать поток ионов натрия и константу проницаемости для активного транспорта (число переноса). Ток в цепи равен:

$$I = e S p,$$

где e - заряд электрона $1,6 \times 10^{-19}$ К, S - площадь поверхности кожи лягушки, через которую протекает ток (см^2), p - число ионов, проходящих через единицу площади кожи лягушки в единицу времени (число переноса).

6. Измерить ток в цепи компенсации в начале опыта, через 10, 20 и 30 мин.; установить, изменилось ли число переноса.

7. Такие же измерения провести на коже лягушки, обработанной спиртом или эфиром. Сравнить полученные результаты. Построить график изменения числа переноса во времени.

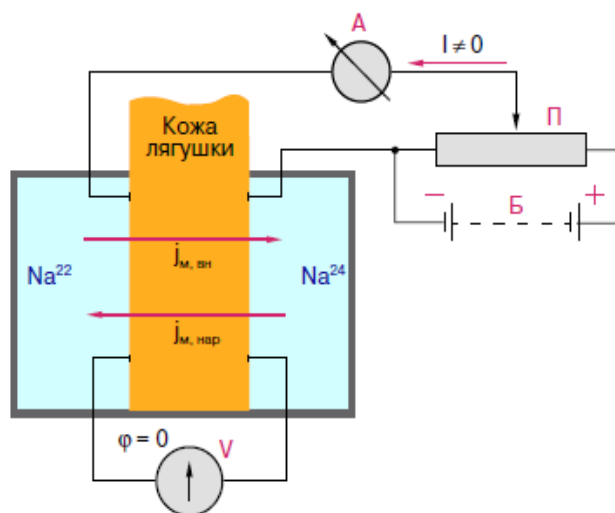


Рисунок 1. Схема измерения тока ионов через кожу лягушки:

$П$ - иономер, потенциометр, A - микроамперметр, V - вольтметр, $Б$ - батарея

Лабораторная работа № 2 Исследование односторонней проницаемости кожи лягушки или иной живой ткани для метиленового синего.

Проницаемостью называется способность клеток и тканей пропускать газы, воду и растворы различных веществ. В основе проницаемости лежит явление диффузии, которое описывается законом Фика:

$$dm/dt = - DS dc/dx ,$$

где m – количество вещества, г; t – время, сек; D – коэффициент диффузии, $\text{см}^2 \cdot \text{сек}^{-1}$; S – площадь поверхности, перпендикулярной направлению диффузии, см^2 ; c – концентрация вещества, $\text{г}/\text{см}^3$; x – расстояние от исходной точки диффузии, см.

Как видно из приведенной формулы, скорость диффузии dm/dt прямо пропорциональна площади поверхности, через которую происходит диффузия, концентрационному градиенту и обратно пропорциональна расстоянию.

Для определения скорости проникновения вещества в клетку из межклеточного пространства используется формула

$$dm/dt = - PS (c - ct) ,$$

где P – константа проницаемости; S – площадь поверхности клетки; c – начальная концентрация вещества; ct – концентрация вещества в момент наступления диффузионного равновесия.

Поскольку диффузия представляет собой пассивный процесс, она осуществляется в обоих направлениях, и со временем происходит выравнивание встречных диффузионных потоков. Кроме того, как видно из вышеприведенных формул, скорость диффузии и проникновения вещества в клетку будет снижаться с уменьшением концентрационного градиента во времени. В живых системах, которые характеризуются определенной интенсивностью обмена веществ, имеют место однонаправленные потоки, базирующиеся на механизмах активного транспорта, осуществляемого против концентрационного градиента. Кроме того, односторонняя проницаемость биологических мембран определяется:

а) физико-химической асимметрией, обусловленной многослойностью тканевых мембран,

б) способностью разных слоев в различной степени адсорбировать молекулы растворенных веществ,

в) различным сродством слоев к веществам, имеющим разную рН,

г) асимметрией белковых молекул переносчиков в мембране

Классической моделью биологической мембраны, обладающей односторонней проницаемостью, является кожа лягушки. Она состоит из двух слоев: соединительно-тканного и эпителиального. Эпителиальный слой лучше адсорбирует молекулы таких красителей, как метиленовый синий, толуидиновый синий, тионин и др. Адсорбционная способность соединительно-тканного слоя хуже. Поэтому молекулы красителей группы тиазонов перемещаются в направлении от соединительной ткани к эпителию.

Цель работы: изучить проницаемость кожи лягушки для красителей в зависимости от точки их приложения и влияния различных химических факторов.

Для работы необходимо: физиологический раствор хлорида натрия, 0.1% и 0.01% растворы метиленового синего на физиологическом растворе, набор препаровальных инструментов, стеклянные трубки различных диаметров с оплавленными концами, маленькие стеклянные стаканчики, широкие резиновые кольца или лента из тонкой резины, нитки, проволочные рамки, термостат, фотоэлектроколориметр, лягушка.

Ход работы

1. Приготавливают препарат кожного мешка. Для этого лягушку обездвигивают, делают кольцевые надрезы кожи на уровне головки бедренной кости и снимают “чулком” кожу с задних конечностей. Во избежание подсыхания получившиеся кожные трубки смачивают водой снаружи и физиологическим раствором изнутри. Готовят два варианта кожных мешков: в нормальном положении – эпителием наружу и в вывернутом – эпителием внутрь. Широкой частью натягивают их на стеклянные трубки подходящего диаметра и укрепляют при помощи прочных ниток. С целью проверки герметичности кожные мешки заполняют физиологическим раствором.

2. Заменить растворы Рингера на равные объемы раствора метиленового синего 0.1% и погрузить цилиндры в стаканчики с 10 мл раствора Рингера. Следить, чтобы уровни раствора красителя в цилиндрах и раствора Рингера в стаканчиках совпадали.

3. Стаканчики с цилиндрами поместить на 1 час в термостат, при температуре 22° С.

4. По истечении указанного срока препараты кожных мешков удаляют, а содержимое стаканчиков колориметрируют, используя в качестве контрольного раствора 0.01 % раствор метиленового синего.

5. Аналогичные опыты провести с кожей лягушки, предварительно помещенной на 30 мин.: а) в дистиллированную воду или б) в 0.125 М раствор КСl.

6. Результаты опытов заносят в табл. 1.

Таблица 1

Образец оформления результатов эксперимента

Количество прошедшего красителя	Исследуемый в физиологическом растворе	после обработки H_2O	после обработки KCl	после обработки 70° этанолом
объект				
Нормальный мешок				
Вывернутый мешок				

Лабораторная работа № 3 Исследование влияния рН на проницаемость кожи лягушки.

Цель работы: изучить проницаемость кожи лягушки для красителей в зависимости от рН.

Для работы необходимо: физиологический раствор хлорида натрия, 0.125% раствор нейтрального красного на физиологическом растворе, набор препаровальных инструментов, стеклянные трубки различных диаметров с оплавленными концами, маленькие стеклянные стаканчики, широкие резиновые кольца или лента из тонкой резины, нитки, проволочные рамки, термостат, фотоэлектроколориметр, лягушка, буферные растворы по Серенсену.

Ход работы

1. Приготавливают препарат кожного мешка как описано в предыдущей работе. Широкой частью натягивают их на стеклянные трубки подходящего диаметра и укрепляют при помощи прочных ниток. С целью проверки герметичности кожные мешки заполняют физиологическим раствором.

2. Для исследования влияния рН на одностороннюю проницаемость кожи лягушки для основного индикатора готовят буферные растворы по Серенсену. Буферные растворы представляют собой фосфатные смеси, приготовленные путем смешивания в различных пропорциях 1/15М раствора Na_2HPO_4 и 1/15 М раствора KH_2PO_4 . Варьируя соотношение исходных компонентов, получают фосфатные смеси (табл. 2).

Таблица 2

Фосфатная смесь Серенсена.

рН	1/15М Na ₂ HPO ₄ , мл	1/15 М раствора КН ₂ РО ₄ .
5,28	0,25	9,75
7,73	9,0	1,0

3. В качестве основного красителя используется 0.125% раствор нейтрального красного, который перед заполнением кожных мешков предварительно забуферивают фосфатной смесью из расчета 1 объем буферного раствора на 2 объема раствора индикатора. Физиологический раствор перед заполнением стаканчиков забуферивают в том же соотношении.

4. Используют следующие сочетания рН буфеных растворов для приготовления наружного раствора и раствора индикатора (табл. 3).

Таблица 3

	рН фосфатной смеси для наружного раствора	рН фосфатной смеси для индикатора	Т, %
	5,28	5,28	
	5,28	7,73	
	7,73	5,28	
	7,73	7,73	

5. Заменить растворы Рингера на равные объемы раствора нейтрального красного и погрузить цилиндры в стаканчики с 10 мл раствора Рингера. Термостатирование кожных мешков производят 1 час в термостате, при 22° С.

6. Перед колориметрированием содержимое стаканчиков подкисляют одной каплей 2% раствора серной кислоты. В качестве контроля используйте подкисленный 0,01 % раствор нейтрального красного.

Полученные результаты внесите в сводную таблицу 3.

Сделайте выводы.

Контрольные вопросы

1. Что называют раздражимостью и возбудимостью?

2. Какие ткани в физиологии называют возбудимыми, какие-

невозбудимыми?

3. Дайте определение понятию "раздражитель".

4. Каким образом можно экспериментально доказать существование активного транспорта натрия?

5. Что понимают под проницаемостью клеточной мембраны? От чего она зависит?

6. Что понимают под проводимостью ионов в электрофизиологии? От чего она зависит?

7. Проницаемость клеточной мембраны для калия или для натрия в состоянии покоя больше?

8. От чего зависит проводимость ионов через клеточную мембрану?

9. Какой опыт доказывает основную роль ионов калия в обеспечении существования потенциала покоя? Опишите его сущность.

10. Назовите виды ионного транспорта через клеточную мембрану. Поясните их сущность.

Глава 2 Потенциал покоя

Мембранный потенциал покоя это результат разделения зарядов относительно клеточной мембраны. При этом положительные заряды концентрируются на наружной поверхности мембраны, а отрицательные заряды - на внутренней поверхности. Мембранно-ионную теорию происхождения мембранного потенциала покоя предложил Юлиус Бернштейн, ученик Дюбуа-Реймона, в начале прошлого века (1902 г). Мембранный потенциал покоя широко колеблется в различных клетках (от -5 до -100 мВ). Наибольшие значения мембранного потенциала покоя зарегистрированы в возбудимых клетках - нервных, мышечных и секреторных, в которых его величина составляет от -60 до -90 мВ.

Формирование мембранного потенциала происходит в результате движения ионов по концентрационному градиенту через каналы, открывающиеся в покое. Возникновение мембранного потенциала является пассивным процессом, который не требует затрат энергии. Однако, энергия нужна на этапе создания градиента концентрации для ионов при работе транспортных систем. В различных живых клетках мембранного потенциала покоя формируется по-разному. В глиальных клетках в его формировании принимают участие только ионы К, которые двигаются через К-каналы утечки.

В большинстве нервных клеток мембранный потенциал возникает при движении ионов К и Na. Очень редко в формировании мембранного потенциала покоя принимают участие и ионы Cl. В глиальных клетках в состоянии покоя открыты только **К-каналы утечки**. В этом случае, ионы К двигаются благодаря химической движущей силе из цитоплазмы в окружающую среду и концентрируются около наружной поверхности мембраны, формируя положительный заряд. Внутри отрицательный заряд формируется вследствие потери клеткой ионов К, за счет внутриклеточных органических анионов, непроникающих через мембрану, и за счет приближения ионов Cl к внутренней поверхности мембраны.

Как только сформировался заряд на мембране, появляется электрическая движущая сила, заставляющая ионы К входить внутрь клетки. В конце концов, устанавливается равновесие этих сил, и ток ионов К через каналы прекращается. Возникающий мембранный потенциал будет соответствовать калиевому равновесному потенциалу (примерно -80 мВ). К-ток через мембрану можно представить следующим образом: $I_K = g_K(V_m - E_K)$, где V_m – мембранный потенциал, g_K – проводимость мембраны для ионов К (сумма проводимостей всех открытых К-каналов), E_K – равновесный потенциал для иона К. Поскольку в условиях равновесия К-ток равен нулю, то $V_m = E_K$.

В нервных клетках в состоянии покоя мембрана хорошо проницаема для К и в небольшой степени – для Na, поэтому в формирование мембранного потенциала покоя оказывают вклад ионы Na. Поскольку на мембране имеется значительный концентрационный градиент для ионов Na и уже существует разность потенциалов, возникают химическая и электрическая движущие силы направленные внутрь, заставляющие ионы Na входить в клетку, то есть появляется входящий Na-ток через открытые Na-каналы. В результате через мембрану начинают течь два разнонаправленных тока – входящий, деполярирующий, натриевый $I_{Na} = g_{Na}(V_m - E_{Na})$ и выходящий, гиперполярирующий, калиевый $I_K = g_K(V_m - E_K)$, где g_K и g_{Na} – проводимости мембраны для ионов К и Na, E_{Na} и E_K – равновесные потенциалы для иона К и Na. В конечном итоге, возникнет равновесие, когда эти два тока становятся равны и противоположны по направлению $I_K = -I_{Na}$. При этом установится новое значение мембранного потенциала покоя (V_m) на более низком уровне:

$$V = \frac{g_K E_K + g_{Na} E_{Na}}{g_K + g_{Na}} .$$

Отсюда, в нервных клетках, по сравнению с глиальными, мембранный потенциал покоя несколько ниже (примерно, -60 мВ) и

меньше калиевого равновесного потенциала.

Роль ионов Cl⁻ в формировании мембранного потенциала покоя неоднозначна в различных клетках. В большинстве клеток ионы хлора пассивно распределяются по обе стороны мембраны, токи через Cl⁻-каналы в покое отсутствуют, а имеющийся мембранный потенциал равен потенциалу равновесия для хлора. Если же ионы Cl⁻ активно транспортируются из клетки, то появление Cl⁻-тока через потенциал-активируемые Cl⁻-каналы делает мембранный потенциал покоя более негативным:

$$V_m = \frac{g_K \cdot E_K + g_{Na} \cdot E_{Na} + g_{Cl} \cdot E_{Cl}}{g_K + g_{Na} + g_{Cl}} .$$

Кроме этого, в величину мембранного потенциала покоя вносит свой вклад Na/K насос. Насос является электрогенным, так как при каждом цикле работы насоса три иона Na выводятся из клетки и два иона K поступают в клетку. Клетка постоянно теряет положительные заряды и разность потенциалов на мембране увеличивается на 6-12 мВ.

Итак, мембранный потенциал покоя представляет собой разность потенциалов между наружной и внутренней поверхностью мембраны клетки. Он является результатом разделения зарядов относительно клеточной мембраны, которое возникает за счет движения заряженных ионов по концентрационным градиентам через ионные каналы, открывающиеся в покое. Наличие потенциала на мембране возбудимой клетки лежит в основе механизмов возникновения в ней электрических распространяющихся сигналов – ПД.

Лабораторная работа № 4 Зависимость величины потенциала покоя мышцы лягушки от точки приложения электродов к поперечному разрезу и продольной поверхности

Цель: определить величину потенциала покоя мышцы и продемонстрировать, что когда используется прибор, работающий по току, изменение сопротивления между отводимыми точками самого объекта существенно меняют показания прибора.

Для работа необходимо: изолированная икроножная мышца лягушки, гальванометр, препаровальный набор, фильтровальная бумага.

Ход эксперимента: На свежем препарате икроножная мышца лягушки производят поперечный разрез мышечных волокон и измеряют потенциал покоя мышцы при расположении первого электрода в центре поперечного разреза, второго - на поверхности у

края разреза. Далее электрод поверхности отодвигают от разреза на 2 мм и вновь измеряют потенциал покоя, еще раз отодвигают на 2 мм и вновь замеряют потенциал покоя и так до тех пор, пока два последних замера не дадут одинаковый результат (15-20 мм).

Установив электрод поверхности в точке наибольшего потенциала, а электрод разреза — в центре последнего вновь определяют потенциал покоя. Затем электрод разреза перемещают к краю шагом по 2 мм. Все измерения производятся как можно быстрее, одно за другим.

Оформление результатов Полученные результаты фиксируются в протоколе. По ним следует построить два графика: график зависимости потенциала покоя от перемещения электрода поверхности, и график изменения потенциал покоя при перемещении электрода разреза.

Лабораторная работа № 5 Потенциал покоя мышцы лягушки, изменение во времени, явление освеживания разреза

Цель: определить величину потенциала покоя скелетной мышцы лягушки и наблюдать постепенное падение его в результате отмирания поврежденных мышечных волокон. Неполное восстановление исходного потенциала покоя при освежении разреза свидетельствует об ухудшении функционального состояния и неповрежденных ранее волокон изолированной мышцы.

Для работа необходимо: изолированная икроножная мышца лягушки, гальванометр, препаровальный набор, фильтровальная бумага.

Ход работы

1. Первое измерение потенциал покоя производится тотчас по нанесении поперечного разреза мышце, затем измерения повторяют через каждые 10 минут в течение 30-60 мин. Отметив существенное снижение потенциала покоя, делают новый разрез мышцы на расстоянии 1-2 мм от первого в плоскости ему параллельной. Тотчас вновь замеряют потенциал покоя и далее, через каждые 10 минут до отчетливого снижения величины потенциала.

2 Ход эксперимента фиксируют в протоколе, где отмечают время измерения потенциал покоя (часы, минуты), величину потенциал покоя (с точностью до 0.1 мВ), все произведенные в ходе работы манипуляции — увлажнение препарата, освежение разреза, устранение неполадок и т. д.

Оформление результатов Результаты опыта выражают в виде

графика, где по оси абсцисс откладывается время в минутах, а по оси ординат - величины потенциал покоя в мВ.

Лабораторная работа № 6 Влияние ионов калия на потенциал покоя мышцы

Цель: определить величину потенциал покоя скелетной мышцы лягушки, исследовать влияние ионов калия на потенциал покоя скелетной мышцы.

Для работа необходимо: изолированная икроножная мышца лягушки, гальванометр, препаровальный набор, фильтровальная бумага.

Ход работы

Первое измерение потенциал покоя производится тотчас по нанесении поперечного разреза на мышце, затем измерения повторяют через каждые 5 минут в течении 30 минут. Затем на неповрежденный участок мышцы (под вторым электродом) поместить ватку, смоченную изотоническим раствором хлористого калия. Измерения проводить до тех пор, пока разность потенциалов не упадет до нескольких мВ.

Оформление результатов Ход эксперимента фиксируют в протоколе, где отмечают время измерения потенциал покоя (часы, минуты), величину потенциал покоя (с точностью до 0.1 мВ), все произведенные в ходе работы манипуляции — увлажнение препарата, освежение разреза, устранение неполадок и т.д.

Результаты опыта выражают в виде графика, где по оси абсцисс откладывается время в минутах, а по оси ординат - величины потенциал покоя в мВ, указать время действия хлористого калия.

Лабораторная работа № 7 Потенциал покоя слизистой языка лягушки

Слизистая языка лягушки содержит большое количество одноклеточных желез, одинаково ориентированных по отношению к поверхности. Поэтому имеется довольно значительный потенциал, который отводится или от языка целой кураризированной лягушки или от языка изолированного вместе с нижней челюстью, почти полностью может быть отнесен именно за счет железистых клеток, что и демонстрирует данный опыт.

Цель: Регистрация разности потенциалов с поверхности языка лягушки.

Для работа необходимо: неповрежденный язык лягушки,

фиксированный на стеклянной пластинке, гальванометр, препаровальный набор, фильтровальная бумага, раствор Рингера, дистиллированная вода, концентрированный раствор хлорида натрия 2%, лед.

Ход эксперимента: Прежде всего, убедитесь, что наружная поверхность языка электроотрицательна по отношению к нижней челюсти. Затем измерить величину потенциала, которая может составлять 50-100 мВ. Положив на язык рядом с отводящим электродом кусок льда, убедитесь, что потенциал не только падает, но и может сменить знак. Исследуйте влияние дистиллированной воды и концентрированных растворов солей (NaCl 2%) на исходный потенциал. Все эти измерения обратимы и могут быть продемонстрированы на одном препарате.

Оформление результатов:

Занести полученные результаты в таблицу № 4 и сделать выводы.

Таблица 4

Условия эксперимента	Величина потенциал языка лягушки		
	Измерение №1	Измерение №2	Измерение №3
Без воздействий			
Воздействие холода			
Влияние дистиллированной воды			
Влияние концентрированного раствора NaCl			

Лабораторная работа № 8 Измерение мембранного потенциала диафрагмальной мышцы мыши.

Цель: с помощью микроэлектродного метода измерить мембранный потенциал мышцы.

Для работа необходимо: диафрагмальная мышца мыши, электрофизиологическая установка, раствор Кребса для теплокровных животных, 2М KCl, стеклянные микроэлектроды, ванночка.

Ход работы:

1. Приготовить раствор Кребса для теплокровных, перфузировать

карбогеном 20 мин, затем рН раствора довести до значений 7.3-7.4.

2. Приготовить препарат диафрагмальном мышцы мыши. Расположить препарат в стеклянной ванночке, растянув на 110-115 % от начальной длины.

3. Установить ванночку с препаратом в установке, закрепить заземляющий электрод.

4. Заполнить регистрирующий электрод 2М КСl, установить его в манипуляторе и опустить в омывающий раствор. Включить усилитель и предусилитель. К регистрирующему электроду дополнительно подключить вольтметр.

5. Подвести регистрирующий электрод к поверхности мышцы под микроскопом. В момент прокола мембраны зарегистрировать изменение мембранного потенциала на вольтметре, затем наблюдения повторяют через каждые 5 минут в течение 30 минут.

6. Через 30 минут электрод перемещают в другую часть мышцы, измеряют мембранный потенциал и добавляют в перфузионный раствор 2 мл концентрированного раствора хлористого калия, наблюдают изменения мембранного потенциала.

Оформление результатов: Ход эксперимента фиксируют в протоколе, где отмечают время измерения потенциал покоя (часы, минуты), величину потенциал покоя (с точностью до 0.1 мВ), все произведенные в ходе работы манипуляции. Результаты опыта выражают в виде графика, где по оси абсцисс откладывается время в минутах, а по оси ординат - величины потенциал покоя в мВ, указать время действия хлористого калия.

Контрольные вопросы

1. Назовите непосредственную причину наличия потенциала покоя, следствием чего она является?

2. Что называют мембранным потенциалом (потенциалом покоя)? Какова его величина?

3. Нарисуйте схему (график) мембранного потенциала покоя возбудимой клетки.

4. Где преимущественно находятся (в межклеточной жидкости или в цитоплазме) ионы натрия, калия и хлора? Положительно или отрицательно заряжены внутренняя и наружная среды клетки относительно друг друга?

5. Напишите уравнение Нернста, по которому можно рассчитать величину равновесного потенциала для отдельных ионов.

6. Что такое калиевый равновесный потенциал?
7. Что является источником энергии для работы ионных насосов? За счет каких двух путей этот источник энергии восстанавливается?
8. Опишите структурно-функциональную организацию ионного потенциало-зависимого канала.
9. Как экспериментально доказать существование различных типов ионных каналов?
10. Приведите классификацию ионных каналов.

Глава 3 Потенциал действия

Потенциал действия (ПД) – универсальный, высокоамплитудный, быстро распространяющийся по мембране нервной клетки сигнал, обеспечивающий передачу информации в центральной и периферической нервной системе (от рецептора к телу нейрона, от нейрона к нейрону или от нейрона к мышечной или секреторной клетке). ПД возникают в мышечных клетках (поперечно-полосатые, гладкомышечные клетки и кардиомиоциты), где обеспечивают связь возбуждения и сокращения, а также в некоторых ненейронных клетках. ПД представляет собой быстрое колебание мембранного потенциала клетки в ответ на раздражение, сопровождающееся изменением знака заряда на мембране и возникающее в результате открытия потенциал-активируемых ионных каналов и появления трансмембранных ионных токов. На рис. 2 представлен ПД нервной клетки, зарегистрированный с помощью внутриклеточного электрода.

При малых толчках раздражающего тока, возникают пассивные деполяризационные изменения мембранного потенциала (МП) – электротонические потенциалы, амплитуда которых зависит от силы раздражения. Когда сила раздражения достигает пороговой величины, в клетке возникает быстрое кратковременное и значительное по величине колебание МП, которое и является ПД. Уменьшение МП носит название **фазы деполяризации** ПД, а возвращение МП к исходному состоянию – **фазы реполяризации**. Кратковременная перезарядка мембраны носит название – **овершут**, при этом МП достигает положительных значений (+50 мВ). Иногда в конце ПД наблюдаются **следовые** деполяризационные или гиперполяризационные **потенциалы**. Фаза деполяризации ПД формируется за счет быстро развивающегося входящего Na-тока, который быстро инактивируется. Фаза реполяризации обеспечивается медленно

нарастающим выходящим К-током.



Рисунок 2. Потенциал действия

ПД можно зарегистрировать, внутриклеточное отведение. При этом один внутриклеточный отводящий микроэлектрод регистрирует мембранный потенциал (-70 мВ). Другой внутриклеточный микроэлектрод служит для раздражения постепенно нарастающими по силе толчками тока (показаны внизу). При слабых толчках раздражающего тока (тонкие линии) регистрируются небольшие деполяризационные электротонические потенциалы. Если амплитуда электротонического потенциала достигает определенной величины (порогового потенциала), а величина деполяризации критического уровня деполяризации в клетке возникает быстрое колебание мембранного - ПД. Подробнее в тексте. Двойными стрелками показаны исходные значения порогового потенциала и его изменения во время следовой деполяризации и гиперполяризации.

Естественно, вход ионов Na и выход ионов K во время ПД приводит к изменению концентрации этих ионов в цитоплазме (концентрация ионов K уменьшается, а ионов Na - возрастает). Расчеты показали, что величина этих изменений зависит от размеров клетки и составляет от тысячных до десятых долей процента. В тоже время, повышение внутриклеточной концентрации ионов Na увеличивает активность Na/K насоса так, что внутриклеточные концентрации ионов быстро возвращаются к начальному уровню. Инактивация Na-каналов

во время ПД приводит к развитию **рефрактерности** - невозбудимости клетки. Поэтому во время ПД клетка теряет способность возбуждаться в течение всей фазы деполяризации и части фазы реполяризации - состояние **абсолютной рефрактерности**. Постепенно Na-каналы выходят из состояния инактивации, и возбудимость нервной клетки медленно восстанавливается. Но для того, чтобы возбудить клетку в этот период, необходима более значительная, чем в норме сила раздражения. Этот период времени носит название **относительной рефрактерности**.

Итак, мерой возбудимости можно считать порог раздражения, хотя этот показатель возбудимости ткани относится к характеристике раздражителя, а не возбудимой системы. Но для характеристики возбудимости тканей важно учитывать не только пороговую силу раздражителя, но и время действия раздражителя на ткань. Существует определенная зависимость между временем действия раздражителя и его силой. Эта зависимость для электрического тока в графическом выражении (гипербола) получила название кривой **«сила-длительность»** (рис. 3). По имени ее авторов – кривая Гоорвейга-Вейса-Лапика (1892, 1901, 1909). Минимальная величина силы раздражителя, вызывающая возбуждение, называется **абсолютным порогом силы** (отрезок АВ), или **реобазой** (от греч. rheos - течение, поток и basis - ход, движение; основание). С другой стороны, раздражитель должен действовать не меньше определенного времени. Уменьшение времени действия раздражителя ниже критического значения приводит к тому, что раздражитель любой интенсивности не оказывает эффекта (высокочастотный переменный ток >10 кГц дает только тепловой эффект при коротком времени действия). Минимальная величина времени действия раздражителя, вызывающая возбуждение, называется **абсолютным временем действия раздражителя, порогом времени** (отрезок АС). С учетом действия двух параметров раздражителя для характеристики возбудимости ткани ввели понятие **полезного времени**. **Полезное время** - это минимальное время, в течение которого должен действовать раздражитель пороговой силы с тем, чтобы вызвать возбуждение (отрезок АД).

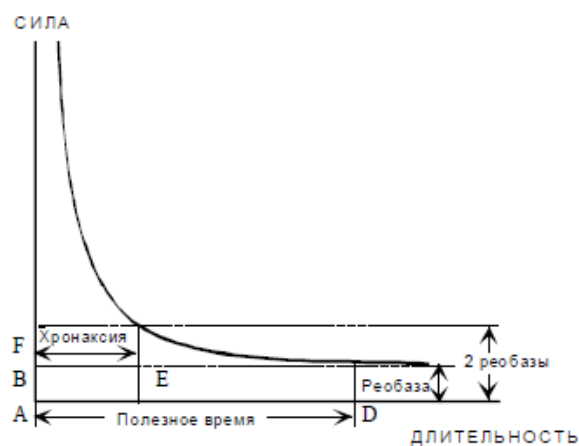


Рисунок 3. Кривая зависимости между временем действия раздражителя и его силой.

Приближение кривой асимптотически к линии, параллельной абсциссе, не позволяет достаточно точно определять полезное время, т.к. незначительные отклонения реобазы, отражающие изменения функционального состояния биологических мембран в покое, сопровождаются значительными колебаниями времени раздражения. В связи с этим Лапик предложил измерять другую условную величину - **хронаксию** (от греч. *chronos* - время и *axia* - цена, мера). **Хронаксия** – время (отрезок АЕ), в течение которого должен действовать раздражитель удвоенной реобазы (отрезок АF), чтобы вызвать возбуждение. Использование этого критерия позволяет точно измерить временные характеристики возбудимых структур, поскольку измерение происходит на крутом изгибе гиперболы. Чем меньше хронаксия, тем больше возбудимость. Например, хронаксия нервных волокон ниже, чем мышечных. **Хронаксиметрия** используется при оценке функционального состояния нервно-мышечной системы у человека (в случае повреждения нерва и его перерождения определяют истинную хронаксию мышцы, которая намного превышает таковую до травмы), в частности челюстно-лицевой области. Показатели хронаксии и реобазы могут значительно меняться при невритах и невралгиях тройничного и лицевого нервов, миозитах мимической и жевательной мускулатуры. Таким образом, количественная оценка физиологических свойств возбудимых биосистем в клинической практике производится опосредованно по характеристикам раздражителя.

Третьим параметром раздражителя является **градиент нарастания силы во времени**. Обычно при физиологических методах исследования применяют прямоугольные импульсы. Однако есть

экспоненциальные импульсы (например, переменный ток), фронт подъема которых обладает определенной крутизной. Клетки по-разному реагируют на эту крутизну (рис.). Чем меньше крутизна, тем выше критический уровень деполяризации (E_k) и меньше амплитуда ПД. В этом и заключается **закон градиента нарастания силы во времени**.

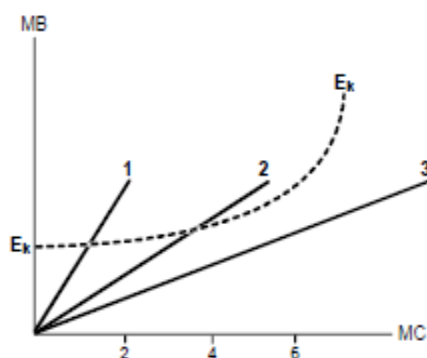


Рисунок 4. Изменение критического уровня деполяризации при медленном нарастании силы раздражителя во времени.

При подпороговом минимальном градиенте ПД — нет ответа, при поровом — минимальная амплитуда ПД, при сверхпороговом градиенте (максимальной крутизне при прямоугольном импульсе) — максимальная амплитуда ПД. Понижение возбудимости ткани и амплитуды ПД вплоть до полного его отсутствия при медленно нарастающем стимуле (малой крутизне) называется **аккомодацией**. В основе аккомодации лежат инактивация натриевой и повышение калиевой проводимости, развивающиеся во время медленно нарастающей деполяризации мембраны. Раздражитель неизменной величины (например, постоянный ток между моментами включения и выключения) вообще не вызывает возбуждения.

Распространение потенциала действия. В нервной системе передача информации на длинные расстояния возможна благодаря тому, что ПД распространяется вдоль аксона нервной клетки равномерно и без потери амплитуды. При этом в соседних (неактивных) от места возникновения ПД участках нервного или мышечного волокна возникают локальные выходящие токи, вызывающие перераспределение зарядов на мембране и деполяризацию в этих участках. Как только деполяризация в неактивных участках достигает порогового уровня, в них открываются

потенциал-активируемые Na-каналы, ПД возникает по соседству от первоначального места возникновения, и волна возбуждения продвигается дальше. Другими словами, проведение ПД связано с его постоянным возникновением в соседних участках мембраны. В естественных условиях ПД распространяется по нервным волокнам только в одном направлении: от рецептора по дендриту к телу чувствительного нейрона и от тела нервной клетки по аксону к другой возбудимой клетке. Это связано с тем, что участки, расположенные сзади от продвигающегося ПД, находятся в состоянии рефрактерности, и локальные токи не способны вызвать в них возбуждение.

Скорость проведения ПД зависит от того, насколько быстро и насколько далеко от активного участка происходит деполяризация мембраны до порогового уровня при протекании локальных токов. Это, в свою очередь, зависит от величины входящего тока, генерируемого в активном участке, и кабельных свойств волокна. Величина входящего тока зависит от плотности Na-каналов в мембране, а кабельные свойства - от удельного сопротивления мембраны и аксоплазмы, а также от диаметра волокна. Чем толще нервное волокно, тем на большее расстояние будет распространяться деполяризация от активного участка, и тем больше скорость распространения ПД. В гигантском аксоне кальмара, диаметр которого около 1 мм, скорость распространения равна 25 м/с, тогда как в некоторых нервных волокнах млекопитающих с диаметром меньше 2 мкм скорость не превышает 1-2 м/с.

Миелиновая оболочка, образуемая глиальными клетками, увеличивает скорость распространения ПД. Мембрана клетки многократно наматывается на аксон и образует сегмент миелина длиной 1-1.5 мм. Между соседними сегментами миелина имеются короткие безмиелиновые участки мембраны аксона, носящие название перехватов Ранвье. Сегменты миелина обладают изолирующими свойствами, а мембрана нервного волокна под ними практически не имеет проводимости и почти полностью лишена Na-каналов. Области перехватов Ранвье, наоборот, имеют очень высокую плотность Na-каналов. Поэтому локальные токи могут течь только от одного перехвата к другому, что позволяет деполяризовать мембрану на более длительные расстояния, вызывая в соседних перехватах Ранвье ПД. В миелинизированных аксонах млекопитающих с диаметром всего 10-20 мкм скорость распространения равна 70-120 м/с. Такой способ проведения ПД называется **сальтаторным проведением** и включает «прыжки» ПД через миелиновые сегменты от перехвата к перехвату,

что резко ускоряет продвижение ПД по нервным волокнам.

Лабильность как одно из общих свойств возбудимых систем

Впервые понятие **лабильности** как функциональной подвижности возбудимых тканей ввел русский физиолог **Н.Е. Введенский**. На современном этапе развития физиологии **лабильность** рассматривается как 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. 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 равна в среднем 1 мс, то есть в 1 секунду при ритмическом раздражении с частотой 1000 Гц нерв может воспроизвести 1000 импульсов. Фаза абсолютной рефрактерности у мышцы – 5 мс, то есть в 1 секунду мышца может воспроизвести 200 возбуждений. Лабильность также является мерой возбудимости.

Протекание процесса возбуждения во времени характеризует в возбудимых тканях и лабильность, и хронаксия. Какой из этих показателей дает более полную характеристику процесса возбуждения? Хронаксия – это время, в течение которого должен действовать ток, силой в 2 реобазы, чтобы вызвать возбуждение. В таком случае, хронаксия характеризует только начальную стадию – возникновение импульса возбуждения, а лабильность – протекание всего импульса. Кроме того, хронаксия связана с одиночным возбуждением, а лабильность – с множеством импульсов возбуждения, взаимодействующих друг с другом. Поэтому лабильность более полно характеризует протекание возбуждения во времени.

Итак, общими свойствами возбудимых биосистем являются:

1. Возбудимость
2. Лабильность
3. Проводимость

При этом мерой возбудимости могут служить:

- а) Порог раздражения (характеристика раздражителя)
- б) Хронаксия (характеристика раздражителя)
- в) Пороговый потенциал (характеристика мембраны)
- г) Лабильность (характеристика мембраны)

Законы проведения возбуждения в нервных волокнах

1. **Закон двустороннего проведения** - возбуждение, возникающее в одном участке нерва, распространяется в обе стороны от места своего возникновения. В организме возбуждение всегда распространяется по аксону от тела клетки (ортодромно).

2. **Закон анатомической и физиологической целостности** - возбуждение может распространяться по нервному волокну только в случае его морфологической и функциональной целостности. Различные факторы, воздействующие на нервное волокно (наркотические вещества, охлаждение, перевязка и т. д.) приводят к нарушению физиологической целостности, т. е. к нарушению механизмов передачи возбуждения.

Несмотря на сохранение его анатомической целостности, проведение возбуждения в таких условиях нарушается. Н. Е. Введенский обнаружил, что если участок нерва подвергнуть альтерации (т. е. воздействию повреждающего агента) посредством, например, отравления или повреждения, то лабильность такого участка резко снижается. Восстановление исходного состояния нервного волокна после каждого потенциала действия в поврежденном участке происходит медленно. При действии на этот участок частых раздражителей он не в состоянии воспроизвести заданный ритм раздражения, и поэтому проведение импульсов блокируется. Такое состояние пониженной лабильности было названо Н. Е. Введенским **парабиозом**. Явление парабиоза лежит в основе медикаментозного локального обезболивания. Влияние анестезирующих веществ также связано с понижением лабильности и нарушением механизма проведения возбуждения по нервным волокнам. Парабиоз - явление обратимое. Если парабиотическое вещество действует недолго, то после прекращения его действия нерв выходит из состояния парабиоза через те же фазы, но в обратной последовательности. Механизм развития парабиотического состояния сводится к следующему. При воздействии на нервное волокно парабиотического фактора нарушается способность мембраны увеличивать натриевую проницаемость в ответ на раздражение. В участке альтерации инактивация натриевых каналов, вызванная повреждающим агентом, суммируется с инактивацией, вызываемой нервным импульсом, и возбудимость снижается настолько, что проведение следующего импульса блокируется.

3. **Закон изолированного проведения** - возбуждение, распространяющееся по волокну, входящему в состав нерва, не передается на соседние нервные волокна. Способность нервного

волокна к изолированному проведению возбуждения обусловлена наличием оболочек, а также тем, что сопротивление жидкости, заполняющей межволоконные пространства, значительно ниже, чем сопротивления мембраны волокна. Поэтому ток, выйдя из возбужденного волокна, шунтируется в жидкости и оказывается слабым для возбуждения соседних волокон. Основная часть тока, возникающего между возбужденным и невозбужденным участками нервного волокна, проходит по межклеточным щелям, не действуя на рядом расположенные нервные волокна. Изолированное проведение возбуждения имеет важное значение. Нерв содержит большое количество нервных волокон (чувствительных, двигательных, вегетативных), которые иннервируют различные по структуре и функциям эффекторы (клетки, ткани, органы). Если бы возбуждение внутри нерва распространялось с одного нервного волокна на другое, то нормальное функционирование органов было бы невозможно.

4. Закон бездекрементного проведения - амплитуда потенциала действия не изменяется с увеличением расстояния от места его возникновения.

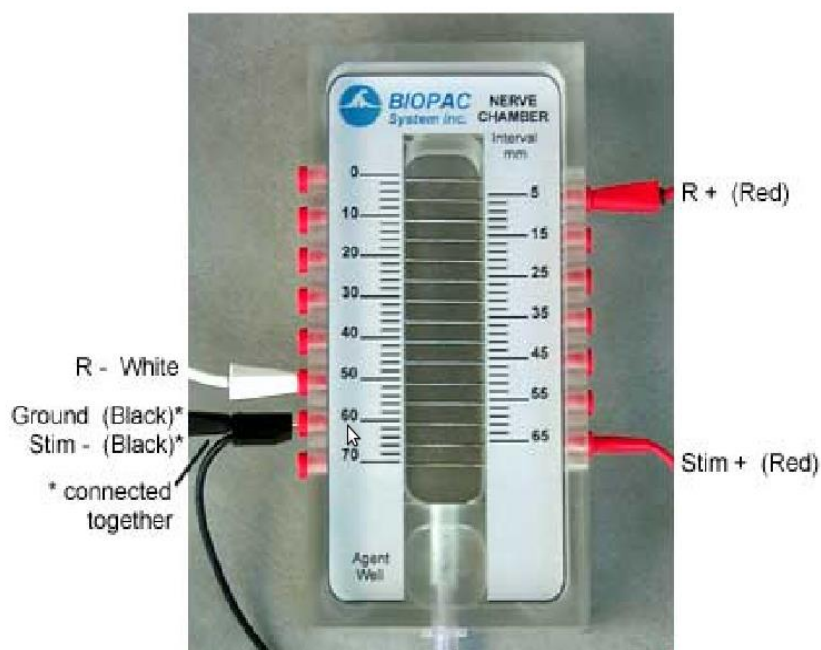
Лабораторная работа № 9 Исследование потенциала действия нервной цепочки дождевого червя

Цель работы: зарегистрировать ПД нервной цепочки дождевого червя, определить скорость проведения по нерву и выявить зависимость зависимости между временем действия раздражителя и его силой.

Для работы необходимо: дождевые черви, раствор Рингера для холоднокровных (6 мг натрий хлорид, 0.12 мг калий хлорид, 0.20 мг кальций хлорид, 0.10 мг натрий бикарбонат на литр дист. воды), лед, препаровальный набор, спиртовой раствор 10%, бинокляр, ванночка для регистрации, преобразователь сигналов BSL MP35, стимулятор BSLSTM, набор проводов и электродов BSLCBL2A или BSLCBL4B.

Ход работы:

1. Приготовить раствор Рингера для червей.
2. Соедините стимулятор, преобразователь сигналов между собой через канал 1 и с компьютером через USB выход. Подключите к системе ванночку через канал 2, расположив электроды так, как показано на рисунке 5.



*Рисунок 5. Расположение электродов BSLCBLAB на ванночке.
 R - регистрирующие электроды: красный (R+), белый (R-).
 Stim – стимулирующие электроды: красный (+) и черный (-).
 Ground — индифферентный электрод (черный, подключается совместно со стимулирующим).*

3. Включите на компьютере программу BSL Pro. Не калибровать.
4. Преступите к препаровке червя. Червя необходимо помыть, положить в чашку Петри со спиртовым раствором для анестезии на 5-10 минут. Прикрепить червя спинной стороной к препаровальной доске иголочками.
 Надрезать червя посередине длиной 6-8 см. С использованием иголочек развернуть червя, вычистить нервную цепочку убрав органы.
 Аккуратно поместить червя в ванночке, как показано на рисунке 6.
5. Создайте в программе новый файл, назвав его «№ группы, день».
 Выставьте «0» на стимуляторе.

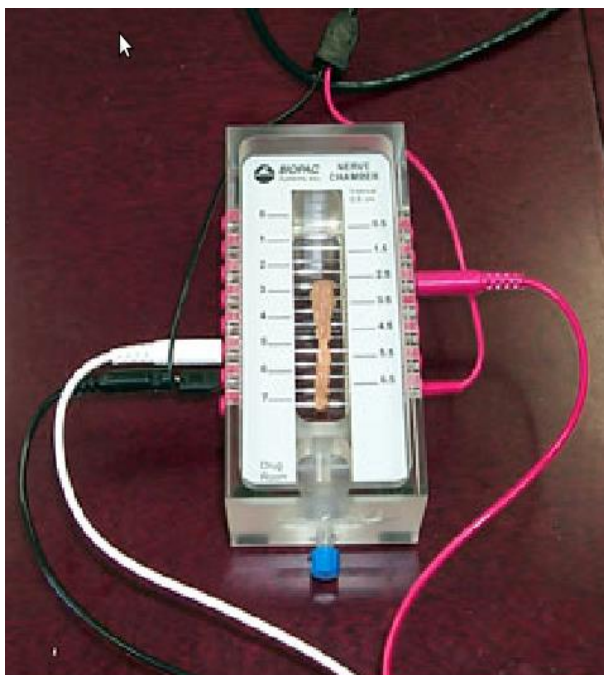


Рисунок 6 . Расположение дождевого червя в ванночке.

В окне MP35 канал 1 должен отражать стимулятор, канал 2 - регистрацию ПД. В окне стимулятора выбрать частоту стимуляции - 1 Гц, начало стимуляции совпадает с началом записи.

6. Для регистрации скорости проведения по нервной цепочке установите стимулирующий и отводящий электроды на расстоянии 1 см. Стимулируйте нервную цепочку, постепенно повышая амплитуду стимуляции. Запишите пороговое значение.

Запишите ПД нервной цепочки червя в ответ на сверхпороговые стимулы с расстояниями между электродами 1 см.

Запишите ПД с расстояниями между электродами 2 и 3 см.

7. Прделайте те же действия что в пункте 6, расположив на нервной цепочке червя кусок льда.

8. Для анализа полученной записи необходимо выделить участок от начала стимула до начала ПД как показано на примере. Выберите параметр «delta T» и запишите время в мсек. Рассчитайте скорость проведения ПД по нервной цепочке.

9. Для определения зависимости длительности стимула от его силы установите на стимуляторе силу «0 В», длительность импульса 0.1 мсек, частоту стимуляции 1 Гц.

Увеличивайте амплитуду стимуляции до пороговых значений и стабилизации амплитуды ПД.

Затем измените длительность импульса до 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 и 2

мсек и повторите действия.

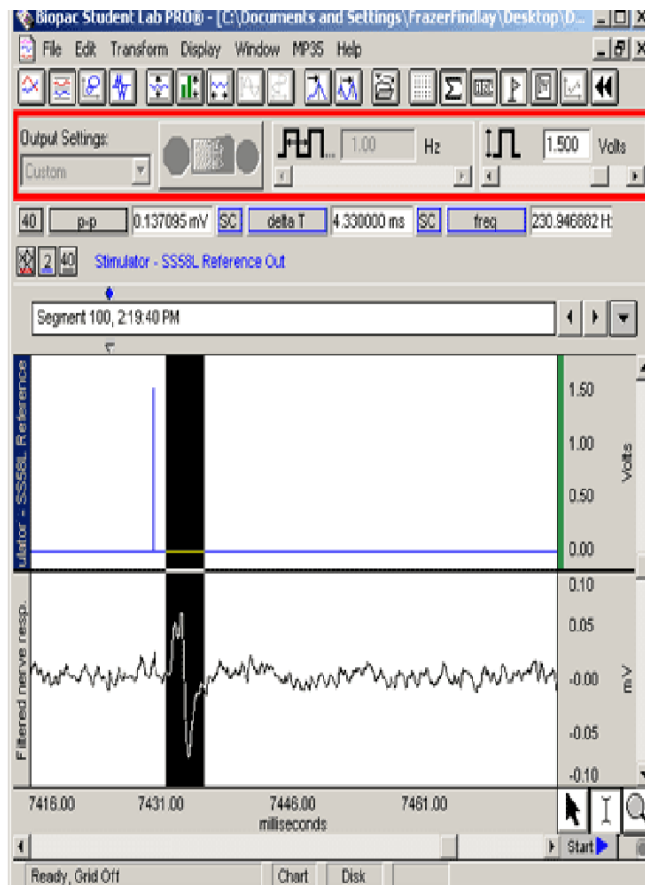


Рисунок 7. Пример обработки параметров потенциалов действия.

Для анализа выделите минимальные ПД как показано на примере для каждой длительности и выберите параметр «Мах» - максимальная амплитуда, запишите амплитуду ПД в мВ. То же проделайте для определения максимальных величин ПД.

Постройте график зависимости амплитуды от длительности стимула. Сделайте выводы.

Лабораторная работа № 10. Регистрация потенциала действия от брюшного нервного ганглия мадагаскарского таракана.

Для того чтоб вызвать ПД в брюшном ганглии таракана необходимо стимулировать «анальные церки», которые содержат механорецепторы. Даже маленькие отклонения церок при касании или движением воздуха ведут к генерации ПД в брюшном ганглии.

Цели работы:

1. Записать ответы брюшного ганглия при стимуляции церок воздухом и прикосновением.
2. Сравнить ответы от церок с правой и левой стороны.

Для работы необходимо: декапитированный мадагаскарский таракан, раствор Рингера для насекомых (на литр дистиллированной воды), препаровальный набор, микроманипулятор, пипетка Пастера, преобразователь сигналов BSL MP35, стимулятор BSLSTM, набор проводов и электродов BSLCBL8, EL452.

Ход работы:

1. Приготовьте раствор Рингера для насекомых (NaCl 0,650 % KCl 0,025 % CaCl₂ 0,025 % NaHCO₃ 0,025 %).
2. Соедините компьютер и преобразователь сигналов BSL MP35 между собой через USB. Подключить к системе металлические электроды через канал 1.
3. Включите на компьютере программу BSL Pro. Не калибровать.
4. Преступите к препаровке таракана.

Таракана положите в чашку Петри или стакан с эфиром для анестезии на 5-10 минут. Прикрепите спинной стороной к препаровальной доске иголочками. Вскройте таракана, вычистите брюшной узел (рисунок 8). Установите электроды.



Рисунок 8. Расположение электродов на брюшном узле мадагаскарского таракана.

5. Создайте в программе новый файл, назвав его «№ группы, день».
- В окне MP35 канал 1 должен отражать регистрацию ПД мадагаскарского таракана. Выставить скорость протяжки 2 сек.
6. Перед началом стимуляции проведите запись спонтанной активности брюшного узла таракана. Определите среднее значение

базовой активности.

7. Затем проведите стимуляцию левой церки воздухом, затем через 10-15 секунд, не прекращая записи стимулируйте правую церку.

Для анализа выделите участки длительностью 1 сек и рассчитайте максимальные величины ПД (выберите параметр «Мах» - максимальная амплитуда, в мВ). Сравните результаты.

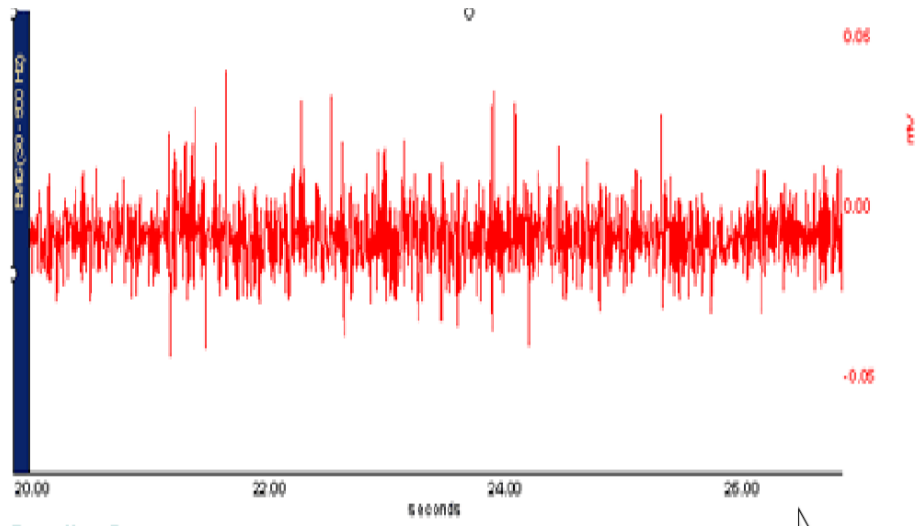


Рисунок 9. Пример записи активности брюшного узла мадагаскарского таракана при стимуляции церок.

7. Проведите стимуляцию церок прикосновением.

Проведите анализ записей (как в пункте б), сравните результаты.

Сделайте выводы.

Лабораторная работа № 11 Потенциал действия седалищного нерва лягушки.

Цель работы: регистрация потенциала действия седалищного нерва лягушки, выявление роли выходящего калиевого тока в генерации ПД, определение следовых изменений возбудимости и регистрация следового отрицательного потенциала.

Для работы необходимо: лягушка, препаровальный набор, раствор Рингера для холоднокровных животных, ванночка для регистрации преобразователь сигналов BSL MP35, стимулятор BSLSTM, набор проводов и электродов BSLCBL2A, BSLCBL4B.

Ход работы:

1. Препарировать седалищный нерв лягушки длиной не менее 4 см. Поместить в ванночку, заполненную раствором Рингера.

2. Соедините стимулятор, преобразователь сигналов между собой через канал 1 и с компьютером через USB выход. Подключите к системе ванночку через канал 2, расположив электроды так, как показано на рисунке 5.

3. Включить на компьютере программу BSL Pro. Не калибровать.

4. Создать в программе новый файл «№ группы, день».

Выставить «0» на стимуляторе.

В окне MP35 канал 1 должен отражать стимулятор, канал 2 - регистрация ПД. В программе стимулятора выбрать частоту стимуляции - 1 Гц, начало стимуляции совпадает с началом записи.

5. Определите пороговую и максимальную силы стимула. Для этого постепенно увеличивайте силу стимула на стимуляторе и регистрируйте изменения ПД. Запишите пороговую и максимальную силы стимула. Зарисуйте двухфазный ПД.

6. Для получения монофазного ПД участок нерва под дистальным отводящим электродом необходимо повредить пинцетом. Зарегистрируйте монофазный ПД и определите его параметры: амплитуду, время нарастания, время спада, среднюю скорость нарастания.

Для этого выделите соответствующие участки ПД и выберите параметры для анализа «Мах» - максимальная амплитуда, мВ, «delta T» - время, мсек.

7. Для изучения длительности рефрактерных периодов используют двоянные раздражающие стимулы, временной интервал которых можно изменять. Первый стимул называется эталоном, он вызывает нормальный ПД. Второй стимул называется тестирующим, поскольку он помогает определить возбудимость нерва через различные интервалы времени после первого ПД.

Для этого в окне стимулятора необходимо выставите число стимулов — 2, интервал между стимулами — 1 сек. Далее уменьшая интервал между стимулами необходимо определить длительность относительной и абсолютной фазы рефрактерности. Результат запишите.

8. Следовой отрицательный потенциал, сопровождающий ПД нерва лягушки, наблюдается в условиях монофазного отведения при значительном усилении и небольшой скорости развертки. Следовая деполяризация становится более выраженной после длительного выдерживания нерва в растворе Рингера, предварительной тетанизации или после действия некоторых веществ, например вератрина, ионов никеля и кобальта.

Подберите необходимые параметры усиления, проведите стимуляцию нерва в течение 5 сек с частотой 100 Гц, затем поменяйте частоту на 1 Гц и зарегистрируйте следовой отрицательный потенциал нерва. Определите его параметры: амплитуду и длительность. Для этого выделите ПД и выберите параметры для анализа «Мах» - максимальная амплитуда, мВ, «delta T» - время, мсек.

9. Для выявления роли калиевых каналов апплицируйте на нерв раствор тетраэтиламмония (блокатора потенциал-зависимых и кальций-активируемых калиевых каналов) в концентрации 1 мМ. Наблюдайте за изменениями формы ПД, объясните полученные результаты.

Лабораторная работа № 12 Проведение потенциала действия по нервным волокнам

Цель: определение скорости распространения нервного импульса по волокнам разных групп и изучение закономерностей проведения.

Для работы необходимо: лягушка, препаровальный набор, раствор Рингера для холоднокровных животных, ванночка для регистрации преобразователь сигналов BSL MP35, стимулятор BSLSTM, набор проводов и электродов BSLCBL2A, BSLCBL4B.

Ход работы:

1. Для выполнения работы используют препарат седалищного-малоберцового нерва крупной лягушки, выделенный от позвоночника до стопы. Поместите нерв в ванночку, заполненную раствором Рингера.

2. Соедините стимулятор, преобразователь сигналов между собой через канал 1 и с компьютером через USB выход. Подключите к системе ванночку через канал 2, расположив электроды так, как показано на рисунке 5. Электроды должны находиться как можно дальше друг от друга.

3. Включить на компьютере программу BSL Pro. Не калибровать.

4. Создать в программе новый файл «№ группы, день».

В окне MP35 канал 1 должен отражать стимулятор, канал 2 - регистрацию ПД. В окне стимулятора выберите частоту стимуляции - 1 Гц, начало стимуляции совпадает с началом записи.

5. При сверхмаксимальной силе раздражения зарегистрируйте картину дисперсии ПД (т.е. разложение его на отдельные пики, соответствующие возбуждению альфа-, бета-, и гамма- волокон группы А). Зная расстояние между раздражающим и отводящим электродами и время латентного периода, рассчитайте скорость проведения (м/с)

импульса в разных группах нервных волокон.

8. Условием нормального распространения возбуждения по нервным волокнам является их анатомическая и функциональная целостность. Блокирование проведения ПД вызывают многие вещества, например избыток ионов калия и местные анестетики.

После регистрации ПД с частотой 1 Гц, силой равной 50 % от максимальной в течение 20 секунд, введите в углубление камеры между раздражающим и отводящим электродами ватный тампон смоченный физиологическим раствором с повышенной концентрацией (в 20 раз) ионов калия или изотоническим раствором KCl. Наблюдайте за изменением проведения импульса по волокнам разных групп, регистрируя амплитуды пиков ПД. После полного блокирования проведения замените раствор на нормальный и наблюдайте восстановление ПД.

9. Прделайте такой же опыт, используя в качестве блокатора 1% лидокаина или новокаина.

Результаты опытов представьте в виде графиков зависимости амплитуды ПД от времени действия вещества.

Сделать выводы.

Лабораторная работа № 13 Особенности ритмического возбуждения нервных волокон

Цель: определение лабильности волокон седалищного нерва, устойчивость к длительному ритмическому раздражению, регистрация пост-тетанической гиперполяризации.

Для работы необходимо: лягушка, препаровальный набор, раствор Рингера для холоднокровных, ванночка для регистрации, преобразователь сигналов BSL MP35, стимулятор BSLSTM, набор проводов и электродов BSLCBL2A, BSLCBL4B.

Ход работы:

1. Препарировать седалищный нерв лягушки длиной не менее 4 см. Поместить в ванночку заполненную раствором Рингера.

2. Соедините стимулятор, преобразователь сигналов между собой через канал 1 и с компьютером через USB выход. Подключите к системе ванночку через канал 2, расположив электроды так, как показано на рисунке 5.

3. Включить на компьютере программу BSL Pro. Не калибровать.

4. Создать в программе новый файл «№ группы, день».

Выставить «0» на стимуляторе.

В окне МР35 канал 1 должен отражать стимулятор, канал 2 - регистрацию ПД. В окне стимулятора выбрать частоту стимуляции - 10 Гц, начало стимуляции совпадает с началом записи.

Стимуляцию производим сверхмаксимальной силой стимула. Зарегистрируйте ПД. Постепенно увеличивая частоту раздражения и наблюдая ряд ПД, определите оптимальный ритм (выше которого наблюдается снижение амплитуды ПД) и максимальный ритм (начало «трансформации ритма»). Сопоставьте значения оптимального и максимального ритма с длительностью рефрактерных периодов.

Зарегистрируйте изменение амплитуды ПД в процессе длительного 10 мин ритмического раздражения с частотой соответствующей оптимальному ритму и превышающей его в 2 раза. Покажите изменение амплитуды ПД во времени графически.

Пост-тетаническая гиперполяризация наблюдается после окончания периода ритмического раздражения и отражает активность Na-K насоса.

Выставьте параметры усиления как при регистрации следовой гиперполяризации (см. работу 11). Проведите стимуляцию нерва в течение 5 сек с частотой 100 Гц, затем поменяйте частоту на 1 Гц и зарегистрируйте следовой отрицательный потенциал нерва.

Для исследования зависимости амплитуды и длительности пост-тетанической гиперполяризации от частоты раздражения увеличивайте частоту предварительной стимуляции с 100 Гц до 200 Гц с шагом 20 Гц (длительность раздражения выставить 1 сек). Затем регистрируйте ПД при частоте 1 Гц, проанализируйте параметры следового отрицательного потенциала.

Для исследования зависимости амплитуды и длительности пост-тетанической гиперполяризации от длительности раздражения, установите частоту стимуляции 100 Гц, а длительность раздражения изменяйте от 1 до 10 сек. Затем регистрируйте ПД при частоте 1 Гц проанализируйте параметры следового отрицательного потенциала.

Результаты представьте в виде графиков зависимость параметров пост-тетанической гиперполяризации от длительности и частоты стимуляции. Сделать выводы.

Лабораторная работа № 14 Оценка порогов раздражения в различных двигательных точках у различных испытуемых

Цель: оценка порогов раздражения у различных испытуемых.

Для работы необходимо: стимулятор ЭС-50-1, физиологический раствор, спирт, вата.

Ход работы: Индифферентный электрод, представляющий собой металлическую пластинку, с помощью жгута закрепите на плече испытуемого, предварительно протерев кожу спиртом и подложив под электрод, смоченный в физиологическом растворе, бинт. Активный электрод покройте небольшим кусочком ваты и увлажните физиологическим раствором. Включите прибор ЭСЛ и подключите электроды к клеммам так, чтобы активный электрод был соединен с катодом. В процессе исследования активный электрод используется для нанесения изолированных раздражений на поверхность тела в так называемых двигательных точках (рисунок 10), соответствующих наиболее поверхностному прохождению двигательных нервных стволов или местам вхождения в мышцу веточек иннервирующего ее двигательного нерва.

Порядок проведения работы следующий:

- 1) включив аппарат, установите частоту раздражения в 3 Гц, задержку — 0,5 мс.
- 2) Длительность импульсов установите равной 100 мс,
- 3) силу раздражителя предварительно установите на 25 В.

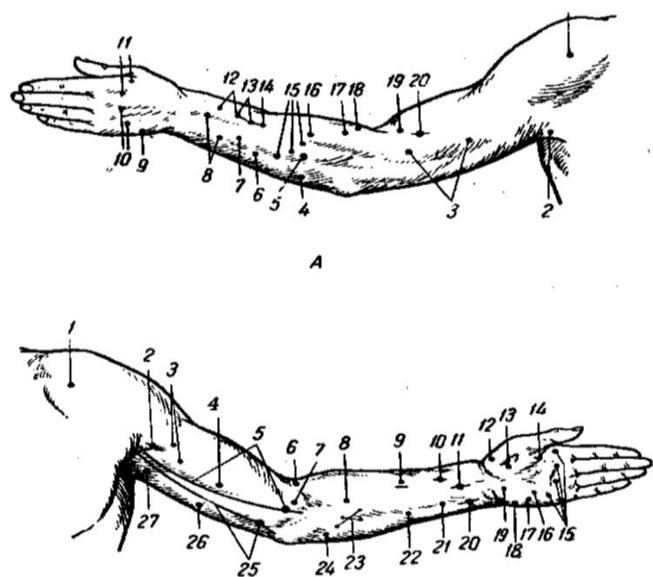


Рисунок 10. Карта Эрба

После подготовки прибора и испытуемого поисковый электрод поместите согласно карте Эрба на точке №14 (рисунок 10). Если испытуемый ощущает пощипывание кожи или сокращение мышц, это означает, что точка найдена. В этом случае электрод уберите и отметьте место положения точки.

На следующем этапе определяется порог раздражения. Для этого

напряжение нужно снизить до нуля, установить поисковый электрод на точку, а потом ручкой установки амплитуды стимуляции медленно наращивать напряжение до тех пор, пока испытуемый не ощутит пощипывание или сокращение мышц.

В этот момент наращивание нужно прекратить, снять поисковый электрод, записать показания с табло. Данное значение напряжения является **реобазой**.

Таблица 5

Ф.И.О.	Точка № 14	Точка № 10	Точка № 7	Точка №
Иванов И.И.	1	1	1	1
	2	2	2	2
	3	3	3	3
	средние			
Петров П.П.	1			
	2			
	...			
Средние значения $\pm m$				

Внимание! Поисковый электрод нельзя долго держать в одной и той же точке, иначе произойдет «аккомодация», привыкание, и порог будет расти.

Потом снова установить напряжение на нуль и повторить процедуру. Данные могут немного различаться. Берется среднее значение из трех измерений в одной точке.

Далее соответствующим образом определите пороги раздражения в точках № 7, 11, 24.

Зарисуйте схему двигательных точек по Эрбу (рисунок 10). Занесите значения в таблицу, подсчитайте средние значения порогов раздражения в различных точках для группы испытуемых.

Сделайте выводы о значениях реобазы в одной двигательной точке у разных испытуемых и в разных двигательных точках у одного испытуемого.

Лабораторная работа № 15 Исследование зависимости между силой раздражителя и его длительностью

Цель: Определить зависимость силы раздражения от его длительности.

Для работы необходимо: стимулятор ЭС-50-1, физиологический раствор, спирт, вата.

Ход работы: Хронаксия - это время действия одиночного электрического импульса, дающее пороговую реакцию при силе тока, вдвое большей, чем порог гальванической возбудимости, представляющей собой реобазу.

Включив аппарат, установите частоту раздражений в 3 Гц, задержку - 0.5 мс, длительность импульсов - 100 мс, силу раздражения — 25 В. При таких параметрах обнаруживают двигательную точку № 9.

Найдите реобазу, пороговую силу раздражения для данной точки, как описано в предыдущей работе.

Далее определите порог времени при действии пороговой силы. Для этого установите пороговое напряжение и ручкой длительности уменьшите время действия стимула до нуля. Установите поисковый электрод, начинайте увеличивать длительность до появления у испытуемого ответной реакции. Минимальная длительность порогового раздражителя называется «полезным временем». Снимите электрод, зарегистрируйте показания.

Далее увеличивайте силу раздражителя на 2 В, длительность установите на ноль. Электрод поместите на точку, и снова найдите минимальную длительность. Таким образом, проведите 5-6 измерений с увеличением силы раздражения на 2-3 В. С увеличением силы раздражения время его действия уменьшается.

По полученным значениям постройте график зависимости силы от длительности раздражителя для каждого испытуемого. Отметьте на нем полезное время, реобазу и хронаксию. Сформулируйте подтвержденный закон Гооверга-Вейса.

Контрольные вопросы

1. Что называют потенциалом действия?
2. Нарисуйте схему (график) потенциала действия скелетного мышечного волокна, обозначьте его фазы, назовите их.
3. Какое свойство клеточной мембраны обеспечивает возникновение потенциала действия, за счет какого явления оно реализуется?
4. Укажите примерные значения длительности и амплитуды потенциала действия нервного волокна и волокна скелетной мышцы.

5. Назовите фазы потенциала действия, дайте соответствующие пояснения.

6. Что такое следовые потенциалы? Какие виды следовых потенциалов Вам известны?

7. Что такое критический уровень деполяризации клеточной мембраны?

8. В какие фазы потенциала действия и какое влияние оказывает концентрационный градиент на вход натрия внутрь клетки?

9. Движение, какого иона и в каком направлении через мембрану клетки обеспечивает нисходящую часть потенциала действия? Затрачивается ли при этом энергия?

10. Какая сила обеспечивает выход ионов калия из клетки, какая - препятствует этому в фазу реполяризации потенциала действия?

Список использованной литературы

1. Под ред. Алатырева В.И. Лабораторные работы по курсу Физиология возбудимых систем / Казань ЛОП КГУ, 1989, 30 с.
2. Плещинский Н.И. Практикум по общей электрофизиологии Методическое пособие / Казань ОЛ КГУ 1973, 86 с.
3. Шошина И.И. Физиология. Лабораторный практикум. / Шошина И.И., Гершкорон Ф.А., Савченко А.А. Красноярск: ИПК СФУ, 2008, 133 с.
4. Фундаментальная и клиническая физиология //под ред А.Камкина и А.Каменского, Изд Академия, 2004
5. А.Л Зефирова, Г.Ф. Ситдикова Ионные каналы возбудимой клетки (структура, функция, патология)/ монография, Казань: Арт-кафе, 2010, 270 с
6. Николс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. Москва:Изд-во научной и учебной лит-ры, 2003, 672 с
7. Структура и функции ионных каналов возбудимой клетки: Учебное пособие / Г.Ф. Ситдикова, Р.Н. Хазипов, А. Нерманн. – Казань: Казанский университет, 2011. – с.96
8. Большой практикум по физиологии человека и животных: в 2 т. Т.1: Физиология нервной мышечной и сенсорных систем. В 2-х тт Учебное пособие для ВУЗов Ноздрачев А.Д., ред, академия , 2007, 599 с.
9. Под ред Камкина А.Г Большой практикум по физиологии в 2-х т. Академия 2008