

INTRODUCERE ÎN FIZIOLOGIA EXPERIMENTALĂ

Tema 1. Obiectul fiziologiei. Sarcinile practicumului de fiziologie. Metodele de studiere și înregistrare a funcțiilor fiziologice

Prima lucrare de laborator va fi organizată sub formă de convorbire și demonstrare a aparatajului, precum și a unor procedee experimentale folosite în fiziologie.

Planul lecției:

1. Regulile și ordinea de lucru la lucrările de laborator, regulile de securitate.
2. Metodele de cercetări fiziologice.
3. Aparatele de excitație și înregistrare a fenomenelor fiziologice.
4. Pregătirea preparatului neuromuscular.

La sfârșitul lucrării de laborator studenții completează procesul-verbal dintr-un caiet special, pe coperta căruia se indică numele și prenumele studentului, numărul grupei, facultatea. Se va scrie și se va citi, iar la realizarea desenelor și schemelor se vor folosi creioane colorate. Procesul-verbal va fi controlat de lector. În timpul examenului, studentul va prezenta caietul cu procesele verbale examinatorului.

Forma procesului-verbal:

Procesul-verbal nr. ... Data...

Tema...

Sarcinile temei:

- 1.....
 - 2.....
 - 3.....
- Etc.

Tehnica lucrării

Aici studentul expune pe scurt manipulările experimentale și fenomenele observate, notează rezultatele obținute, completându-le cu scheme, desene, tabele și grafice, chimograme și alte materiale ce rezultă din înregistrarea funcțiilor fiziologice.

Concluzii

Notă. Partea introductivă a procesului-verbal, până la Tehnica lucrării, va fi completată înainte de lecție, folosind manualul de față și planul tematic al lucrărilor de laborator al catedrei.

Prepararea preparatului neuromuscular

Consecutivitatea preparării:

1. Imobilizăm broasca prin distrugerea măduvei spinării pe cale sângeroasă sau asângeroasă.

2. Luăm broasca de membrele posterioare, o întoarcem cu abdomenul în jos, secționăm coloana vertebrală cu 1,5 cm mai sus de osul sacral. Printr-o incizie de-a lungul sacrului înlăturăm partea anterioară a trunchiului cu toate visceralele.

3. Ținând coloana vertebrală cu mâna stângă, cu mâna dreaptă scoatem pielea de pe lăbuțele posterioare folosind un șervețel de tifon (*preparatul membrilor posterioare de broască*).

4. Împărțim preparatul în două părți printr-o incizie de-a lungul coloanei vertebrale și a simfizei.

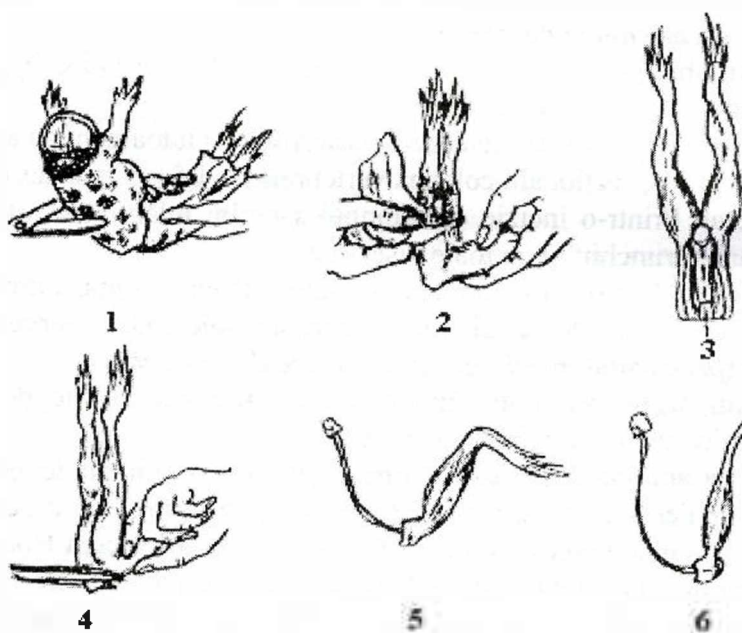
5. Plasăm membrul posterior pe planșetă, găsim locul de ieșire al radiclelor ce formează nervul sciatic. Preparăm acest nerv până la articulația coxo-femurală. Cu acest scop întoarcem lăbuța cu partea dorsală în sus, cu bagheta de sticlă despicăm mușchiul coapsei, găsim nervul sciatic și îl eliberăm atent pe toată lungimea de la ieșirea din coloana vertebrală până la articulația genunchiului. Înlăturăm mușchii și oasele mai sus de articulația genunchiului (*preparatul neuromuscular al unui membru posterior de broască*).

6. Prin incizia tendonului lui Ahile la nivelul osului calcarin îndepărtăm de gambă mușchiul gastrocnemian și înlăturăm gamba mai jos de articulația genunchiului. Preparatul neuromuscular ob-

ținut constă din mușchiul gastrocnemian, articulația genunchiului și nervul sciatic. Pentru pregătirea preparatului muscular este necesar de a înlătura nervul sciatic.

Notă. În timpul pregătirii preparatului neuromuscular trebuie respectate următoarele reguli: osul se va tăia cu foarfecele mari, iar țesuturile moi – cu cele mici; este interzisă atingerea nervului cu obiecte metalice; la prepararea nervului sciatic se va folosi bagheta (cârligul) de sticlă, nervul e de dorit să nu fie întins și nici traumatizat; preparatul va fi permanent umezit cu soluție Ringer.

La sfârșitul lucrării de laborator studentul, sub controlul lectorului, completează primul proces-verbal după schema propusă mai sus.



Etapele pregătirii preparatului neuromuscular

Partea I. Fiziologie generală

Capitolul I

FIZIOLOGIA ȚESUTURILOR EXCITABILE

Tema 1. Structura membranelor biologice. Potențialul de repaus. Potențialul de acțiune

Întrebări de control

1. Structura și funcțiile membranelor biologice. Transportul membranar. Transportul pasiv. Transportul activ (primar și secundar). Sistemele de macrotransport.

2. Potențialul membranar de repaus. Originea potențialului membranar de repaus. Metodele de studiu a potențialului de repaus. Caracteristicile echilibrului Donnan. Ecuația Nernst.

3. Potențialul de acțiune și originea ionică a acestuia. Fazele potențialului de acțiune, caracteristica lor. Nivelul critic de depolarizare, „overshoot”, potențiale vestigiale. Modificările permeabilității membranei. Potențialul monofazic și bifazic. Metode de studiere și înregistrare a potențialului de acțiune.

4. Răspunsul local. Particularitățile potențialului local (gradual) și ale potențialului de acțiune.

5. Modificările excitabilității în cursul potențialului de acțiune. Perioada refractară.

6. Parametrii excitabilității (pragul de intensitate și de timp). Acomodarea (dependența pragului de bruschețea stimulului). Legile excitării. Relația intensitate-durată (reobază, cronaxie). Importanța clinică a cronaximetriei.

7. Acțiunea polară a curentului galvanic. Catelectroton, anelectroton, depresia catodică.

I
A

Fiziologie virtuală aplicativă
The Plasma Membrane (CyberEd).

Programul furnizează informație despre structura membranei biologice și tipurile de transport membranar și permite efectuarea unui test referitor la cunoștințele câpătate.

Lucrarea nr. 1. Primul experiment Galvani

Scopul lucrării. Reproducerea experimentului clasic al lui Galvani pentru a lua cunoștință de istoria descoperirii „electricității animale”.

Materiale și ustensile necesare: cârlig de cupru sudat la o placă de zinc, broască, trusă de vivisecție.

Tehnica lucrării:

1. Pregătim preparatul membrelor posterioare de broască.
2. Fixăm preparatul membrelor posterioare de broască pe cârligul de cupru.
3. La legănarea preparatului, în momentul atingerii membrelor posterioare cu placa de zinc, mușchii se contractă (fig. 1.1).
4. În procesul-verbal se execută desenul experimentului și se trag concluzii.

Lucrarea nr. 2. Al doilea experiment Galvani (contractia fără metal)

Scopul lucrării. Demonstrarea faptului că între porțiunile lezate și nelezate ale mușchiului există o diferență de potențiale, care posedă o acțiune excitatoare.

Materiale și ustensile necesare: broască, trusă de vivisecție, planșetă.

Tehnica lucrării:

1. Pregătim preparatul neuromuscular cu lăbuță.
2. Efectuăm incizia mușchiului gastrocnemian aproape de genunchi.
3. Plasăm nervul sciatic pe mușchi astfel încât el să contacteze concomitent cu porțiunea lezată și cea nelezată a mușchiului.

În momentul atingerii vom observa contracția mușchiului (fig. I.2 A,B).

4. În procesul-verbal se execută desenul experimentului și se trag concluzii.

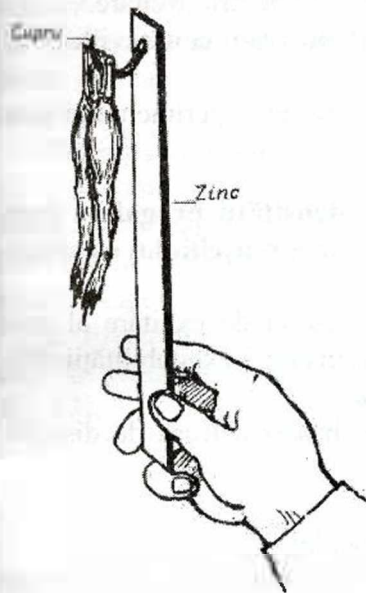


Fig. 1.1. Schema primei experiențe Galvani.

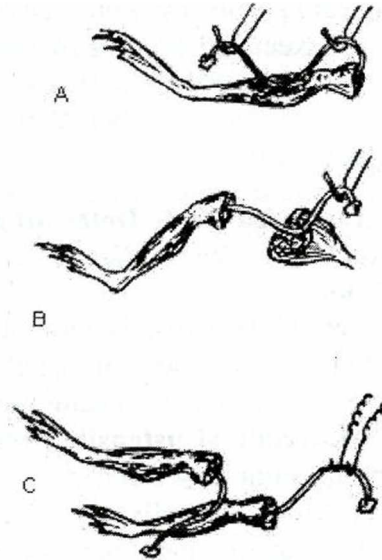


Fig. 1.2. Schema experienței a doua Galvani (A și B – două variante de aplicare a nervului) și a experimentului Matteuci (C).

Lucrarea nr. 3. Observări asupra excitării mușchiului cu curenți de acțiune (experimentul Matteuci)

Scopul lucrării. Demonstrarea apariției la excitarea mușchiului potențialelor de acțiune capabile să se răspândească și să excite preparatul neuromuscular.

Materiale și ustensile necesare: broască, trusă de vivisecție, planșetă, dispozitiv pentru excitare, un stimulator.

Tehnica lucrării:

1. Așezăm două preparate ale membrilor posterioare de broască pe planșetă astfel încât nervul unui preparat să se plaseze pe mușchiul preparatului al doilea, iar nervul preparatului al doilea îl aplicăm pe electrozii uniți cu dispozitivul pentru excitație.
2. Executăm excitații frecvente și observăm contracțiile mușchilor ambelor preparate (fig. 1.2 C).
3. În procesul-verbal se execută desenul experimentului și se trag concluzii.

Lucrarea № 4. Determinarea intensității pragale a excitantului la excitația directă și indirectă a mușchiului cu stimulenți unici

Scopul lucrării. Determinarea pragului de excitație al unui mușchi și al unui nerv în vederea demonstrării excitabilității diferite a țesutului nervos și celui muscular.

Materiale și ustensile necesare: broască, trusă de disecție, planșetă, stimulator electric.

Tehnica lucrării:

1. Pregătim un preparat neuromuscular.
2. Unim electrozii de excitație la stimulator (clemele de curent continuu), instalăm tumblers-indicator al intensității stimulului în poziția „zero”.
3. Așezăm pe electrozii de excitație nervul sciatic. Determinăm intensitatea pragală a excitantului. Prin rotirea butonului „Intensitate” determinăm poziția lui la apariția unei contracții minime a mușchiului. Astfel găsim intensitatea pragală a excitantului – intensitatea minimală a curentului electric capabilă să provoace excitația.
4. Plasăm electrozii de excitație direct pe mușchi și determinăm pragul excitației mușchiului ca și în cazul nervului.
5. În procesul-verbal se notează datele obținute și se trag concluzii.

Lucrarea nr. 5. Determinarea reobazei și cronaxiei la mușchii flexori ai degetelor mâinii (lucrarea se face sub formă de demonstrare)

Scopul lucrării. Determinarea reobazei și cronaxiei flexorilor degetelor mâinii.

Materiale și ustensile necesare: cronaximetru, doi electrozi pentru excitare, tampoane de tifon, eter, soluție Ringer, persoană examinată.

Tehnica lucrării:

1. Fixăm electrodul indiferent de referință pe suprafața anterioară a antebrațului. În prealabil degresăm pielea cu eter, iar pe locul aplicării electrodului punem un tampon de tifon, umectat cu soluție Ringer.

2. Electrodul activ, îmbibat cu soluție Ringer, îl aplicăm pe unul din punctele motorii de pe suprafața antebrațului sau a palmei (fig. 1.3).

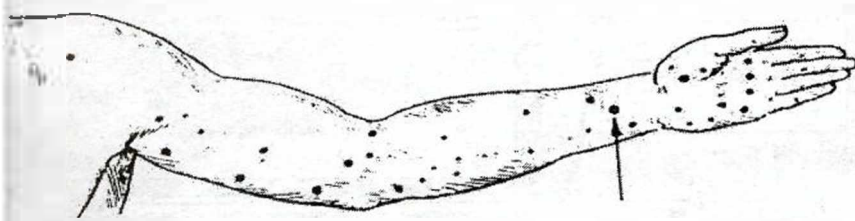


Fig. 1.3. Punctele motorii ale mușchilor mâinii. Prin săgeată este indicat punctul flexorului comun al degetelor.

3. În poziția „stimul unic”, prin apăsarea butonului aplicăm un stimul electric, reglând intensitatea lui după scară. Treptat, mărim intensitatea stimulului, găsim intensitatea la care apare senzația excitării (reobaza senzorială); mărim încă puțin intensitatea stimulului observăm contracția musculară (reobaza motorie).

4. Prin comutarea tumblerului pe scara timpului și apăsarea butonului acționăm asupra pielii persoanei examinate cu stimuli a căror intensitate automat se dublează, durata lor fiind exprimată în

milisecunde. Rotind registrul care reglează durata stimulilor, de terminăm cronaxia (în baza senzațiilor – cronaxia senzorială), iar în baza contracției musculare – cronaxia motorie.

5. În procesul-verbal se notează principiile determinării reobazei și cronaxiei, se formulează definițiile acestor noțiuni, se notează datele obținute și se explică care proprietăți ale țesuturilor excitabile se caracterizează prin reobază și cronaxie.

Programul SimPatch

SimPatch este o simulare interactivă a unui experiment electrofiziologic în care este utilizată tehnica "patch-clamp" pentru a investiga canalele ionice cu porți voltaj dependente, localizate în membrana neuronilor mamiferelor.

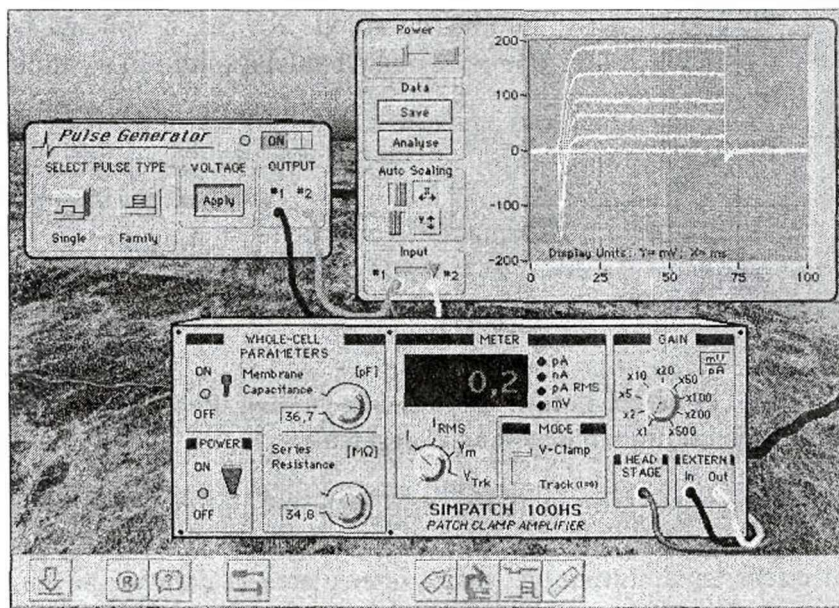


Fig. 1.4. Laboratorul virtual SimPatch.

SimPatch conține diferite secțiuni de program

- Date generale – scurtă introducere la bazele experimentale
- Introducere – introducere în experimente

- Curs Practic – această secțiune conține laboratorul virtual unde se pot efectua experimente pe celulele din retină.

Laboratorul virtual constă din 3 dispozitive: un amplificator patch-clamp, un generator de pulsații și un osciloscop, care permite utilizatorului să efectueze experimentul în volumul deplin. Există și moduli suplimentari ce pot modifica câțiva parametri importanți: “Solutia”, „Microscopul” și “Stimulatorul de Pulsații” (fig I.4).

Amplificatorul patch-clamp este “inima” laboratorului virtual. Este conectat prin cablul roșu la un preamplificator în care este montată o pipeta de sticlă (electrod: nu se vede), ce contactează neuronul de la care înregistrează. Prin aceste conexiuni, amplificatorul supune neuronul la diferite potențiale de voltaj, precum potențialul de membrană (PM) prezent permanent, și potențialul de acțiune (PA), care sunt parametrii stimulului de voltaj, generați de dispozitivul generator de pulsații. Acest cablu de asemenea poartă un semnal al curenților ionici înregistrați, produși de neuron.

Amplificatorul patch-clamp are o capacitate și o rezistență în serie a circuitului compensator pentru a anihila erorile. Pentru a activa circuitul compensator rotiți butonul la ON. Pentru a vedea curenții artificiali e nevoie de a aplica celulei pulsații de voltaj care nu vor deschide canalele ionice, de exemplu, selectați tipul de pulsație “Single” de la generatorul de pulsații. Comutați butoanele spre valori definite pentru a micșora cantitatea de curenți artificiali. După o compensare completă poate fi calculată aria suprafeței celulei presupunând că C_m a 1cm^2 de membrană = $1\ \mu\text{F}$.

Panoul principal cu contor indică 4 semnale. Selectarea se efectuează cu un buton rotativ. Cele 4 semnale sunt:

I – curentul pipetei. Citirea este automat raportată la scară pentru a corespunde cu Gain (surplus, câștig). Operația este auto-reglabilă: punctul decimal și indicatorii unităților se modifică automat pentru a reprezenta chiar și curenții de voltaj foarte mari.

IRMS – zgomotul curentului RMS. Panoul Gain nu afectează aceste date.

V_m – potențialul de membrană.

VTcK – producerea automată compensatorie a circuitului nul.

Modificatorul "Mode" are următoarele funcții:

V-Clamp – este controlat PM și este înregistrat curentul necesar pentru a menține potențialul. Folosiți V-clamp pentru a măsura reacțiile de răspuns ale celulei.

Track ($I=0$) – reglator de curent lent, dar toți stimulii sunt ignorați și curentul este reglat la zero.

Desenul din stânga arată panoul "Output Gain". Sunt 9 setări Gain accesibile la o rotație de 1, 2, 5 variind de la 1 la 500. Orice curent înregistrat va fi amplificat în corespundere cu setările Gain și transformare în voltaj. De ex., un curent de 200 pA va fi amplificat la 1V dacă Gain este aranjat la 5 mV/pA.

Generatorul de pulsații permite experimentatorului să selecteze pulsația de curent și să aplice acest stimul la canalele producătoare (ambele sunt totdeauna active).

Pentru a edita una sau ambele înregistrări de voltaj la generatorul de pulsații, trebuie de apăsat pe butonul stimul-pulsație localizat pe panoul de comandă de pe partea inferioară a ferestrei SimPatch.

Canalul de ieșire # 1 este conectat la amplificatorul patch-clamp extern de intrare (cablu albastru) pentru stimularea electrică a neuronului.

Canalul de ieșire # 2 este conectat la canalul de intrare a osciloscopului (cablu verde), care permite experimentatorului să afișeze înregistrarea de voltaj a timpului de pulsație selectat.

Osciloscopul afișează curentul primit la unul sau ambele canale de intrare.

Canalul de intrare #1 este conectat la generatorul de pulsații, iar canalul de intrare #2 la amplificatorul patch-clamp. Pentru a activa un canal de intrare mișcați bara de derulare la stânga (#1) sau dreapta (#2).

Sunt 3 modalități de a schimba scara pe axele X sau Y ale ecranului:

a) modificați valorile scării direct – faceți click pe un număr potrivit cu mouse-ul și schimbați valoarea manual;

b) utilizați funcția de schimbare autonomă a scării – apăsați bara de derulare din stânga și mișcați spre butonul din dreapta;

c) utilizați funcția de mărire (majorare) – mutați cursorul mouse-lui deasupra pictogramei osciloscopului (cursorul își va modifica forma din săgeată în cruce) și faceți un click.

Butonul “Save” dă posibilitate utilizatorului să salveze datele curente de pe ecranul osciloscopului pe discul dur. Activarea funcției “Save” nu este posibilă în caz dacă osciloscopul nu posedă puterea necesară sau pe ecran nu sunt afișate date. După apăsarea butonului “Save” apare o casetă de dialog care oferă posibilitatea de a specifica tipul fișierului în care s-au aflat datele curente.

Un click pe butonul “Analyse” va deschide o nouă fereastră pentru a oferi utilizatorului câteva instrumente (opțiuni) pentru prelucrarea datelor. Există posibilitatea de a analiza datele curente afișate pe ecranul osciloscopului (vezi de asemenea în Settings) sau datele precedente care pot fi încărcate în memorie de pe discul dur. Aceasta dă posibilitate utilizatorilor experimentați să efectueze mai întâi experimente și apoi să analizeze datele precedente.

2. Proprietățile fibrelor nervoase.

Sinapsa neuromusculară

Întrebări de control:

1. Conductibilitatea. Clasificarea fibrelor nervoase în funcție de viteza de conducere. Conducerea în fibrele nervoase amielinice și mielinice.

2. Legile propagării excitației prin fibrele nervoase. Labilitatea funcțională a nervului.

3. Transmiterea sinaptică neuromusculară. Caracteristicile funcționale (unidirecționalitatea, retenția sinaptică, potențarea post-tetanică, fatigabilitatea, inexcitabilitatea electrică a membranei postsinaptice, labilitatea).

680874



4. Etapele fundamentale ale transmiterii prin sinapsă. Potențialul plăcuței motoare. Substanțele care influențează transmiterea în sinapsa neuromusculară.

5. Fiziologia țesutului glandular. Fenomenele electrice (potențialul secretor) ale țesutului glandular. Ciclul secretor. Reglare nervoasă și umorală a secreției glandulare.

Lucrarea nr. 1. Legile propagării excitației prin fibra nervoasă

Scopul lucrării: observarea în timpul experimentului legilor de bază ale propagării excitației prin fibrele nervoase.

Materiale și ustensile necesare: broască, trusă de vivisecție, planșetă, stimulator electric, doi electrozi pentru excitarea nervului, stativ, soluție Ringer, soluție de amoniac sau cloroform, fitil de vată.

Tehnica lucrării:

1. Pregătim preparatul membrilor posterioare de broască. Cu ajutorul piesei de fixat atârnam preparatul de coloana vertebrală în stativ.

2. Cu ajutorul pensetei aplicăm câte o ligatură sub fiecare radiculă spinală. Ținând o radiculă nervoasă cu ajutorul ligaturii plasăm electrozii sub ea și o excităm cu curent de o intensitate pragală. Observăm care grupe de mușchi se contractă. Experimentul se repetă, plasând electrozii sub alte radicule (legea propagării izolate a excitației prin fibrele nervoase).

3. Preparatul membrilor posterioare de broască îl plasăm pe plăcile de plută ale planșetei. Preparăm nervul sciatic pe suprafața dorsală a coapsei. Cu foarfecele tăiem femurul și mușchii coapsei păstrând integritatea nervului. Aplicând excitații frecvente cu ajutorul curentului suprapragal asupra nervului sciatic, observăm contracțiile mușchilor coapsei și gambei mai sus și mai jos de secționare (legea propagării bilaterale a excitației prin fibra nervoasă).

4. Pe nervul sciatic aplicăm un fitil de vată, îmbibat cu cloroform, sau o ligatură. Excităm nervul aplicând curent de intensitate

propagă mai sus și mai jos de locul alterării cu fixarea cazului în care va avea loc contracția mușchiului gastrochemian (legea integrității fiziologice a fibrei nervoase).

5. Schemele experimentelor se schițează în caiet (fig. I.6), și se trag concluzii.

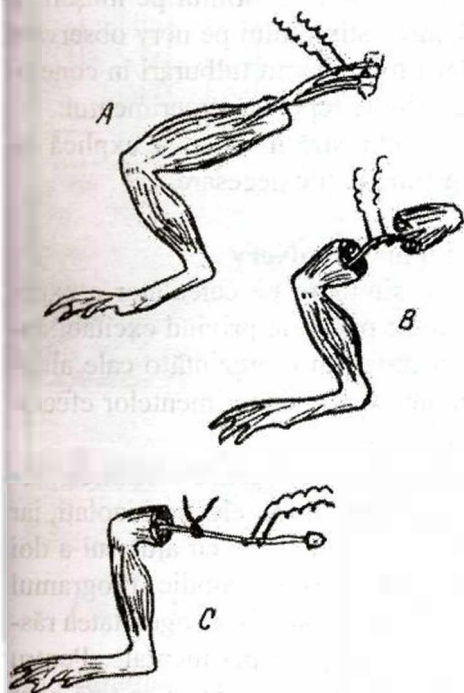


Fig. I. 6. Demonstrarea experimentală a legităților de propagare a excitației prin nervi și fibre nervoase:

A – propagarea izolată a excitației prin nerv;

B – propagarea bilaterală a excitației;

C – necesitatea integrității fiziologice a nervului.

Lucrarea nr. 2. Cercetarea acțiunii toxinei curara asupra contracției musculare

Scopul lucrării este același ca și în lucrarea precedentă.

Materiale și ustensile necesare: broască, trusă de vivisecție, cutie Petri, stimulator electric, doi electrozi pentru excitare, soluție de substanță curarizantă, soluție Ringer.

Tehnica lucrării:

1. Pregătim preparatul neuromuscular.

2. Plasăm preparatul pe planșetă și aplicăm excitantul electric pragal mai întâi pe nerv, apoi pe mușchi. În ambele cazuri observăm contracția mușchiului.

3. Punem mușchiul în cutia Petri cu soluție Ringer ce conține substanță miorelaxantă.

4. Peste 1–2 minute aplicăm din nou un stimul pe mușchi și observăm contracția lui. La aplicarea stimulului pe nerv observăm că mușchiul nu se contractă. Dacă n-au apărut tulburări în conexiunea neuromusculară, peste 1–2 minute repetăm experimentul.

5. Schema experimentului se schițează în caiet, se explică fenomenul observat se formulează concluziile necesare.

Laboratorul virtual SimNerv

SimNerv este un program de simulare pe calculator a experimentelor efectuate pe nervul motor periferic privind excitabilitatea și conductibilitatea lui. Acest program reprezintă o cale alternativă, modernă și accesibilă, în abordarea experimentelor efectuate pe animalul de laborator.

Nervul schiatic izolat de broască, obținut printr-o tehnică prezentată în imagini video, este excitat cu stimuli electrici izolați, iar potențialele de acțiune generate sunt înregistrate cu ajutorul a doi electrozi de suprafață cuplați la un osciloscop catodic. Programul reproduce o condiție experimentală esențială – heterogenitatea răspunsului preparatelor biologice în condiții experimentale. Pentru interpretarea corectă a rezultatelor obținute trebuie să se țină cont și de faptul că experimentul se efectuează pe nerv, iar acesta reprezintă un ansamblu de fibre nervoase cu excitabilitate diferită.

Laboratorul „SimNERV” cuprinde componentele prezentate în fig. 1.7.

Cutia cu electrozi permite fixarea pe un suport a nervului schiatic izolat. Este dotată cu 2 electrozi de excitare (de culoare albastră și galbenă) și 2 electrozi de culegere (de culoare verde și roșie). Cutia oferă posibilitatea de deplasare a electrozilor pe o scală gradată cu lungimea de 10 cm. Suprafața de culoare albă, cu-

io prinsă între 5 și 6 cm, este destinată unirii cu pământul și are
 r întotdeauna potențialul 0 – orice electrod plasat pe această
 suprafață devine indiferent.

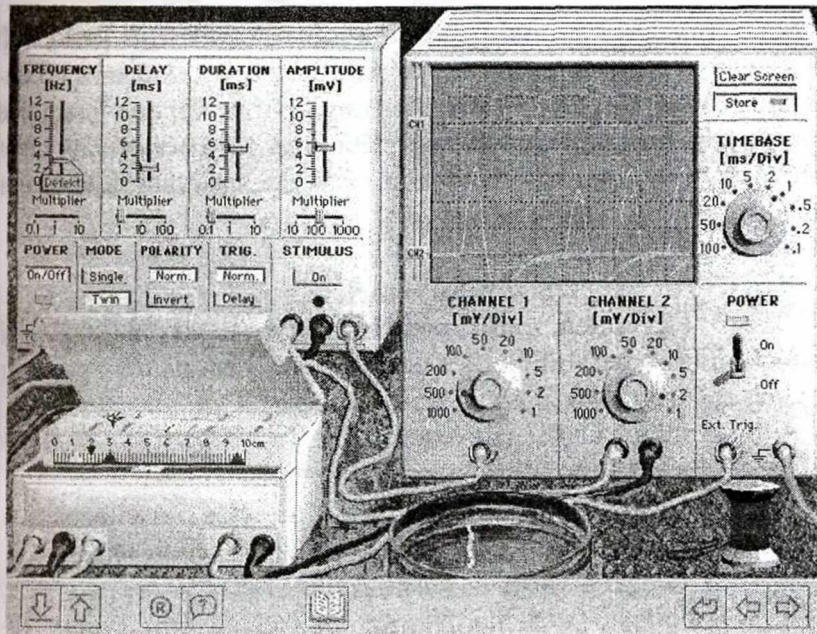


Fig. 1.7. Laboratorul virtual SimNerv.

Stimulatorul generează stimuli electrici la parametri de durată (Duration), amplitudine (Amplitude) și interval de stimulare (Delay) ce pot fi stabilite prin deplasarea pe verticală a unui cursor. Fiecare din acești parametri pot fi amplificați prin deplasarea pe orizontală a câte unui cursor Multiplier. Stimulatorul mai permite stabilirea modalității de aplicare a stimulului (MODE) – Single/Twin, stabilește polaritatea electrozilor de stimulare (POLARITY) – Normal/Invert și poate asigura o anumită perioadă de latență între momentul aplicării excitației și înregistrarea imaginii pe osciloscop (TRIG) – Normal/Delay. Tasta STIMULUS/On permite „lansarea” excitației cu parametrii stabiliți în prealabil.

Osciloscopul permite înregistrarea grafică a parametrilor durată/timp ce țin de aplicarea excitantului (CHANNEL 1) și de potențialul de acțiune al nervului (CHANNEL 2). Pentru etalonarea înregistrării, osciloscopul prezintă 3 „butoane” – două pentru amplitudine [mV/Div] și unul pentru durată – TIMEBASE [ms/Div]. Diviziunea este reprezentată de pătratul cu latura de 5 cm, corespunzător caroiajului de pe ecran. Osciloscopul suprapune imaginile obținute prin experimente repetate atâta timp cât este activată tasta Store și permite „golirea” ecranului când este activată tasta Clear Screen.

Pregătirea experimentului SimNerv

Pentru efectuarea experimentelor privind excitabilitatea și conductibilitatea nervului motor periferic este necesar de a pregăti „laboratorul” respectând următoarele etape:

- se deschide camera de experiment;
- se plasează nervul pe suportul camerei;
- se activează POWER/On pentru stimulator și osciloscop;
- se stabilește modalitatea Single (MODE) de stimulare;
- se stabilește polaritatea Normal (POLARITY);
- se stabilește varianta Normal (TRIG) pentru timpul de latență a excitației;
- se re poziționează canalul CH1 în partea inferioară și CH2 în porțiunea mijlocie a ecranului osciloscopului;
- se etalonează înregistrarea:

CHANNEL 1 (CH1) – 500 mV/Div;
CHANNEL 2 (CH2) – 2 mV/Div;
TIMEBASE –1 ms/Div

Partea 1. Stimulul prag

- se plasează electrozii – verde la 1 cm, albastru la 3 cm, galben la 5,5 cm și roșu la 9 cm;

- pentru durata stimulării se fixează cursorul vertical DURATION la 2 ms și cursorul orizontal Multiplier/DURATION la 1x;
- pentru amplitudinea stimulării se fixează cursorul orizontal Multiplier/AMPLITUDE la 10x;
- se stimulează repetat nervul (activând tasta STIMULUS/On) crescând progresiv amplitudinea (deplasarea cursorului AMPLITUDE) cu 10 mV/determinare, până la înregistrarea unui potențial de acțiune minim al nervului;
- se activează tasta Store a osciloscopului;
- se continuă stimularea progresivă până în momentul în care amplitudinea potențialului nu se mai modifică, reprezentând potențialul de acțiune maxim al nervului;

Partea a 2-a. Conducerea potențialului de acțiune neuronal

- se activează tasta Clear Screen și se inactivează tasta Store a ecranului osciloscopului;
- se aplică stimuli cu durata de 2 ms și amplitudinea de 200 mV obținuți prin fixarea cursorilor verticali și orizontali în următoarele poziții;
- DELAY – 2 ms, Multiplier – 1x;
- DURATION – 2 ms, Multiplier – 1x;
- AMPLITUDE – 2 mV, Multiplier – 100x;
- OBSERVAȚIE – diferența de potențial (V) reprezentată pe ecranul osciloscopului este diferența între potențialul de la nivelul electrodului roșu (VR) și cel de la nivelul electrodului verde (VV).

2.1. Culegerea monopolară

Se obține utilizând electrodul explorator (roșu) și electrodul indiferent (verde) plasați astfel:

- a) pentru obținerea unui potențial monofazic pozitiv – verde la 1 cm, albastru la 3 cm, galben și roșu la 5,5 cm;
- b) pentru obținerea unui potențial monofazic negativ – roșu la 1 cm, albastru la 3 cm, galben și verde la 5,5 cm;

2.2. Culegerea bipolară

Se obține utilizând electrodul explorator (roșu) și electrodul de referință (verde) plasați astfel:

a) pentru obținerea unui potențial bifazic cu prima fază pozitivă și a doua negativă – verde la 1 cm, albastru la 3 cm, galben la 5,5 cm și roșu la 9 cm;

b) pentru obținerea unui potențial bifazic cu prima fază negativă și a doua pozitivă – verde la 1 cm, galben la 5,5 cm, albastru la 7 cm și roșu la 9 cm.

Partea a 3-a. Legile conducerii prin fibra nervoasă

- se activează tasta Clear Screen;
- se utilizează stimuli cu durata de 2 ms și intensitatea de 200 mV (secvența 2);
- se plasează electrozii – verde la 1 cm, albastru la 3 cm, galben la 5,5 cm și roșu la 9 cm și se obține un potențial bifazic cu prima fază pozitivă și a doua negativă;
- pentru aplicarea ligaturilor se execută „click” pe mosorul de ață și ținând apăsat butonul din stânga al mouse-ului se „fixează” firul de ață pe nerv, în locul de aplicare a ligaturii;
- se efectuează prima ligatură în poziția 7 cm (între electrodul albastru și cel roșu – potențialul devine monofazic pozitiv);
- se deplasează ligatura în poziția 2 cm (între electrodul albastru și cel verde) – potențialul devine monofazic negativ;
- se aplică două ligaturi simultan în cele două poziții menționate. Nu se observă nici un potențial.

Partea a 4-a. Perioada refractară și perioada excitabilă neuronală

- se îndepărtează ligaturile, se activează Clear Screen și tasta Store;
- se plasează electrozii – verde la 1 cm, albastru la 3 cm, galben și roșu la 5,5 cm;

- se activează tasta Twin/Mode și se crește progresiv intervalul de stimulare, deplasând cursorul Delay cu 1 msec/determinare;
- se urmărește momentul apariției și amplitudinea răspunsului la cel de-al doilea stimul;
- stimularea se oprește când cei doi excitanți determină răspunsuri cu aceeași amplitudine.

Tema 3. Fiziologia țesutului muscular striat și neted

Întrebări de control

1. Structura mușchilor striati. Fibra musculară striată. Caracteristicile moleculare ale filamentelor contractile. Proteinele reglatoare (tropomiozina, troponina), sarcomerul, reticulul sarcoplasmatic, sistemul T.

2. Fibrele musculare rapide (albe) și lente (roșii). Unitatea motorie.

3. Proprietățile fizice ale mușchilor scheletici (extensibilitatea, elasticitatea, forța musculară, relațiile lungime-tensiune și sarcină-viteză).

4. Proprietățile fiziologice ale mușchilor scheletici (excitabilitatea, conductibilitatea, contractilitatea, labilitatea, tonicitatea).

5. Mecanismul contracției musculare. Fenomenele electrochimice (generarea și propagarea potențialului de acțiune pe sarcolemă spre sistemul T). Rolul ionilor de Ca^{++} . Fenomenele mecanochimice (mecanismul «mersului pas cu pas»). Mecanismul relaxării musculare.

6. Manifestările ce însoțesc contracția musculară. Fenomenele electrice (electromiografia). Fenomenele termice (termogeneza în repaus și în contracție).

7. Tipurile de contracție. Contracția unică, tetanosul incomplet și complet.

8. Con trac ția izometrică. Raportul lungime-tensiune (p load). Con trac ția izotonică. Raportul sarcină – viteză (afterload). Con trac ția auxotonică.

9. Travalul muscular. Formele de lucru muscular (dinar pozitiv și rezistiv, static). Oboseala musculară, mecanismele ob selei. Hipertrofia și atrofia mușchilor.

10. Particularitățile morfofuncționale ale țesutului muscular neted. Tipurile de mușchi netezi: monounitari și multiunitari. Mecanismul con trac ției.

Fiziologie virtuală aplicativă

„Sistemul muscular”

Cuprinde următoarele compartimente:

1. Reviu anatomic: țesut muscular striat.
2. Sinapsa neuromusculară.
3. Teoria filamentelor glisante.
4. Metabolismul mușchiului.
5. Con trac ția unităților motorii.
6. Con trac ția mușchiului integru.

Lucrarea nr. 1. Con trac ția unică și tetanică a mușchiului scheletal

Scopul lucrării. Înregistrarea con trac ției unice și tetanice a mușchiului scheletal și studierea condițiilor în care apar diferite tipuri de sumare a con trac țiilor musculare.

Materiale și ustensile necesare: broască, trusă de vivisecție, miograf, levierograf Engelman cu peniță, ckimograf, hârtie, cle stimulator electric, soluție Ringer, cerneală.

Tehnica lucrării :

1. Pregătim preparatul mușchiului gastrocnemian de broască. Fixăm mușchiul în miograf și reglăm înscrierea pe tamburul kime grafului.

2. Unim cu sârmă de conexiuni stimulatorul electric cu cle mele miografului.

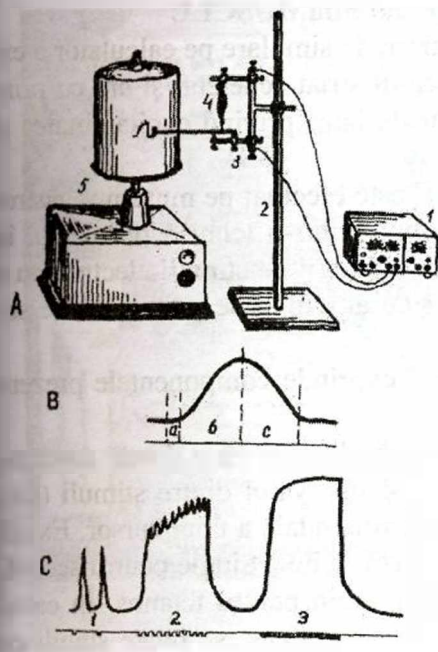


Fig. 1.8. Miografia :
A – instalația pentru înregistrarea contracțiilor musculare: 1 – stimulator electric; 2 – stativ; 3 – mio-graf; 4 – mușchiul gastrocnemian de broască; 5 – kimograf.
B – curba contracției unice (secusa): *a* – perioada latentă; *b* – faza de contractare; *c* – faza de relaxare.
C – curbele contracțiilor tetanice: 1 – secuse; 2 – tetanos incomplet; 3 – tetanos complet.

3. Aplicând stimuli unici, înregistrăm o contracție unică a mușchiului. Pentru a căpăta o curbă desfășurată, eliberăm șurubul ce fixează tamburul kimografului și în momentul excitării îl rotim rapid cu mâna.

4. Fixăm tamburul, punem în funcție kimograful și, aplicând excitări ritmice, înscriem curbele tetanosului incomplet (zimțat) și complet (neted).

5. La procesul-verbal se anexează kimogramele obținute și se descriu fazele contracției unice și condițiile în care apar contracții tetanice incomplete și complete. Kimogramele trebuie să corespundă celor indicate în fig. 1.8.

Laboratorul virtual SimMUSCLE

SimMUSCLE este un program de simulare pe calculator a experimentelor efectuate pe mușchiul striat scheletal și are ca principal obiectiv studiul aspectelor de bază privind excitabilitatea și contractilitatea.

Experimentul SimMUSCLE este efectuat pe mușchiul gastrocnemian izolat de broască, obținut printr-o tehnică prezentată în imagini video și are posibilitatea aplicării de stimuli electrici cu durată constantă de 1 msec, dar cu amplitudine și interval de simulare variabile.

Laboratorul „SimMUSCLE” cuprinde componentele prezentate în fig. 1.9:

Stimulatorul generează stimuli electrici cu o durată constantă, iar amplitudinea (Amplitude) și intervalul dintre stimuli (Delay) pot fi stabilite prin deplasarea orizontală a unui cursor. Există 3 modalități (Mode) de aplicare a stimulilor: Single pentru secus, Twin pentru sumația temporală și Train pentru tetanos. În cazul modalității Train numărul de excitații aplicate se poate stabili cu ajutorul cursorului Counts. Activarea butonului On permite aplicarea stimulului cu parametrii stabiliți în prealabil.

Traductorul permite obținerea de contracții în condiții izometrice și respectiv în condiții izotone. Traductorul prezintă butonul Calibration – de culoare roșie când este necesară calibrarea și de culoare verde când calibrarea este efectuată. Calibrarea presupune activarea butonului Zero Adjust. Traductorul prezintă două mufe pentru fiecare dintre cele două tipuri de contracții. Cablu trebuie fixat în mufa corespunzătoare tipului de contracție pe care dorim să o efectuăm. La traductor sunt anexate: un stativ pentru fixarea mușchiului, 2 electrozi de activare, 6 greutăți a 50g fiecare și o cutie Petri cu două preparate musculare plasate în soluție Ringer.

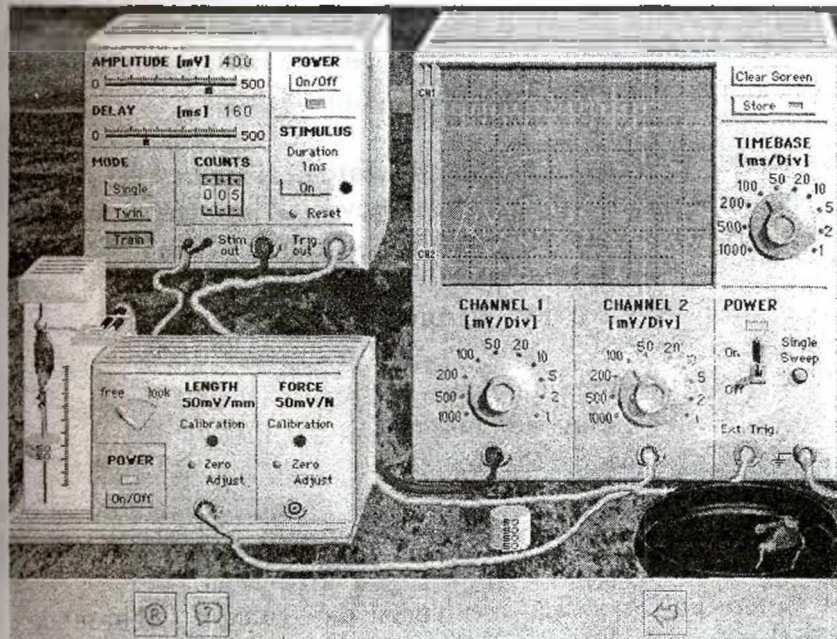


Fig. 19. Laboratorul virtual SimMUSCLE.

Osciloscopul înregistrează pe canalul CH1 parametrii amplitudine/timp ce țin de excitantul aplicat, iar pe canalul CH2 redă grafic contracția musculară și permite analiza parametrilor forță/scurtare. Pentru etalonarea înregistrării osciloscopul prezintă butoane pentru amplitudine – mV/Div și pentru durată – TIMEBASE – ms/Div. Diviziunea este reprezentată de pătratul de pe ecranul osciloscopului cu latura de 5 mm. Osciloscopul poate stoca imaginile obținute prin stimulări succesive dacă se activează butonul Store, și poate goli ecranul prin activarea butonului Clear Screen.

Pregătirea experimentului

- se activează (Power-On) stimulatorul, traductorul și osciloscopul;

- se fixează mușchiul în suportul traductorului și se preîntinde cu o greutate de 50 g pentru a induce un tonus de repaus. Această greutate reprezintă sarcina pe care mușchiul trebuie să o ridice atunci când efectuează un travaliu dinamic.

Partea 1. Secusa – contracția izotonă și izometrică

Stabiliți parametrii de lucru ai secvenței după cum urmează:

OSCILOSCOP: CH1: 500 mV/div → 1 mm = 100 mV = 2 N

CH2: 50 mV/div

TIMEBASE: 20 msec/div → 1 mm = 4 msec

activați tasta Store

STIMULATOR: Amplitude: 500 mV

Delay: 200 msec

Mode: Single

TRADUCTOR:

(a). Contracție izotonă: combinația free-Length + Cablu în mufă + Calibrare

(b). Contracție izometrică: combinația lock-Force + Cablu mufă + Calibrare

observație – toate etapele următoare vor fi efectuate în condiții izometrice, astfel că această combinație nu va fi modificată până la sfârșitul experimentului.

Partea a 2-a. Sumația spațială

OSCILOSCOP: CH1: 500 mV/div → 1 mm = 100 mV = 2 N

CH2: 50 mV/div

TIMEBASE: 20 msec/div

activați tasta Clear Screen și apoi Store

STIMULATOR: Amplitude: 200 → 250 → 300 → 350 → 400 → 500 mV

Delay: 200 msec

Mode: Single

Partea a 3-a. Sumația temporală

OSCILOSCOP: CH1: 500 mV/div → 1 mm = 100 mV = 2 N
CH2: 50 mV/div

TIMEBASE: 50 msec/div

activați tasta Clear Screen și apoi Store

STIMULATOR: Amplitude: 500 mV

Delay: 200 → 150 → 100 → 75 → 50 → 25 msec

Mode: Twin

Partea a 4-a. Tetanos incomplet

OSCILOSCOP: CH1: 500 mV/div
CH2: 100 mV/div

TIMEBASE: 100 msec/div

activați tasta Clear Screen și apoi Store

STIMULATOR: Amplitude: 500 mV

Delay: 100 msec

Mode: Train

Counts: 8

Partea a 5-a. Tetanos complet

OSCILOSCOP: CH1: 500 mV/div
CH2: 100 mV/div

TIMEBASE: 100 msec/div

activați tasta Clear Screen și apoi Store

STIMULATOR: Amplitude: 500 mV

Delay: 50 msec

Mode: Train

Counts: 16

Partea a 6-a. Oboscala musculară

OSCILOSCOP: CH1: 500 mV/div → 1 mm = 100 mV = 2 N
CH2: 100 mV/div

TIMEBASE: 100 msec/div → 1 mm = 20 msec

activați tasta Clear Screen și apoi Store

(a) prima secusă

STIMULATOR: Amplitude: 500 mV

Delay: 50 msec

Mode: Single

Counts: 116

(b) oboseala musculară

STIMULATOR: Amplitude: 500 mV

Delay: 50 msec

Mode: Train

Counts: 116

(c) a doua secusă

STIMULATOR: Amplitude: 500 mV

Delay: 50 msec

Mode: Single

Counts: 116