

Versuch 2 — Membranpotentiale

Till Biskup

Matrikelnummer: 155567

27. April 2000

Fragen

1. Wie ist eine physiologische Lösung zusammengesetzt, die das extrazelluläre Milieu (Blutplasma) ersetzen soll? Welcher Unterschied besteht zur intrazellulären Lösung (Osmolarität, qualitative Ionenverteilung, pH).
2. Welche Prozesse sind am Zustandekommen des Transmembranpotentials der Erythrocyten beteiligt und wie hoch ist es normalerweise? Welche Rolle spielt das Hämoglobin dabei?
3. Welche Puffersysteme sind an der pH-Regulation im Erythrocyten beteiligt?
4. Wie bestimmt man die Zeitkonstante der Elektrode und wofür braucht man sie?
5. Was versteht man unter einer elektrochemischen Meßkette? Was sind Bezugs Elektroden?
6. Wie kann man mit der Glaselektrode pH-Werte messen?
7. Welche Voraussetzungen müssen in diesem Versuch erfüllt sein, damit das Membranpotential mithilfe der NERNST-Gleichung bestimmt werden kann?
8. Welche anderen Möglichkeiten, Membranpotentiale zu messen, gibt es?
9. Wie ist das K^+ -Diffusionspotential gepolt, wenn der $[K^+]_i = 133 \text{ mM}$, $[K^+]_a = 5 \text{ mM}$ betragen? Wie hoch könnte es sein, wenn es nicht zum großen Teil durch die Cl^- -Permeabilität kompensiert würde? Welche Gleichung erlaubt die Berechnung eines Diffusionspotentials? Was würde passieren, wenn $[K^+]_a = 140 \text{ mM}$ beträgt?
10. Wie entsteht ein DONNAN-Potential? Wo kann es auftreten?

Antworten

1. Zusammensetzung einer physiologischen Lösung

Die physiologische Lösung, welche das Blutplasma ersetzen soll, ist eine 0,9% NaCl-Lösung in Wasser. Sie besitzt jedoch im Vergleich zur intrazellulären Lösung keine Anteile an K^+ -Ionen (In der intrazellulären Lösung liegen K^+ -Ionen vor allem innen, Na^+ -Ionen dagegen eher außen vor). NaCl ist ein 1–1-wertiges Salz, welches einmal dissoziiert die doppelt so hohe Osmolarität erreicht, als seine Molarität.

Man errechne nun die Höhe der Osmolarität: 0,9% bedeuten 9g NaCl in 1kg Wasser. Daraus lässt sich die Molmenge an NaCl berechnen. Sie lautet: 0,154 mol. Da die Rechnung bereits auf einen Liter Wasser bezogen wurde liegt das Endergebnis bereits vor: Die Osmolarität beträgt 0,154 M.

2. Transmembranpotential der Erythrocyten

Im Unterschied zu den meisten lebenden Zellen ist das Transmembranpotential menschlicher Erythrocyten (ca -9 mV) unter in vivo-Bedingungen ein DONNAN-Potential, wobei als feste Ladungsträger neben Hämoglobin auch die Kationen K^+ und in geringerem Maße Na^+ gehören. Die Kationen können in gewisser Weise als feste Ladungsträger aufgefaßt werden, da sie vor allem aktiv (d. h. durch Pumpen) transportiert werden und somit eine geringe Permeabilität besitzen.

3. Puffersysteme der pH-Regulation in Erythrocyten

- Bikarbonat-Puffer (CO_2 dissoziiert in Wasser zu H^+ und HCO_3^-)
- Protein-Puffer (hauptsächlich Imidazolgruppen des Histidins)
- Haldane-Effekt (desoxygeniertes Blut nimmt H^+ -Ionen auf)
- Carbamino-Hb (direkte Bindung von CO_2 an Hämoglobin)
- $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$

as im Erythrocyten gebildete Bicarbonat stört das Donnan-Gleichgewicht und wird bis zur Gleichgewichtsherstellung mit Cl^- -Ionen aus Plasma ausgetauscht.

4. Zeitkonstante der Elektrode

Von der gepufferten Versuchslösung wird die pH-Kurve aufgezeichnet, bis sich ein Plateau ergibt. Dann werden 50 ml einer 1M HCl-Lösung und der pH-Abfall registriert. Es ergibt sich eine exponentielle Kurve, die nach einer Linearisierung ausgewertet werden kann, indem man die aus der Meßkurve entnommenen Werte auf halblogarithmisches Papier überträgt und an diesen Werten eine Gerade anlegt. Aus der Steigung der Geraden ergibt sich die Zeitkonstante k der pH-Elektrode. Sie ermöglicht eine Aussage darüber, ob die verwendete Elektrode für die Potentialmessung geeignet ist.

5. Elektrochemische Meßkette und Bezugselektroden

Eine elektrochemische Meßkette ist die elektrisch leitende Verbindung zweier Elektroden zur Messung von Potentialdifferenzen. Eine der beiden Elektroden wird als Bezugselektrode verwendet, in der Regel die Standard-Wasserstoffelektrode, deren Potential willkürlich gleich Null gesetzt wird. Die so gemessene Potentialdifferenz entspricht damit direkt dem Elektrodenpotential der Meßelektrode. Kommt als Bezugselektrode eine andere Elektrode zum Einsatz, so ist deren Potential bezogen auf die Standard-Wasserstoffelektrode bekannt und kann daher in den Berechnungen des Potentials der Meßelektrode berücksichtigt werden.

6. pH-Wert-Messung mit der Glaselektrode

Eine Meßkette zur Erfassung des pH-Wertes besteht immer aus zwei Komponenten: der Sorelektrode (Meßelektrode) und der Bezugselektrode. Zwischen diesen beiden wird eine Spannung gemessen, die für den jeweiligen pH-Wert typisch ist. Beide Elektroden sind heute zu einer Einstab-Glaselektrode zusammengefaßt, die man als pH-Sensor bezeichnet.

Wird ein pH-Sensor in eine wäßrige Lösung eingetaucht, bildet sich am pH-sensitiven Membranglas eine Quellschicht. Dies geschieht auch an der Glasmembraninnenseite, die mit einer definierten Pufferlösung (Innenpuffer) in Kontakt steht. Je nach pH-Wert der Meßlösung diffundieren die H^+ -Ionen aus der Quellschicht heraus oder in sie hinein. Bei alkalischen Lösungen diffundieren die H^+ -Ionen nach außen, wobei sich ein negatives Potential an der Quellschichtaußenseite aufbaut. Da die Glasmembran an der Innenseite einen konstanten pH-Wert hat, ändert sich das Potential innen während der Messung nicht. Die für den pH-Wert der Lösung typische Spannung ergibt sich aus der Potentialdifferenz ΔE zwischen innen und außen nach der NERNSTschen Gleichung:

$$\Delta E = \frac{R \cdot T}{n \cdot F} \cdot \ln \frac{[H^+]_i}{[H^+]_a}$$

Für $n = 1$ und mit den eingesetzten Größen für R , T und F sowie unter Berücksichtigung von \ln in \lg vereinfacht sich die NERNSTsche Gleichung wie folgt:

$$\Delta E = 0,059 \cdot (\lg[H^+]_i - \lg[H^+]_a) = 0,059 \cdot (pH_a - pH_i)$$

Der unbekannte pH_a -Wert kann durch eine einfache Potentialmessung bestimmt werden. Die Potentialdifferenz ΔE wird mittels eines empfindlichen Spannungsmeßgerätes (pH-Meter) direkt als pH-Wert dargestellt.

7. Voraussetzungen für die Bestimmung des Membranpotentials mittels NERNST-Gleichung

Die Außenlösung muß ungepuffert sein und die Blutzellen müssen hämolysiert werden. Dadurch findet ein Angleich der pH-Werte von Außenlösung und Erythrozyten-Plasma statt, da letzteres sehr stark gepuffert ist.

8. Weitere Möglichkeiten der Messung von Membranpotentialen

Als weitere Möglichkeiten der Messung von Membranpotentialen bieten sich an:

- Mikroelektroden (Spitzendurchmesser 0.1 – 0.5 mm).

- optische Methode
Bestimmung des Membranpotentials aus der Verteilung von membranpermeablen Ionen zwischen Zelläußerem und -innerem
- Riesen–Neuronen
Potentialdifferenz–Messung zwischen einer in axialer Richtung im Axonplasma und einer im Außenmedium liegenden Elektrode

9. K^+ –Diffusionspotential

Das Membranpotential (Diffusionspotential) berechnet sich nach der NERNST–Gleichung wie folgt:

$$\Delta\psi = \frac{RT}{zF} \ln \frac{a_a}{a_i}$$

Für die Aktivitäten gelte im ersten Fall folgendes:

$$a_a = 5 \text{ mM}$$

$$a_i = 133 \text{ mM}$$

Durch Einsetzen der verschiedenen Konstanten bei einer Raumtemperatur $T = 298,15\text{K}$ folgt für den ersten Fall:

$$\Delta\psi = -0,0843 \text{ V}$$

Das innere Medium ist also positiver als das äußere und somit positiv gepolt.

Für den zweiten Fall, bei einer im Außenmedium vorherrschenden Aktivität $a_i = 140 \text{ mM}$ der K^+ –Ionen, gilt für die Potentialdifferenz:

$$\Delta\psi = +0,0013 \text{ V}$$

Hier liegen die Polaritäten also genau umgekehrt zum ersten Fall, das äußere Medium ist positiver gegenüber dem Innenmedium und damit positiv gepolt.

10. DONNAN–Potential

Das DONNAN–Potential kann in Zweiphasensystemen auftreten, in denen es neben austauschbaren Ladungsträgern auch solche Ladungsträger gibt, die die Phasengrenze nicht durchdringen können.