

ANALOGOWY MODEL TRANSMISJI SYNAPTYCZNEJ

Aparatura

Komputer wraz z neurosymulatorem, Cobra3.

Przebieg ćwiczenia

W ramach ćwiczenia przeprowadzone zostaną następujące badania:

- A. Wyznaczanie stałej czasowej ładowania błony postsynaptycznej
- B. Badanie zależności amplitudy depolaryzacji od natężenia bodźca (natężenia prądu depolaryzującego)
- C. Badanie zależności częstotliwości wyładowań w aksonie od amplitudy depolaryzacji.

A. Wyznaczanie stałej czasowej ładowania błony postsynaptycznej

Czynności wstępne:

- a) włączyć komputer.
 - b) włączyć *Neurosymulator* (włącznik znajduje się w górnej części tylnej ścianki urządzenia).
 - c) włączyć jednostkę Cobra3 poprzez podłączenie do gniazda znajdującego się po prawej stronie wtyczki zasilacza.
 - d) uruchomić program *measure*, skrót do którego znajduje się na pulpicie ekranu.
1. Połączyć przewodami: gniazdo (7) z gniazdem (11) pobudzającego zakończenia synaptycznego oraz gniazdo (19) (wyjście analogowego kanału potencjału postsynaptycznego) z gniazdem wejściowym (21) przetwornika analogowo-cyfrowego.
 2. Nastawić natężenie egzocytozy neuromediatora na maksimum pokrętkiem (1).
 3. W celu przygotowania oprogramowania do nowej rejestracji kliknąć opcję „nowy pomiar” (czerwona kropka w lewym górnym rogu menu programu).
 4. Po pojawieniu się na ekranie monitora okna rejestratora:
 - a) wybrać zakładkę „pomiar normalny”
 - b) w ramce „Kanały pomiar” uaktywnić tylko pierwszy (lewy) kanał analogowy
 - c) w polu „rekord X” wybrać „Czas”.
 - d) w ramce „Zakres pomiaru” (lewy dolny róg ekranu) wybrać opcję „ $\pm 10V$ ” dla obu kanałów analogowych.
 5. Naciśnięcie przycisku „Dalej” spowoduje teraz przejście do nowego okna dialogowego. W oknie tym wybrać opcję „rozpocznij pomiar” i, po krótkiej chwili, wcisnąć na ok. 3 sekundy przycisk 4.

Uwaga: zbyt krótki pomiar nie umożliwi „uchwycenia” całego badanego przebiegu zależności potencjału postsynaptycznego od czasu!

Bezpośrednio po zwolnieniu przycisku 4 zakończyć rejestrację poprzez wybór opcji „zakończ pomiar” (opcja ta uaktywni się automatycznie po rozpoczęciu pomiaru).

6. Na ekranie monitora automatycznie pojawi się teraz wykres zależności potencjału postsynaptycznego od czasu (wykres czerwony). W celu wyznaczenia z tego wykresu stałej czasowej ładowania błony należy uaktywnić funkcję „zmierz”, oznaczoną symbolem  (po prawej stronie drugiego wiersza menu).

Funkcja ta wyświetla współrzędne dwóch punktów (oznaczonych na ekranie „1” i „2”), które można dowolnie przesuwając przy pomocy myszy, jak też różnicę odpowiednich wartości współrzędnych między tymi punktami.

- a) ustalić współrzędne punktu rozpoczęcia procesu ładowania błony (przesuwając do niego punkt „1”) oraz dowolnie wybranego punktu z obszaru „nasylenia” potencjału postsynaptycznego (przesuwając do niego punkt „2”).
- b) odczytać z okienka nad wykresem całkowitą zmianę potencjału postsynaptycznego ΔY .
- c) sprawdzić, po jakim czasie od rozpoczęcia procesu ładowania błony przyrost potencjału postsynaptycznego osiągnął wartość $\Delta Y' = 0.63 \cdot \Delta Y$ (uprzednio obliczyć tę wartość!). Z definicji będzie to stała czasowa ładowania błony. (Najłatwiej to zrobić przesuwając punkt „2” wzdłuż wykresu do momentu, w którym różnica współrzędnych Y tego punktu i punktu „1” osiągnie wartość $\Delta Y'$ i odczytać następnie odpowiednią wartość ΔX). Wpisać wyznaczoną wartość stałej czasowej do odpowiedniej tabeli formularza.

7. Powtórzyć czynności z podpunktów 3 oraz 5-6 punktu A dla dwóch, istotnie różniących się natężeń bodźca depolaryzującego (zmieniamy to natężenie pokrętką 1).

8. Obliczyć wartość średnią czasu ładowania błony i wpisać ją do Tab. 1.

B. Badanie zależności amplitudy depolaryzacji od natężenia bodźca (natężenia prądu depolaryzującego)

1. Zachowując dotychczasową konfigurację eksperymentalną (podpunkt A.1), dodatkowo połączyć gniazdo 7 z gniazdem wejściowym 22 przetwornika analogowo-cyfrowego. Umożliwi to dodatkowo rejestrację prądu postsynaptycznego równoległe z rejestracją potencjału postsynaptycznego.
2. Za pomocą pokrętki (1) ustawić natężenie bodźca tak, aby kreska widoczna na pokrętkie pokrywała się z początkiem skali znajdującej się nad pokrętką.
3. W programie „measure” kliknąć opcję „nowy pomiar”, a następnie uaktywnić w ramce „Kanały pomiar” drugi kanał analogowy.
4. Powtarzając czynności (3) oraz (5) wymienione w punkcie A, dokonać jednoczesnej rejestracji natężenia bodźca prądowego oraz potencjału postsynaptycznego.
5. Po zakończeniu rejestracji na ekranie monitora, podobnie jak poprzednio, pojawi się wykres zależności potencjału postsynaptycznego od czasu (wykres czerwony) oraz dodatkowo wykres zależności czasowej bodźca prądowego (wykres niebieski).

Uwaga: oś rzędnych odnosi się teraz do potencjału postsynaptycznego!

6. Stosując w sposób wyżej opisany (podpunkt A.6) funkcję „zmierz” odczytać amplitudę depolaryzacji (to jest odchylenie stacjonarnego, „nasyleniowego” potencjału postsynaptycznego od jego wartości spoczynkowej) i wpisać ją do odpowiedniej kolumny w tabeli pomiarowej.
7. W celu odczytania natężenia bodźca prądowego (proporcjonalnego do napięcia, stąd jednostki napięcia) kliknąć pole „U1”. Spowoduje to, że oś rzędnych odnosić się będzie do bodźca prądowego - na ekranie pozostanie tylko wykres niebieski. Przy pomocy funkcji „zmierz” odczytać natężenie bodźca i wpisać je do odpowiedniej kolumny tabeli pomiarowej.
5. Dla co najmniej ośmiu różnych, rosnących natężeń bodźca prądowego zmierzyć ich wartość oraz odpowiednią amplitudę depolaryzacji, powtarzając czynności (4) do (7). Należy zadbać o to, aby pojedynczy przyrost natężenia nie był zbyt duży, gdyż w przeciwnym przypadku nie zostanie osiągnięta zadana liczba punktów pomiarowych!
6. Wykreślić na papierze milimetrowym zależność amplitudy depolaryzacji od natężenia bodźca prądowego.

C. Badanie zależności częstotliwości wyładowań w aksonie od amplitudy depolaryzacji

1. Zlikwidować połączenie gniazd 22 i 7, a następnie połączyć gniazdo 22 z gniazdem 20 *Neurosymulatora*, co umożliwi rejestrację przez komputer potencjału błonowego aksonu.
2. Wybrać opcję „nowy pomiar” w programie „*measure*”.
3. Kliknąć zakładkę „pomiar szybki” (spowoduje to pewną zmianę w sposobie rejestracji, opisaną poniżej w podpunkcie (6)).
4. Zachować wybór zakresu pomiarowego górnego kanału analogowego ($\pm 10V$), zaś zakres dolnego kanału analogowego ustawić na $\pm 0,1 V$.
5. „Częstotliwość” (próbki) ustawić na 10 kHz - spowoduje to, że program „*measure*” będzie rejestrował co 0,1 ms chwilowe wartości potencjału postsynaptycznego oraz potencjału błonowego aksonu. Ponieważ rejestracja obejmuje 2048 punktów pomiarowych, sam pomiar potrwa nieco ponad 0,2 sekundy. Po zakończeniu rejestracji danych program komputerowy przygotowuje je jeszcze przez krótki czas do prezentacji na ekranie monitora.
6. Kliknąć przycisk „Dalej”. Spowoduje to pojawienie się nowego okna z komunikatem „czekaj na wyzwalacz”. W odróżnieniu od poprzedniej sytuacji (punkty A i B), w trybie „pomiar szybki” użycie przycisku 4 powoduje *automatyczną* rejestrację danych pomiarowych przez komputer i następnie ich prezentację na ekranie monitora.

UWAGA: przycisk 4 zwalniać po czasie nie krótszym niż 0,2 s!

7. Dla co najmniej 8 różnych natężeń bodźca, poczynając od takiego ustawienia pokrętki 1, w którym kreska na nim pokrywa się ze środkiem skali umieszczonej powyżej niego, przeprowadzić jednoczesne rejestracje zależności czasowej potencjału postsynaptycznego (wykres czerwony) i potencjału błonowego aksonu (wykres niebieski).

8. Dla każdego zastosowanego natężenia bodźca:

- a) przy użyciu funkcji „zmierz” odczytać z czerwonego wykresu, w sposób wyżej opisany, amplitudę depolaryzacji i wpisać ją do tabeli 3,
- b) zmierzyć częstotliwość wyładowań w aksonie w stanie stacjonarnym i wpisać ją do tabeli 3. Ażeby oś rzędnych odnosiła się do potencjału błonowego aksonu (wykres niebieski), należy kliknąć opcję „U1”! W celu wyznaczenia częstotliwości wyładowań trzeba zliczyć liczbę „iglic” potencjału czynnościowego N w przedziale czasowym (T_p, T_k) , gdzie T_p = moment pojawienia się pierwszej zliczanej iglicy, natomiast T_k to moment pojawienia się ostatniej zliczanej iglicy¹. Ponieważ wyznaczana częstotliwość wyładowań odnosić się ma do stanu stacjonarnego neuronu, wartość T_p powinna być większa od stałej czasowej ładowania błony, wyznaczonej w punkcie A! Następnie za pomocą funkcji „zmierz” wyznaczyć długość przedziału czasowego $(T_k - T_p)$. Częstotliwość f wyładowań w aksonie, odpowiadającą stanowi stacjonarnemu neuronu, wyliczamy ze wzoru:

$$f = \frac{N - 1}{(T_k - T_p)}$$

Częstotliwość f wyrażamy w hercach ($1 \text{ Hz} = 1 \text{ s}^{-1}$).

9. Narysować wykres zależności częstotliwości wyładowań w aksonie od amplitudy depolaryzacji.

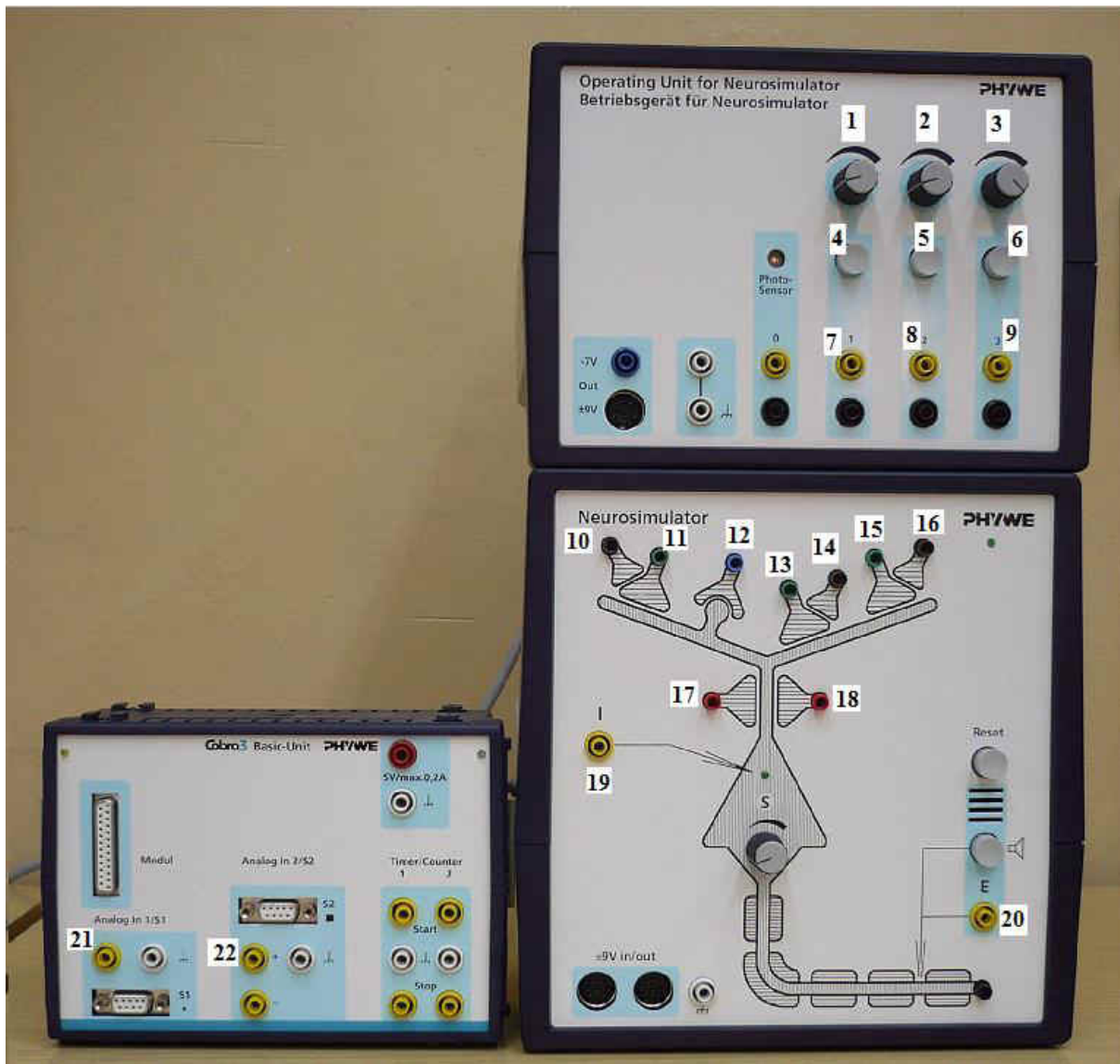
¹ W przeciwieństwie do rzeczywistej sytuacji fizjologicznej, poszczególne „iglice” mogą różnić się dość znacznie amplitudą. Wynika to ze skończonej częstotliwości próbkowania przez komputer potencjału błonowego aksonu, a dokładnie z faktu, że czas pomiędzy zbieraniem kolejnych próbek jest przy częstotliwości próbkowania 10 kHz zaledwie kilka razy mniejszy niż szerokość połówkowa „iglicy” (zatem nie zawsze „trafiamy” z pomiarem w szczyt „iglicy”).

Wymagane wiadomości teoretyczne

1. Omówić bierne właściwości elektryczne błon, znajomość pojęć: pojemność elektryczna, opór elektryczny, stała czasowa błony
2. Omówić elektryczny model zastępczy błony komórkowej; wyjaśnić, w jaki sposób zmiana wartości potencjału błonowego zależy od natężenia prądu jonowego płynącego przez błonę komórkową.
3. Omówić właściwości i mechanizm generowania potencjału czynnościowego w neuronie: rola kanałów sodowych i potasowych bramkowanych napięciem,
4. Opisać strukturę synapsy chemicznej (nerwowo-nerwowej) wraz ze znajomością neuroprzekaźników synaps pobudzających i hamujących
5. Omówić mechanizm funkcjonowania synapsy chemicznej, w szczególności mechanizm wydzielania neuroprzekaźnika (rola kanałów wapniowych bramkowanych napięciem);
6. Omówić mechanizm generowania i funkcje postsynaptycznego potencjału pobudzającego (EPSP) i postsynaptycznego potencjału hamującego (IPSP). Czym jest sumowanie czasowe i przestrzenne sygnałów postsynaptycznych.

Zalecana literatura

1. S. Miękiś, A. Hendrich, „Wybrane zagadnienia z biofizyki”, Volumed, Wrocław 1998.
Rozdziały 4.3, 4.6.1 i 4.7
2. Suplement teoretyczny do ćwiczenia na stronie Katedry
3. Opracowanie na stronie katedry : <http://www.biofiz.umed.wroc.pl/dydaktyka/inne/bfstr64.html>
4. G. G. Matthews, „Neurobiologia. Od cząsteczek i komórek do układów”, PZWL, 2000.



Uniwersytet Medyczny we Wrocławiu Katedra i Zakład Biofizyki i Neurobiologii	Ćwiczenie 10 Analogowy model transmisji synaptycznej	
..... Imiona i nazwiska studentów		Wydział: nr grupy: Data:
Ocena:	Podpis prowadzącego ćwiczenia	

Tabela 1. Pomiar stałej czasowej ładowania błony.

Nr pomiaru	Stała czasowa ładowania błony [ms]
1	
2	
3	
Wartość średnia	

Tabela 2. Zależność amplitudy depolaryzacji błony od natężenia bodźca prądowego.

Natężenie bodźca prądowego [V]*	Amplituda depolaryzacji [V]

*Prąd o stałym natężeniu płynący przez element o danym oporze wytwarza między końcami tego elementu stałe napięcie, co usprawiedliwia użycie jednostki napięcia jako miary natężenia płynącego prądu.

Tabela 3. Zależność częstotliwości wyładowań w aksonie od amplitudy depolaryzacji.

Amplituda depolaryzacji [V]	Częstotliwość wyładowań w aksonie [Hz]