

MASTER

Meetsysteem ter bepaling van de drempelwaarde van pijnprikkels bij goudvissen onder invloed van lokaal-anesthetica

Cornelissen, P.J.

Award date:
1992

[Link to publication](#)

Disclaimer

This document contains a student thesis (bachelor's or master's), as authored by a student at Eindhoven University of Technology. Student theses are made available in the TU/e repository upon obtaining the required degree. The grade received is not published on the document as presented in the repository. The required complexity or quality of research of student theses may vary by program, and the required minimum study period may vary in duration.

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

FACULTEIT DER ELEKTROTECHNIEK
TECHNISCHE UNIVERSITEIT
EINDHOVEN
VAKGROEP MEDISCHE ELEKTROTECHNIEK

MEETSYSTEEM TER BEPALING
VAN DE DREMPELWAARDE VAN
PIJNPRIKKELS BIJ GOUDVISSSEN
ONDER INVLOED VAN
LOKAAL-ANESTHETICA

door: P.J. Cornelissen

Rapport van het afstudeerwerk
uitgevoerd van oktober 1991 tot augustus 1992
in opdracht van: prof.dr.ir. J.E.W. Beneken
onder leiding van: dr.ir. J.A. Blom
met medebegeleiding van: drs. R.J.E. Grouls
dr. H.H.M. Korsten

DE FACULTEIT DER ELEKTROTECHNIEK VAN DE TECHNISCHE
UNIVERSITEIT EINDHOVEN AANVAARDT GEEN AANSPRAKELIJKHEID
VOOR DE INHOUD VAN STAGE- EN AFSTUDEERVERSLAGEN

Pijn is volkomen ellende
Het ergste kwaad en maakt, onhoudbaar
Een eind aan het grootst geduld.

John Milton, Paradise lost

SAMENVATTING

De tijd verstreken totdat goudvissen hun 'oprichtingsreflex' verliezen en de tijd waarna ze doodgaan ten gevolge van blootstelling aan een lokaal-anestheticum zijn veel gebruikte farmacologische eindpunten. Er is een geautomatiseerd meetsysteem ontwikkeld dat het nu mogelijk maakt om metingen te doen m.b.t het in- en uitwas traject (kinetisch gedrag) van lokaal-anesthetica bij deze dieren.

Met behulp van een computer, een Lab-Master-kaart en een versterker kan er een goed reproduceerbare elektrische stimulus (blokgevormig) aan de goudvissen aangeboden worden. Hiertoe krijgt de vis een elektrode van gebogen koperdraad door zijn rugspier geprikt. Afhankelijk van de duur van blootstelling en de concentratie van het gebruikte lokaal-anestheticum is sprake van er een drempelwaarde voor de pulsgrootte van de aangeboden stimulus. Indien deze waarde overschreden wordt, wekt de stimulus een zogenaamde C-escape als respons op. Een pulsgrootte die toeneemt met 0.66 Volt per seconde, bij een frequentie van 200 Hz, zorgt voor een eenduidig te detecteren respons.

Het detecteren van de respons gebeurt door middel van het meten van drukverschillen ontstaan ten gevolge van beweging van het zwemwater. Door de vis in een bak met een lokaal-anestheticum te plaatsen en periodiek metingen te doen m.b.t de heersende drempelwaarde kan er een inwas-karakteristiek bepaald worden. Zodra de vis geen beweging van mond en kieuwen meer vertoont wordt hij in een bak met schoon water geplaatst om vervolgens een uitwas-karakteristiek te kunnen bepalen. In tegenstelling tot wat de literatuur beweert, zijn de vissen als zij volkomen roerloos in het water liggen niet dood maar dusdanig onder algehele narcose dat zij niet meer zelfstandig kunnen ademen. Het aanbieden van een geforceerde waterstroom langs de kieuwbogen, hetzij door de vis te blijven stimuleren, hetzij door het gebruik van een circulatiepomp, zorgt ervoor dat de vissen weer bijkomen uit hun toestand van narcose.

Het op deze wijze blootstellen van vissen aan oplossingen van BAB en Lidocaïne maakt het mogelijk om de gevonden karakteristieken met elkaar te vergelijken. De gevonden resultaten duiden erop dat BAB een selectievere en krachtigere werking heeft dan Lidocaïne.

SUMMARY

The time of overturn and the time of death in goldfish exposed to local anesthetic agents are well known pharmacological end points. An automated measuring system was developed with which it is now possible to investigate the process of transport of the drug within the fish.

A computer, a Lab Master DMA card and an amplifier provide an electrical stimulus (square wave) of graded intensity. For this purpose we have to place an electrode made of a bent copper wire through the dorsal muscle of the fish. Depending on the duration of exposure to the drug and the concentration used we can find a threshold stimulus. Above this threshold stimulus there appears an agitated swimming response (C-escape). Increasing the voltage by 0.66 Volt per second, at a frequency of 200 Hz, we obtain a sudden pronounced swimming response.

To measure this response we look at the change in air pressure caused by water movements. By exposing the fish to local anesthetic agents and measuring the threshold stimulus we obtain insight into the effect of the drug absorbed by the fish. After the complete cessation of gill and mouth movements we put the fish into a chamber filled with fresh water and observe the effect of the drug exsorbed by the fish. In contrast to what we find in many publications, fish are not dead if they are lying motionless in the water: the effect of the drug has stopped the breathing. By creating a water flow across the gills, caused by the electrical stimulus or a circulation pump, the fish will completely recover.

By exposing fish to solutions of Lidocaine and BAB we can compare the measured effects. It was shown that BAB is a more powerful and selective drug than Lidocaine.

INHOUDSOPGAVE

bladz.

Samenvatting	3
Summary	4
1 Inleiding	7
2 Beschrijving van de afstudeeropdracht	8
2.1 De aandachtspunten	8
3 Pijn en het meten van pijn bij vissen	9
3.1.1 Het verschijnsel pijn	9
3.1.2 De bestrijding van pijn	10
3.2 Butyl-p-aminobenzoaat: BAB	12
3.3 De vis als proefdier	13
3.4 De invloed van het farmacon en de bepaling hiervan	14
3.5 De gebruikte prikkel en het effect van het aanbieden	17
3.6 De meetprocedure	20
4 De hardware	21
4.1 De Lab-Master	21
4.2 Drukmetingen	22
4.3 Het maken van de elektrische prikkel	23
4.4 De opstelling	24
5 De software	25
5.1 Het hoofdprogramma	25
5.2 De interrupt routine	29
6 Enige dierproeven	30
6.1.1 De hartelektrode	30
6.1.2 De eerste meetresultaten	31
6.1.3 De aanpassingen	34
6.2 De invloed van lokaal-anesthetica op goudvissen	36
6.3 Een vergelijking tussen BAB en Lidocaine	37

7	Conclusies en aanbevelingen	43
	literatuurlijst	46
	BIJLAGE 1: De Lab-Master instelling	51
	BIJLAGE 2: Het druksensor	52
	BIJLAGE 3: het schema	54
	BIJLAGE 4: Het opzetten van het systeem	55
	BIJLAGE 5: De beeldscherm opbouw	57

1 Inleiding

In de vakgroep Medische Elektrotechniek (EME) van de faculteit der Elektrotechniek van de Technische Universiteit Eindhoven (TUE) wordt in het servo-anesthesieproject bekeken in hoeverre automatisering in de anesthesie mogelijk is. Hiertoe werkt men o.a. samen met het Catharina Ziekenhuis in Eindhoven.

In dit ziekenhuis wordt onderzoek gedaan naar een nieuwe methode van pijnbestrijding bij terminale kankerpatiënten. Dit onderzoek resulteerde in de ontwikkeling van een suspensie van een lokaal-anestheticum (BAB), dat na epidurale toediening een langdurige (ordegrootte 4 tot 6 maanden) pijnvermindering oplevert (lit. 1-10).

Vanuit dit ziekenhuis is het verzoek gekomen om een geautomatiseerd meetsysteem te realiseren dat het mogelijk maakt metingen te verrichten met goudvissen blootgesteld aan verschillende lokaal-anesthetica in oplossing. Al sinds de jaren 20 worden goudvissen gebruikt als model voor menselijke zenuwen omspoeld door een lokaal-anestheticum, o.a. ter bepaling van dosis-response curven. Het doel van deze metingen is het onderzoek naar de relatie tussen fysisch-chemische eigenschappen van lokaal-anesthetica en het farmacokinetisch gedrag (inwas-/uitwassnelheid) resp. het farmacodynamisch gedrag (soort en sterkte van het effect). Met de uiteindelijk te verkrijgen resultaten hoopt men de langdurige werking en sterkte van de BAB-suspensie te kunnen verklaren.

Er zal o.a. gekeken moeten worden welke metingen noodzakelijk zijn om het effect van het middel als functie van de tijd te kunnen bepalen, van welke stimuli hierbij gebruik gemaakt kan worden, op welke wijze deze stimuli aangeboden kunnen worden, wat het te verwachten effect van dit aanbieden is en tenslotte op welke wijze dit effect gemeten kan worden.

2 Beschrijving van de afstudeeropdracht

2.1 De aandachtspunten

In het Eindhovense Catharina Ziekenhuis wordt sinds 5 à 6 jaar onderzoek verricht naar een nieuw soort pijnstillers voor terminale kankerpatiënten. Het middel, dat epiduraal (in de ruggesgraat buiten het harde ruggemergvlies) toegediend wordt, heeft een lange werkingsduur (ordegrootte 4 tot 6 maanden) en lijkt weinig dan wel geen bijwerkingen te vertonen (lit. 1-10). Het precieze werkingsmechanisme van het middel is nog niet bekend; het effect na toediening is variabel. De respons van organismen (waaronder mensen) op een farmacon is echter vaak variabel: niet iedereen reageert op dezelfde manier. Een aantal variabelen van anestheserende middelen zijn:

- het verloop van de intensiteit van het effect als functie van de dosis,
- het maximaal te behalen effect,
- de lethale dosis,
- het verloop van het effect als functie van de tijd,
- de verhouding tussen gewenst effect en bijwerking bij een bepaalde dosis.

Om deze grootheden voor een nieuw farmacon te bepalen maakt men al langere tijd gebruik van de goudvis als model. De geneesmiddelen kunnen in dit geval simpelweg aan het zwemwater toegevoegd worden. Een goede maat voor het effect van het farmacon bij deze dieren is naast het tijdstip waarop de dood intreedt de zogenaamde 'overturn time'. Dit is de tijd die verstrijkt totdat de vis zich niet meer zelfstandig op kan richten nadat hij met een staafje op zijn zijde gekanteld is. We spreken hier van goed definieerbare farmacologische eindpunten. Wil men echter naast deze conventionele meetmethoden de in- en uitwerkings-karakteristiek bepalen (het kinetisch gedrag), bijvoorbeeld om te kunnen zien of de pijnstillende werking nog afdoende is, dan zal men tussentijdse metingen moeten verrichten. Omdat dit een tijdrovend proces is en omdat voor statistisch verantwoorde resultaten er bij meerdere vissen gemeten zal moeten worden, wil men dit proces automatiseren in een meetsysteem.

Hiertoe zijn de volgende aandachtspunten opgesteld:

- welke metingen zijn nodig om het effect van het middel als functie van de tijd te bepalen,
- van welke stimuli kan hierbij gebruik worden gemaakt,
- op welke wijze kunnen deze stimuli aangeboden worden,
- wat is het effect van dit aanbieden,
- op welke wijze kan dit effect gemeten worden.

Het vinden van een antwoord op deze vragen en het uitvoeren van enige dierproeven zal een drieledig resultaat tot gevolg hebben:

- een meetopstelling waarmee de reactie van vissen op geneesmiddelen (e.g. lokaal-anesthetica en opiaten) gemeten kan worden,
- mogelijkheden om meer omtrent de werking van deze specifieke pijnstillers te weten te komen,
- uitsluitsel omtrent de plaats die dit middel inneemt temidden van de overige anestheserende middelen (structuur-activiteits relatie).

In het volgende hoofdstuk zal bekeken worden wat we ons moeten voorstellen bij het verschijnsel pijn en haar bestrijding. Vervolgens wordt besproken hoe we deze begrippen kunnen hanteren met betrekking tot vissen.

3 Pijn en het meten van pijn bij vissen

3.1.1 Het verschijnsel pijn

Het begrip pijn is moeilijk te definiëren. Het betreft een gewaarwording die meestal het gevolg is van beschadiging van weefsel, maar waarbij psychische factoren een belangrijke rol spelen. Pijn is op te vatten als een waarschuwingssignaal, veroorzaakt door elk soort prikkel, mits deze maar sterk genoeg is. Mensen ervaren pijn doordat pijnprikkels door sensorische zenuwen via het ruggemerg naar de pijncentra in de hersenen getransporteerd worden waar de registratie, de gewaarwording en de reactie op de pijn plaats vindt.

3.1.2 De bestrijding van pijn

Bestrijding van pijn vindt plaats door middel van analgesie en anesthesie. We zullen deze begrippen afzonderlijk behandelen.

Analgesie is een toestand waarbij het pijngevoel verminderd aanwezig is, terwijl het bewustzijn intact is. Een ideaal analgeticum bezit de volgende eigenschappen (lit. 16):

- de pijngewaarwording is verminderd,
- de werking is onafhankelijk van de wijze van toediening. Dit kan zijn oraal (via de mond) of parenteraal (niet via het mond-maagdarmkanaal),
- de werking dient doeltreffend te zijn voor elke leeftijdsgroepering, bij alle stoornissen die pijn veroorzaken en bij alle pijnniveaus,
- het heeft geen bijwerkingen,
- het vertoont geen tolerantie en brengt geen afhankelijkheid teweeg.

Het volmaakte analgeticum bestaat nog niet, maar we beschikken over groot aantal verbindingen met een uiteenlopende sterkte en duur van werking, hetgeen een nuttige verzameling farmacologische methoden ter verlichting van pijn oplevert. Er wordt gebruik gemaakt van twee soorten analgetica, te weten de perifeer aangrijpende analgetica, ter bestrijding van milde en matige pijn en indien dit niet meer afdoende werkt, de centraal aangrijpende analgetica. In het eerste geval grijpt het middel bijvoorbeeld in in de stofwisseling van perifeer pijnveroorzakende stoffen en in het laatste geval wordt op centraal niveau de waarneming van en de emotionele reactie op pijn beïnvloed. Toediening van deze stoffen geschiedt door middel van een injectie, oraal of rectaal. In het geval van de behandeling van matige tot hevige pijn voldoen de analgetica niet meer. De mogelijke bijwerkingen van het middel bij langdurig gebruik kunnen door patiënten als uiterst vervelend ervaren worden, terwijl er bovendien een afhankelijkheid en tolerantie met betrekking tot het middel teweeggebracht kan worden. Bestrijding van pijn zal dus op een andere manier moeten geschieden.

Het medisch specialisme dat zich bezig houdt met de opheffing van (pijn)gevoelens

is de anesthesiologie. Zo spreekt men van anesthesie als er een toestand van gevoelloosheid is ontstaan met een al dan niet verminderd bewustzijn. Men onderscheidt algemene anesthesie, waarbij niet alleen het gevoel maar ook het bewustzijn wordt uitgeschakeld, en lokale- of regionale anesthesie, waarbij een deel van het lichaam tijdelijk gevoelloos gemaakt is. Middelen die leiden tot een toestand van algemene anesthesie worden meestal intraveneus (via een ader) toegediend of, indien gasvormig, geïnhaleerd. Uiteindelijk werken ze in op de zenuwcellen van de hersenen. Lokaal-anesthetica verminderen de geleiding van impulsen door zenuwvezels doordat ze de ionenstroom door het zenuwmembraan belemmeren.

De lokale anesthesie wordt onderverdeeld in:

- oppervlakte-anesthesie, waarbij van buiten af door middel van bijvoorbeeld een spray of zalf de huid of slijmvliezen verdoofd wordt,
- infiltratie-anesthesie, waarbij op bepaalde plaatsen een injectie wordt gegeven zodat er plaatselijk een verdoving ontstaat,
- en geleidings-anesthesie, waarbij de prikkelgeleiding in sensorische zenuwen en zenuwketens geblokkeerd wordt. De blokkade kan zowel binnen als buiten de wervelkolom tot stand gebracht worden.

Een lokaal-anestheticum dat geïnjecteerd wordt dient te voldoen aan de volgende eisen (lit. 17):

- de weefsels waarin de stof wordt geïnjecteerd mogen niet geïrriteerd raken,
- de verdoving dient teweeg gebracht worden zonder blijvende schade te berokkenen aan de zenuwen die daardoor geblokkeerd worden,
- de toxiciteit (giftigheid) moet laag zijn,
- de verdovende werking dient snel in te treden en lang genoeg aan te houden,
- het middel dient oplosbaar te zijn om het in te kunnen spuiten,
- de oplossing moet tijdens sterilisatie chemisch stabiel zijn; de stof mag niet ontleden.

Bij de behandeling van kankerpatienten neemt pijnbestrijding een belangrijke plaats in. Kanker is een ziekte die zich kenmerkt door een woekering van cellen. Hoewel sommige vormen van kanker in feite pijnloos zijn, kunnen er toch hevige pijnen

ontstaan doordat de woekeringen zenuwen beknellen. Behandelingsmethoden zijn het oraal toedienen van analgetica, het continu of met tussenpozen intraveneus, epiduraal (buiten het harde ruggemervlies), of spinaal (binnen het ruggemervlies) toedienen van opiaten (krachtige pijnstillende middelen op basis van of gelijkend op morfine) en/of lokaal-anesthetica. Als laatste alternatief is er de mogelijkheid tot het aanbrengen van een epiduraal of intrathecaal (in het ruggemerg zelf) neurolytisch (zenuwweefsel vernietigend) blok. Men gebruikt hiervoor stoffen zoals ethanol (C_2H_5OH) of fenol (carbolzuur).

Recent is door een nieuwe formulering van de toedieningsvorm van een al lang bekend lokaal-anestheticum een nieuwe behandelingswijze in de belangstelling gekomen. Het betreft hier het epiduraal toedienen van het lokaal-anestheticum butyl-p-aminobenzoaat (lit. 11-15,18).

3.2 Butyl-p-aminobenzoaat: BAB

Shulman en Korsten et al (lit. 1-15,18) brengen verslag uit omtrent het epiduraal toedienen van een 10% butyl-p-aminobenzoaat-suspensie (een suspensie is een vloeistof waarin een vaste stof in zeer kleine deeltjes verdeeld zweeft), een lokaal-anestheticum dat slechts zeer beperkt in water oplost (ongeveer 140mg/l) en een zeer lage pK bezit (2.52). Eenmaal geïnjecteerd gedraagt de suspensie zich als een depot van onopgelost inactief butyl-p-aminobenzoaat, van waaruit voortdurend opgelost en dus actief butyl-p-aminobenzoaat vrijkomt. Dit resulteert in een effectieve analgesie die verscheidene maanden kan aanhouden. Daarbij worden de motorische functies niet aangetast. Een precieze verklaring voor dit laatste gegeven is nog niet voorhanden. Het blijkt echter zeer moeilijk te zijn om een stabiele suspensie te krijgen die aan de in de vorige paragraaf opgestelde eisen met betrekking tot een lokaal-anestheticum voldoet. Binnen het Catharina ziekenhuis in Eindhoven (lit. 1) is een procédé ontwikkeld om een stabiele, steriele en injecteerbare suspensie te verkrijgen. Deze suspensie is inmiddels met succes aan proefdieren (honden) en mensen toegediend (lit. 2,14,15).

Aansluitend onderzoek is echter nodig om een uitspraak te kunnen doen omtrent de distributie van BAB binnen het zenuwweefsel nadat het epiduraal is ingebracht en om de toxiciteit, het neurolytisch effect en de regeneratie (herstel) van dit zenuw-

weefsel beter te kunnen te karakteriseren.

3.3 De vis als proefdier

Binnen een breed scala van onderzoeksgebieden wordt gebruikt gemaakt van vissen (lit. 19).

De vis ontwikkelde zich 500 miljoen jaar geleden en vandaag de dag zijn er meer vissoorten bekend dan al de andere soorten gewervelde dieren bij elkaar. Onderzoek met behulp van vissen levert een schat aan gegevens op die gebruikt worden binnen het onderzoek met betrekking tot andere gewervelde dieren. Zo heeft de vis binnen de ontwikkeling van o.a. de embryologie, neurobiologie en endocrinologie een belangrijke rol gespeeld. Praktische eigenschappen die pleiten voor het gebruik van deze dieren binnen de verschillende onderzoeksgebieden zijn o.a. de robuustheid en het goedkoop en gemakkelijk verkrijgbaar zijn. De vissen kunnen bovendien gebruikt worden binnen relatief eenvoudige opstellingen waarvan de parameters binnen de experimenten gemakkelijk te beheersen zijn.

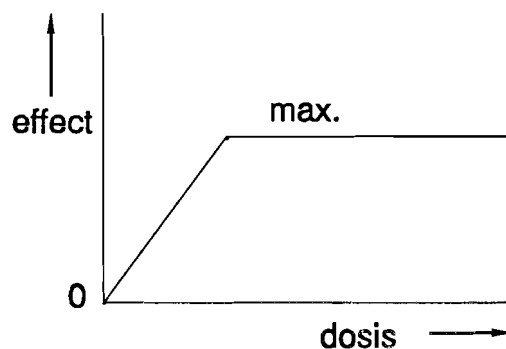
Uit de literatuur blijkt dat de goudvis (*carassius auratus*) dienst kan doen als biologisch testsysteem ter bepaling van de structuur-werkzaamheidsrelatie van geneesmiddelen (lit. 20). Bij het blootstellen van goudvissen aan een lokaal-anestheticum kunnen er twee goed definieerbare farmacologische eindpunten bepaald worden (lit. 21). Respectievelijk zijn dit de tijd verstreken totdat de vis niet meer de mogelijkheid bezit om zichzelf op te richten nadat hij met een staafje op zijn zijde gekanteld is, en de tijd verstreken totdat er geen vin- en kieuwbeweging meer waar te nemen is en de dood zou zijn ingetreden. Men gaat er van uit dat de snelheid van inwas evenredig is met de concentratie van het middel in het aquarium en dat het hier een passief systeem betreft. De 'overturn time' is onafhankelijk van de grootte van de vis mits het volume van het zwemwater ongeveer 50 maal zo groot is als het volume van de vis zelf (lit. 22). Het model gaat uit van vet, te weten de vis, en waterige oplossingen, het geneesmiddel, waarin de vis zwemt en tenslotte mee in 'evenwicht' komt. Als analogon binnen het onderzoek naar BAB zien we de zenuwvezels gelegen in de liquor (hersenen- en ruggemergvloeistof) waarin het anestheticum opgelost is. Zo lijkt er een verband te bestaan tussen de minimaal effectieve concentratie farmacon (MEC waarde) benodigd in het aquarium en de minimale

blocking concentratie van hetzelfde anestheticum voor geïsoleerde zenuw- en spierbundels (lit. 23).

Het gedrag van de vis wordt nu bepaald door de fysisch-chemische eigenschappen van het middel, in ons geval dus een lokaal-anestheticum.

3.4 De invloed van het farmacon en de bepaling hiervan

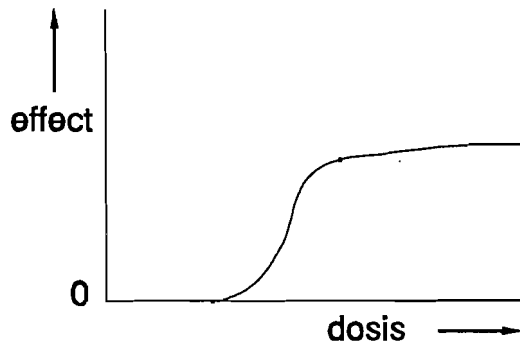
In het ideale geval zal de invloed van een lokaal-anestheticum op de gewaarwording van pijn een verloop hebben zoals weergegeven in figuur 1 (statische karakteristiek):



figuur 1: het ideale effect van een lokaal-anestheticum

Bij een toenemende dosis zal het anestheserend effect toenemen volgens een lineair verband om vervolgens een verzadigingspunt bereiken. Een dosis groter dan de dosis waarbij een maximaal anestheserend effect bereikt wordt, zal dit effect niet meer doen toenemen.

In de praktijk is echter geconstateerd dat er vaak sprake is van een drempelwaarde die overschreden dient te worden, alvorens er sprake is van enig effect (zie figuur 2).



figuur 2: mogelijk effect van een lokaal-anestheticum

Het verdere verloop bij hogere concentraties zal niet lineair zijn en bij een te hoge dosis kan er een gevaarlijke situatie voor de patiënt ontstaan omdat het effect van het farmacon groter dan gewenst wordt.

Als we iets willen weten omtrent de in- en uitwerkings-karakteristiek van een bepaald anestheticum, dit is het effect als functie van de tijd, dan zullen nu de dynamische karakteristieken moeten bekijken, bijvoorbeeld de impulsrespons (zie figuur 3),



figuur 3: een mogelijke impulsrespons

en het effect van een dubbele staprespons (zie figuur 4).



figuur 4: een mogelijke dubbele staprespons

Het idee is nu om de vissen aan verschillende concentraties BAB en andere lokaal-anesthetica bloot te stellen en te kijken hoe de aan een bepaalde stimulus gekoppelde drempelwaarde verandert als functie van de tijd. Met deze drempelwaarde wordt die waarde bedoeld, waarboven de stimulus een eenduidig waar te nemen respons opwekt. Samenvattend kunnen we op de volgende manier te werk gaan:

Bepaling van de statische karakteristiek:

- men brengt een bepaalde concentratie van de stof aan in het aquarium en wacht totdat er een evenwichtstoestand opgetreden is waarna men een meting doet. Vervolgens wordt de concentratie verhoogd waarna men de procedure herhaalt,

Bepaling van de dynamische karakteristiek:

- men brengt een bepaalde concentratie van de stof aan in het aquarium en doet met regelmatige tussenpozen een meting naar het verloop van de drempelwaarde als functie van de tijd,
- nadat de vis uit de bak met hierin opgelost een anestheserend middel gehaald is, wordt hij in een bak met "schoon" water geplaatst waarna men wederom met regelmatige tussenpozen metingen doet.

Er zal nu gekeken moeten worden welke prikkel geschikt is om de bovenstaande metingen uit te voeren.

3.5 De gebruikte prikkel en het effect van het aanbieden

Ter bepaling van de dynamische karakteristieken willen we meten aan gedragingen van de vis die, als gevolg van het blootgesteld zijn aan lokaal-anesthetica, bij een veranderende intensiteit van de stimulus opgewekt zullen worden.

Met betrekking tot het manipuleren van goudvissen kan een keuze gemaakt worden uit de volgende soorten prikkels: (lit. 24):

- mechanische prikkels inwerkend op de tastzin,
- visuele prikkels inwerkend op het zien,
- biochemische prikkels inwerkend op het proeven en ruiken,
- akoestische prikkels inwerkend op het gehoor,
- thermische prikkels inwerkend op het ervaren van de temperatuur
- elektrische prikkels leidend tot depolarisatie van cellen (schrik, pijn).

In het geval van de eerste vijf soorten prikkels zullen deze eerst door middel van zintuigen waargenomen moeten worden waarna er eventueel een reactie kan volgen. De elektrische prikkels inwerkend op het zenuw- en spierweefsel van de vis hebben direct een toestand van pijn en schrik tot gevolg hetgeen op te maken is uit de resulterende gedragingen. De vis kan zich in dit geval op geen enkele wijze aan de toegediende prikkel onttrekken.

Indien er bij mensen aan het optreden van pijn gemeten wordt, dient de toe te dienen prikkel de volgende twee responsniveaus op te kunnen wekken (lit. 25).

- er is pijn,
- er is ondraaglijke pijn (plafond).

We kunnen enige eisen op een rijtje zetten waaraan de prikkel moet voldoen om als ideaal beschouwd te kunnen worden. De prikkel:

- bezit een toereikend intensiteitsbereik om de niveaus aan te tonen,
- is nauwkeurig reproduceerbaar,
- is gemakkelijk en veilig toe te dienen en veroorzaakt geen omvangrijke weefselbeschadiging (is reversibel),

- maakt het de proefpersoon na instructie mogelijk om de intensiteit van de prikkel te beoordelen.

In het geval van een goudvis kunnen we spreken van de gewaarwording van het aanwezig zijn van een prikkel en de reactie hierop. De respons van de vis zal een "vluchtgedrag" zijn waarmee hij aan de pijnprikkel zal proberen te ontkomen. Een willekeurige andere pijnprikkel zal het zelfde vluchtgedrag moeten kunnen opwekken. Voor een ideale prikkel geldt nu dat:

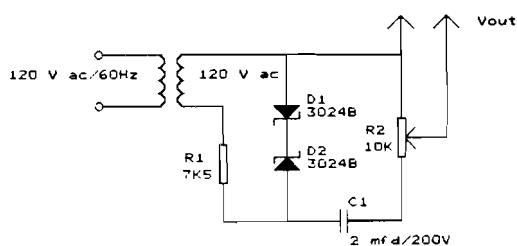
- de intensiteit de eerste drempelwaarde dient te overschrijden,
- hij reproduceerbaar dient te zijn,
- hij gemakkelijk en veilig toe te dienen is zonder omvangrijke weefselbeschadiging te veroorzaken,
- hij na het overschrijden van de eerste drempelwaarde een duidelijk waarneembare reactie bij de vis teweeg brengt.

Is het gebruik van een pijnprikkel vereist, bijvoorbeeld binnen de "escape and avoidance" experimenten, dan maakt men gebruik van de in de praktijk gemakkelijk toe te dienen elektrische prikkels. Binnen deze experimenten kan de vis nu door te reageren op een verandering in zijn omgeving, het ontstaan van een pijnprikkel voorkomen (lit. 26). Er wordt hier gebruik gemaakt van het feit dat de goudvis net zoals de meer complexe gewervelde dieren gedragingen herhaalt die leiden tot een "beloning" en gedragingen uit de weg gaat die een onprettige prikkel zullen opleveren, of aan deze prikkel zal proberen te ontsnappen. De intensiteit van de prikkel hoeft niet precies reproduceerbaar te zijn, mits zij zich maar boven een bepaalde drempelwaarde bevindt zodat de vis altijd aan de prikkel zal proberen te ontkomen. In dit geval voldoen twee plaalectroden parallel ten opzichte van elkaar opgesteld in het water waartussen de vis zich bevindt.

Zoals Woodward (lit. 27) heeft aangetoond is de intensiteit van de stimulus afhankelijk van de spanningsval over het lichaam. Een veranderende positie van de vis ten opzichte van de elektroden zorgt er nu voor dat er geen reproduceerbare prikkel afgegeven kan worden. Een vis is namelijk langer dan dat hij hoog en breed is. Als nu de drempelwaarde te allen tijde overschreden wordt zal de vis op de prikkels reageren. In het geval van het maken van een reproduceerbare prikkel zouden er meerdere elektroden in het water geplaatst kunnen worden waartussen het veld geschakeld wordt. Dit blijkt in de praktijk echter niet te voldoen omdat de weerstand van de elektroden veel kleiner is dan die van het water, zodat de niet

gebruikte elektroden de meeste stroom zullen weg trekken. Een andere optie is het op de plaats houden van de vis zodat zijn oriëntatie ten opzichte van de plaat-elektroden niet verandert. De vis kan bijvoorbeeld in een kleine kamer binnen zijn oorspronkelijke behuizing geplaatst worden. Tijdens het toedienen van een prikkel zal de vis, zoals vermeld, deze trachten te ontvluchten. Als hij in dit geval geen bewegingsvrijheid heeft zal de vis zich kunnen verwonden.

Een manier die het mogelijk maakt om toch een reproduceerbare elektrische prikkel toe te kunnen dienen is het plaatsen van een prikkel-elektrode tegen de rugspier bij de staart van de vis en het plaatsen van een aard-elektrode op de bodem van het aquarium volgens de methode van Jansen en Greene (lit. 28). Hierbij wordt gebruik gemaakt van de schakeling weergegeven in figuur 5.



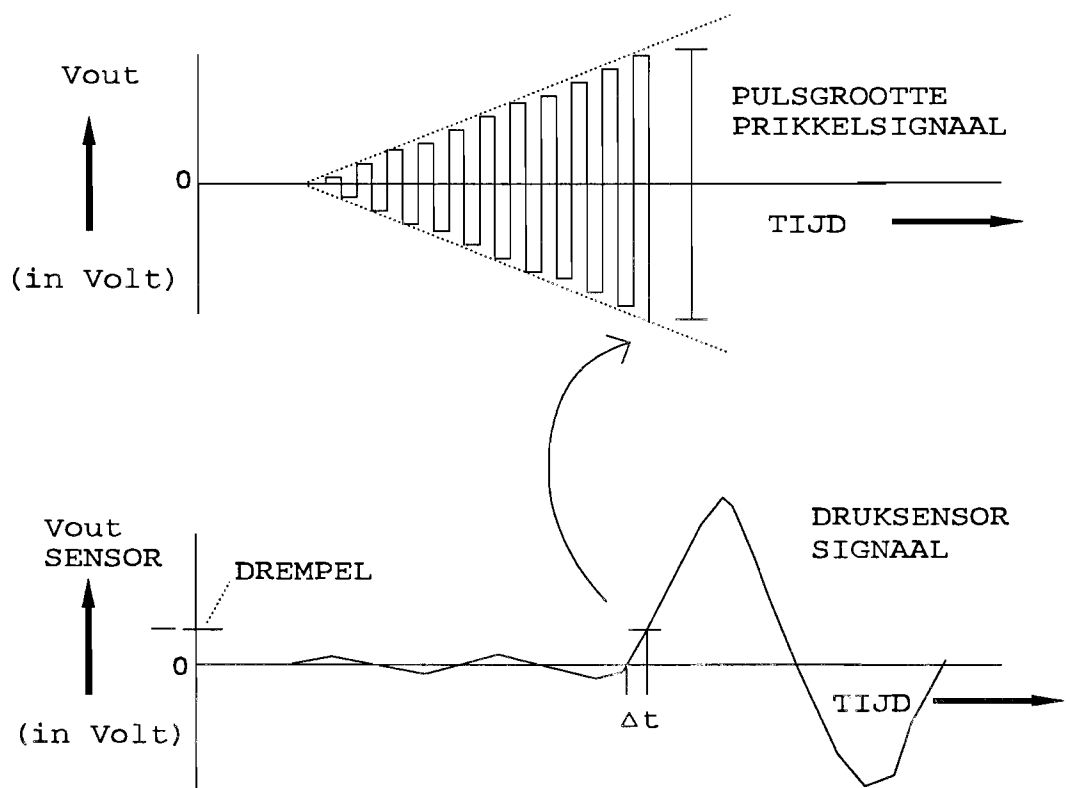
figuur 5: gebruikte schakeling door Jansen en Greene

Het resultaat is een blokgolfvormig prikkelsignaal met een pulsgrootte van maximaal 30 Volt en een frequentie van 60 Hz. Jansen en Greene claimen nu een nauwkeurig reproduceerbare en in te stellen prikkel te kunnen toedienen die zodra hij een bepaalde drempelwaarde overschreden heeft, zal leiden tot een "opgewonden zwemgedrag" van de vis, bestaande uit een duidelijk waarneembare verhoging in amplitude en frequentie van de vin- en kieuwbeweging. Een zogenaamde C-escape gaat aan dit alles vooraf, waarbij de vis door een felle beweging van zijn staart zijwaarts wegschiet. De naam C-escape is afgeleid van de vorm die het lichaam van de vis aanneemt tijdens deze actie.

3.6 De meetprocedure

Resumerend komen we ter bepaling van de in- en uitwas-karakteristiek van het in het zwemwater opgeloste middel tot het volgende procédé.

De meting begint door de vis in een aquarium te zetten met hierin opgelost een middel met lokaal-anesthetische eigenschappen. Op gezette tijden wordt er volgens de methode van Jansen en Greene (paragraaf 3.5) een blokgolfvormige spanning aangeboden waarvan de amplitude in de tijd toeneemt. Dit zal zodra de pulsgrootte een bepaalde drempelwaarde overschreden heeft, leiden tot een kenmerkende C-escape welke gedetecteerd dient te worden (zie figuur 6).



figuur 6: prikkelsignaal met bijbehorend druksensorsignaal

Op dit moment moeten zowel de huidige pulsgrootte als de verstreken tijd bepaald en opgeslagen worden. Na verloop van tijd wordt de vis in een bak met schoon water gezet en doorloopt men nogmaals de gehele procedure.

In het volgende hoofdstuk wordt besproken op welke wijze de prikkel gemaakt en aangeboden is en hoe de respons van de vis op deze prikkel gemeten wordt.

4 De hardware

4.1 De Lab-Master

Omdat de literatuur geen concrete aanwijzingen bood omtrent het automatisch registreren van de in- en uitwas-karakteristiek, is er gekozen voor een zo flexibel mogelijke opzet van het meetsysteem.

Het hart van het systeem wordt gevormd door een XT-computer met hierin opgenomen een 'Lab Master DMA' kaart. Deze Lab-Master aangesloten op de DATA-bus van de computer beschikt over:

- twee 12-bit D/A converters, $V_{\max} \pm 10$ Volt,
- een 16 kanaals A/D converter, $V_{\max} \pm 10$ Volt,
- vijf timers,
- 16 digitale I/O poorten,

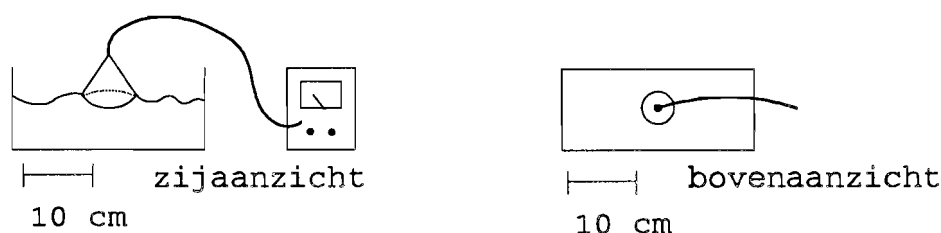
welke allemaal op veelzijdige wijze te gebruiken zijn. Met behulp van jumpers worden er basis-instellingen gemaakt waarna het geheel op software-matige wijze te besturen is (zie bijlage 1).

Binnen de gerealiseerde schakeling wordt gebruik gemaakt van de mogelijkheid om met behulp van een van de timers een interrupt te genereren. Met behulp van een interrupt routine zal op gezette tijden één van de twee D/A converters aangestuurd moeten worden zodat er een reproduceerbare stimulus ontstaat. Het gekozen tijdstip waarop de interrupt verschijnt en de data die verzonden wordt maken het mogelijk om een blokgolfvormige puls te maken waarvan de frekwentie en amplitude software-matig te besturen zijn. Met behulp van de aanwezige A/D converter wordt

vervolgens op het moment van reageren de pulsgrootte bepaald. Het detecteren van deze reactie geschiedt door middel van het meten van de drukverandering die veroorzaakt wordt door de golfbeweging van het water.

4.2 Drukmetingen

Voor het bepalen van de reactie van de vis wordt gebruik gemaakt van een voorhanden zijnde 'Pneumotachograph', een apparaat waarmee een (gas)flow gemeten kan worden. In bijlage 2 zien we de relatie tussen de gemeten druk en de uitgangsspanning van deze meter. Hierbij valt op te merken dat zeer geringe drukveranderingen (grootteorde van enkele Pascal) reeds te detecteren zijn. Via een luchtkoppeling met het wateroppervlak worden bewegingen geregistreerd door de optredende drukverschillen te meten, die ontstaan doordat de vis reageert op de prikkeling (figuur 7).

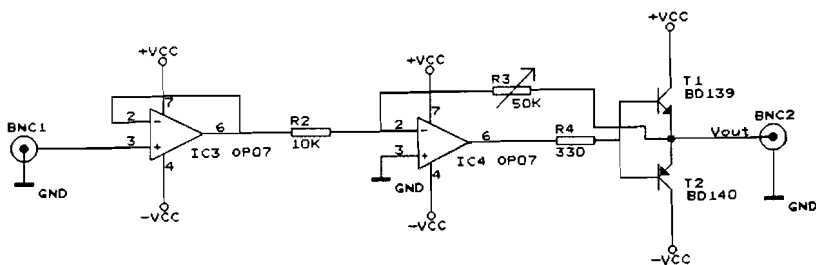


figuur 7: configuratie van druksensor met opnemer

In het midden van de experimenteerbak is hiertoe een trechter geplaatst die met behulp van een flexibel slangetje verbonden is met de druksensor. Omdat deze sensor relatieve drukverschillen meet, is er gezorgd voor een ontluchtingsmogelijkheid zodat het waterniveau zich binnen de opnemer kan nivelleren en de afgegeven spanning in het geval van rust nul Volt bedraagt. Met behulp van de A/D converter kan bepaald worden of de reactie van de vis van voldoende intensiteit is geweest (de sample-frekwentie is twee maal zo hoog als de gebruikte frekwentie van de prikkel). Indien dit het geval is moeten nu de noodzakelijke metingen uitgevoerd worden. Om de juiste pulsgrootte te verkrijgen ($V_{it}=30$ Volt maximaal) is er een versterkerschakeling gebouwd die in de volgende paragraaf besproken zal worden.

4.3 Het maken van de elektrische prikkel

Omdat de maximale uitgangsspanning van de D/A converter ± 10 Volt bedraagt en er voor een pulsgrootte van 30 Volt een spanning van ± 15 Volt vereist is, zal het signaal versterkt moeten worden. Hiertoe maken we gebruik van de versterkerschakeling afgebeeld in figuur 8.

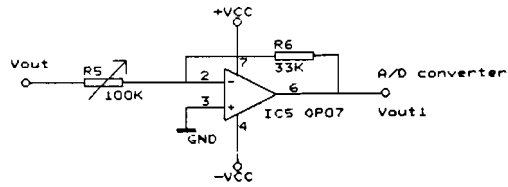


figuur 8: de versterker

De gebruikte OPAMPS zijn instrumentation OPAMPS. Zij vereisen geen externe componenten om de offset weg te regelen en hebben een lage drift en temperatuur-gevoeligheid.

Hoewel met behulp van de ingestelde versterkingsfactor en de uitgangsspanning van de D/A converter de uitgangsspanning berekend kan worden, is er toch gekozen voor het daadwerkelijke meten van deze spanning. Deze keuze is gemaakt omdat ten gevolge van temperatuur schommelingen de versterkingsfactor enigszins kan variëren en omdat er een kortsluiting op kan treden als de prikkelelektrode de aardelektrode onder in de bak zou raken. In geval van het meten van het uitgangssignaal wordt dit nu onmiddellijk geregistreerd.

De aanwezige 12-bit A/D converter met een maximale ingangsspanning van ± 10 Volt, zorgt er voor dat het te meten prikkel signaal verzwakt moet worden. Hiertoe volstaat de volgende schakeling (figuur 9).



figuur 9: de aanpassing van het te meten signaal

In bijlage 3 is de totale schakeling inclusief voeding weergegeven.

Daar we te maken hebben met een 12-bit D/A converter en omdat de maximale pulsgrootte 30 Volt top-top bedraagt is de minimale stapgrootte waarmee het prikkelsignaal in amplitude kan toenemen groter dan die van de D/A converter zelf, namelijk:

$$30V/4096 = 7,3 \text{ mV.} \quad (1)$$

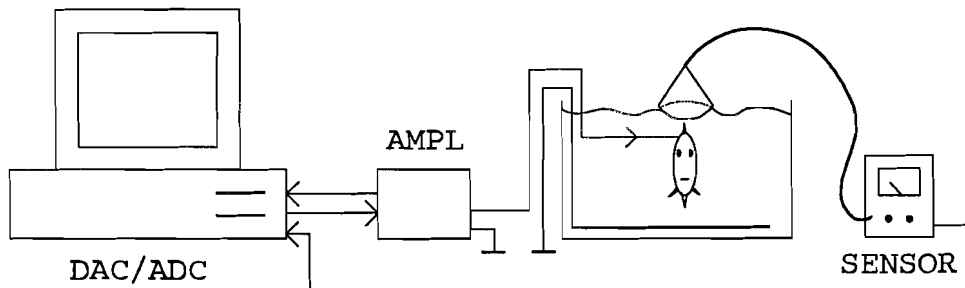
Het te meten prikkelsignaal dat met een factor twee verzwakt wordt samen met het feit dat we geïnteresseerd zijn in de pulsgrootte (top-top waarde) zorgen er voor dat we de gemeten waarde van de A/D converter met een factor 4 moeten vermenigvuldigen. Dit resulteert in een kwantisatie fout van:

$$20V/4096 \times 2 = 0,01 \text{ Volt.} \quad (2)$$

In de volgende paragraaf is de gerealiseerde opstelling in zijn geheel te zien.

4.4 De opstelling

Het meetsysteem, bestaande uit de computer met Lab-Master-kaart, de druksensor met opnemer en de gerealiseerde schakeling, ziet er nu als volgt uit (figuur 10):



figuur 10: het meetsysteem

In bijlage 4 is weergegeven hoe de onderlinge componenten met elkaar verbonden zijn.

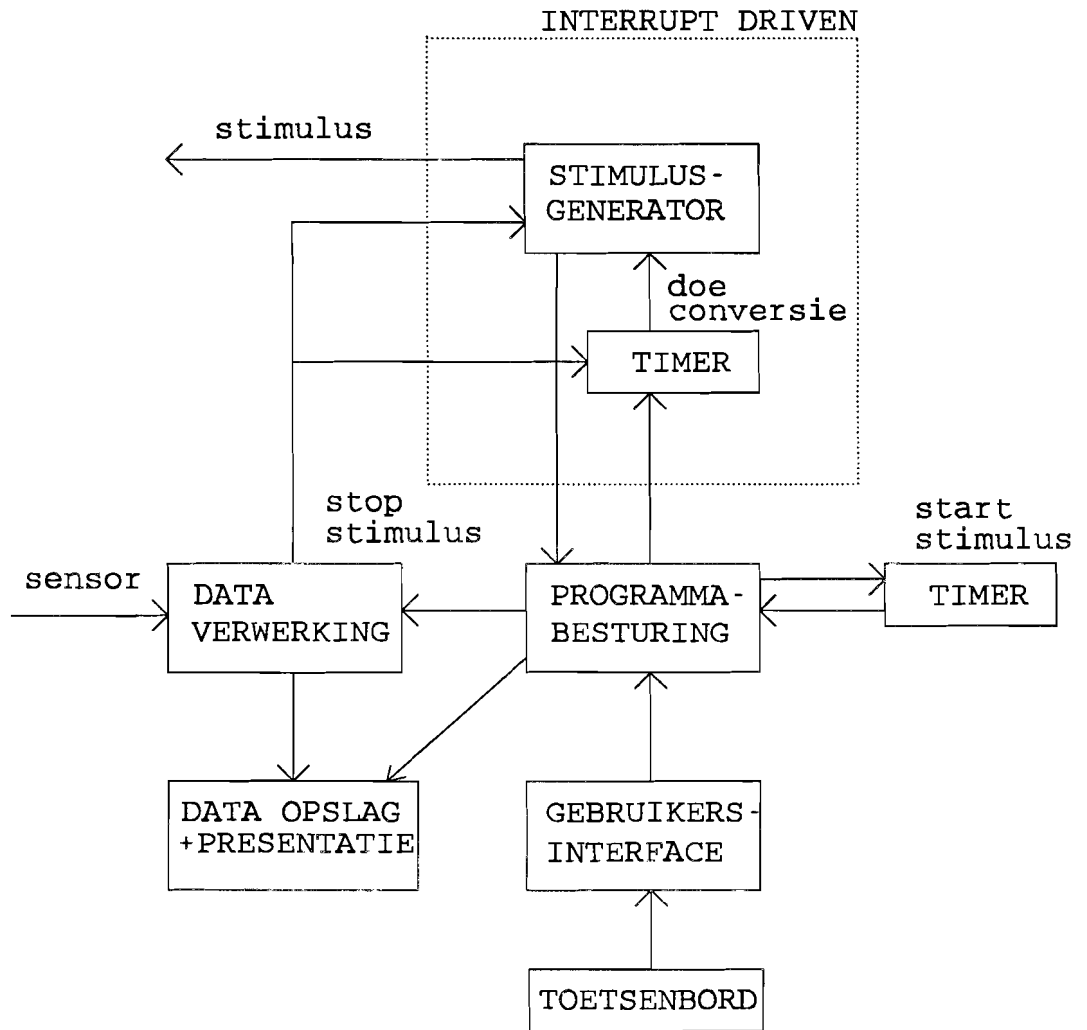
Voor de besturing van dit geheel is een programma geschreven in Turbo Pascal dat in hoofdstuk 5, de software, besproken wordt.

5 De software

De geschreven software is in te zien bij dr.ir. J.A. Blom, vakgroep Medische Elektrotechniek (EME) van de faculteit Elektrotechniek van de TUE.

5.1 Het hoofdprogramma

Figuur 11 toont het blokschema van het hoofdprogramma STIM_FISH dat geschreven is in Turbo Pascal.



figuur 11:blokschema van het hoofdprogramma STIM_FISH

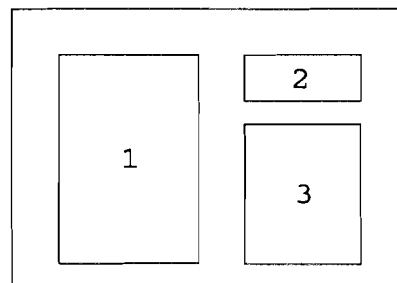
Met behulp van het toetsen bord kan de gebruiker het meetsysteem naar wens instellen. De programma-besturing ziet er op toe dat de stimuli, indien gewenst, periodiek verschijnen. Hiertoe wordt er gebruik gemaakt van een interrupt routine (zie paragraaf 5.2). Indien noodzakelijk wordt het signaal van de druksensor vergeleken met de ingestelde drempelwaarde waarna er eventueel meetwaarden worden opgeslagen en de stimulus wordt afgeschakeld.

Om de verschillende opties die met het toetsenbord in te stellen zijn te bekijken zullen we de verschillende toetsen met hun betekenissen afzonderlijk behandelen.

- Toets 'B' schrijft de data van de huidige meting opgeslagen in een buffer naar een te benoemen file weg.
- Toets 'D' stelt de drempelwaarde van de druksensor in. Als de druksensor een uitgangsspanning groter dan deze drempelwaarde afgeeft, wordt de reactie van de vis beschouwd als een te detecteren respons.
- Toets 'E' stopt het programma.
- Toets 'F' stelt de gewenste frekwentie van het blokgolfvormige prikkelsignaal in.
- Toets 'G' geeft de belangrijkste gegevens van de huidige meting weer. Dit zijn de gekozen frekwentie, de ingestelde drempelwaarde van de druksensor en de maximale pulsgrootte van het prikkelsignaal.
- Toets 'H' activeert de helpfunctie waar de betekenis van de gedefinieerde toetsen beschreven wordt.
- Toets 'M' biedt de mogelijkheid om met regelmatige tussenpozen een prikkelsignaal te genereren en deze aan de vis aan te bieden zodat er geheel automatisch gemeten kan worden.
- Toets 'P' visualiseert de meetgegevens door deze in een grafiek op het beeldscherm te plaatsen.
- Toets 'R' genereert (restart) een extra prikkel. Er wordt een extra puls gestart zonder dat de verstreken tijdsduur gereset en het buffer geleegd wordt. Als het programma niet automatisch prikkels genereert dan kan met behulp van deze toets op willekeurige tijdstippen een prikkelsignaal aangeboden worden.

- Toets 'S' start een prikkel en reset tegelijkertijd het buffer en het aanvangstijdstip van meten.
- Toets 'T' geeft het geregistreerde signaal van de druksensor weer.
- Toets 'V' stelt de maximale pulsgrootte van het prikkelsignaal in.
- Toets ' ' (spatie) meet de tijd die sinds de aanvang van het experiment verstreken is, de huidige pulsgrootte van het prikkelsignaal en reset de uitgangsspanning van de D/A converter.

Om de resultaten van de metingen en de instelling van het programma zichtbaar te maken, is het beeldscherm onderverdeeld in drie windows (figuur 12):



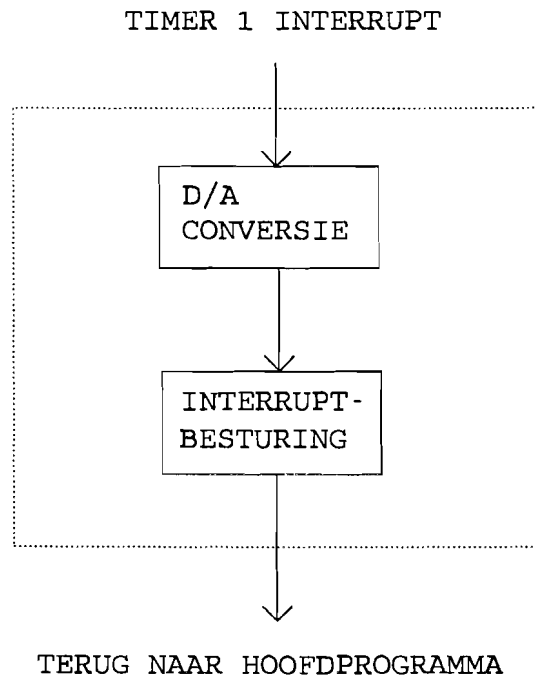
figuur 12: de beeldscherm opbouw

- window1, geeft de resultaten van de laatste metingen weer in tabelvorm,
- window2, toont de gegevens met betrekking tot de pulsgrootte en het al dan niet automatisch verschijnen van de puls,
- window3 maakt het mogelijk om gegevens met betrekking tot de instelling van het programma in te voeren en af te lezen.

In bijlage 5 zien we een voorbeeld van de beeldscherm opbouw.

5.2 De interrupt routine

Om met behulp van de D/A converter een blokgolfvormig prikkelsignaal te krijgen wordt er gebruik gemaakt van een interrupt routine. Hiertoe laten we timer 1 periodiek een 'Interrupt Request' genereren door de waarde, geladen in zijn 16-bit load register af te laten tellen tot nul met behulp van een 1 MHz kloksignaal. Indien de waarde nul bereikt is, wordt de via een jumper aangesloten 'Interrupt Request Line' van de computer hoog gemaakt, de interrupt routine aangeroepen en het load register van timer 1 opnieuw geladen. Op deze manier kan er om de maximaal 66 ms een 'Interrupt Request' gegenereerd worden om de A/D converter van data te voorzien. Omdat om een volledige periode van het prikkelsignaal te doorlopen de uitgangsspanning van teken moet wisselen, is er twee maal een interrupt nodig. De aldus minimaal te realiseren frekwentie bedraagt 7.6 Hz. Een maximaal haalbare frekwentie wordt gegeven door het feit dat de snelheid waarmee de computer de interrupt routine afhandelt niet oneindig klein is. Met behulp van de momenteel gebruikte computer kan een maximale frekwentie van ongeveer 4 kHz gerealiseerd worden (merk op dat hiervoor 8000 maal per seconde de interrupt routine afgehandeld moet worden).



figuur 13: de interrupt routine

Per keer dat de interrupt routine (figuur 13) wordt aangeroepen, bekijkt de interrupt-besturing of de waarde die naar de D/A converter wordt gestuurd aangepast moet worden. Dat deze waarde niet iedere keer als er een interrupt gegenereerd wordt en de uitgangsspanning van teken moet verwisselen opgehoogd moet worden, volgt uit het feit dat in dit geval een hogere prikkelfrequentie zal resulteren in een snellere stijging van amplitude van de puls. Wordt de prikkelfrequentie twee maal zo hoog gekozen dan zal de stijging in amplitude ook twee maal zo snel zijn. De routine zorgt er tevens voor, dat de puls onafhankelijk van de gekozen frequentie met een constante snelheid toeneemt in amplitude en zijn maximale waarde niet overschrijdt.

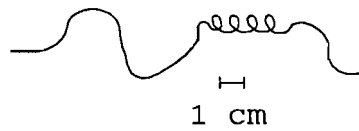
6 Enige dierproeven

Omdat aan de TUE het doen van dierproeven niet is toegestaan, is er binnen het Catharina ziekenhuis gekeken of het gerealiseerde meetsysteem in de praktijk zal voldoen. Hiertoe is toestemming verleend door de Ethische Toetsingscommissie voor Dierproeven Onderzoek, verbonden aan de faculteit Diergeneeskunde van de Rijks Universiteit Utrecht. Dr. L.J. Hellebrekers, Veterinair Anesthesioloog te Utrecht, treedt hierbij op als 'artikel 9 functionaris'.

6.1.1 De hartelektrode

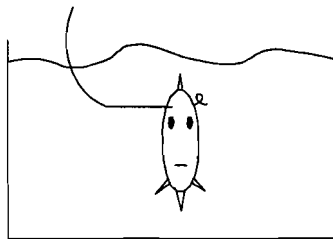
In het artikel van Jansen en Greene (lit. 28) wordt de gebruikte prikkelektrode tegen de vis aangehouden. Hier volstaat het gebruik van bijvoorbeeld een probe waarmee spanningen gemeten kunnen worden. Een zulk soort probe is afgezien van de geleidende metalen punt gemaakt van isolerend materiaal.

Omdat wij een automatisch meetsysteem willen ontwerpen voldoet deze methode van prikkelen niet. Er is in ons geval een continu contact tussen vis en elektrode noodzakelijk. Vanuit het ziekenhuis is de mogelijkheid geopperd om gebruik te maken van een hartelektrode. Deze elektrode ziet er als volgt uit figuur 14:



figuur 14: de hartelektrode

Zij bestaat uit een geïsoleerde geleidende draad met aan de ene kant een aansluiting en aan de andere kant de eigenlijke elektrode (3 mm lang, 1mm in diameter). Verbonden aan de elektrode zit een plastic spiraaltje met een naald. De naald kan nu door de rugspier van de vis gehaald worden, het spiraaltje wordt uitgerekt waarna de elektrode op zijn plaats gezet wordt en de naald wordt afgeknipt. Doordat het spiraaltje zich vervolgens weer opwikkelt, zit de elektrode gefixeerd in de rugspier van de vis (figuur 15).



figuur 15: de hartelektrode in de vis geplaatst

6.1.2 De eerste meetresultaten

Omdat we er zeker van willen zijn dat de vissen tijdens de metingen geen invloed ondervinden van eventueel aanwezige geneesmiddelen zijn de vissen zonder verdoving aangeprikt.

Bij het aanbieden van het prikkelsignaal blijkt dat indien de pulsgrootte te langzaam toeneemt dit de reproduceerbaarheid van moment van afslag niet ten goede komt. De vis vertoont niet meteen de gewenste respons maar maakt allereerst een paar minder heftige bewegingen met zijn staart. Stijgt de pulsgrootte te snel, dan zal dit

voor de vissen een onnodig onaangename sensatie opleveren en tevens ten koste gaan van de reproduceerbaarheid. Een respons, een fractie van een seconde te laat ingezet, zal nu ook een verschil in pulsgrootte op moment van afslag opleveren. Experimenteel blijkt dat een stijgsnelheid in pulsgrootte van ongeveer 0.66 Volt/s goed reproduceerbare resultaten oplevert.

In tabel 1 zien we de geregistreerde pulsgroottes op moment van afslag van een tiental metingen.

tabel 1: geregistreerde pulsgroottes op moment van respons

pulsgrootte (in Volt)
0.43
0.43
0.43
0.41
0.41
0.43
0.41
0.45
0.43
0.43

prikkelfrekwentie: 60 Hz
 tijdsduur tussen prikkels: 60 s
 drempelwaarde druksensor : 0.25 V

Jansen en Greene maken gebruik van een prikkel-frekwentie van 60 Hz omdat zij door de gekozen schakeling gebonden zijn aan de frekwentie van het lichtnet (zie paragraaf 3.5).

Omdat binnen het gerealiseerde meetsysteem het prikkelsignaal in te stellen is, is er gekeken of er een optimum te ontdekken valt met betrekking tot de te gebruiken prikkelfrekwentie. Tabel 2 laat de gemiddelde pulsgrootte van een tiental metingen

zien op moment van afslag, afhankelijk van de gekozen prikkelfrekwentie.

tabel 2: responswaarden als functie van de gekozen frekwentie

frekwentie (in Hz)	pulsgrootte (in Volt)	frekwentie (in Hz)	pulsgrootte (in Volt)
10	0.44	250	0.41
25	0.37	300	0.50
50	0.38	350	0.49
75	0.37	400	0.53
100	0.36	500	0.53
125	0.37	1000	0.73
150	0.38	2000	0.83
200	0.41		

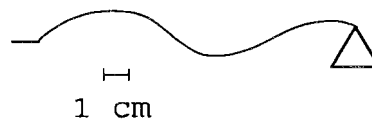
tijdsduur tussen metingen: 60s
drempelwaarde druksensor: 0.25 Volt
na 10 metingen, 5 minuten rust.

We zien dat zowel bij lagere als bij hogere frekwenties de gevoeligheid van de vis met betrekking tot de elektrische stimulus afneemt. Dit verloop komt overeen met de gevoeligheid van mensen voor spanningsprikkel van uiteenlopende frekwenties (lit. 29).

Voor de lage frekwentie van 10 Hz valt op te merken dat de vis heftig schokkende bewegingen maakt, welke geleidelijk afnemen bij toenemende frekwentie. Bij een waarde van 100 Hz is er geen trilling meer waar te nemen terwijl bij de hogere frekwenties, groter dan 350 Hz, het trillen van de vis weer in intensiteit toeneemt. Dit schokken van de vis, waarschijnlijk veroorzaakt door spiercontracties, kan leiden tot foutieve metingen daar het gedetecteerd kan worden als zijnde een respons. Voor de overige metingen is daarom gebruik gemaakt van een prikkelfrekwentie van 200 Hz waarbij geen trilling van de vis waar te nemen is, en slechts als reactie op het aanbieden van de stimulus een krachtige beweging van de staart te zien is.

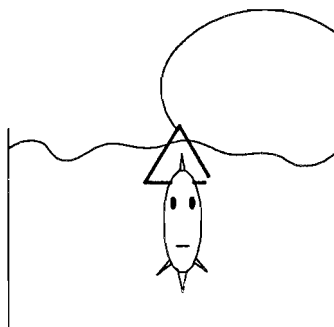
6.1.3 De aanpassingen

Als de vis meerdere keren heeft gereageerd op het aanbieden van een prikkel signaal, ontstaat er een trechtervormige beschadiging op de plaats waar de geïsoleerde draad de vis verlaat. Dit komt omdat de gebruikte hartelektrode geen beweging van de vis ten opzichte van deze elektrode toestaat. De draad schuurt tijdens een respons rondom het aanhechtingspunt de schubben kapot. Er is daarom gezocht naar een elektrode die niet bewegingsloos in de vis gefixeerd zit. Als alternatief is er gekozen voor het gebruik van een stuk gebogen koperdraad (0.8 mm in diameter) dat gedeeltelijk van de isolatie is ontdaan en waaraan een geïsoleerde draad gesoldeerd zit (figuur 16).



figuur 16: de alternatieve elektrode

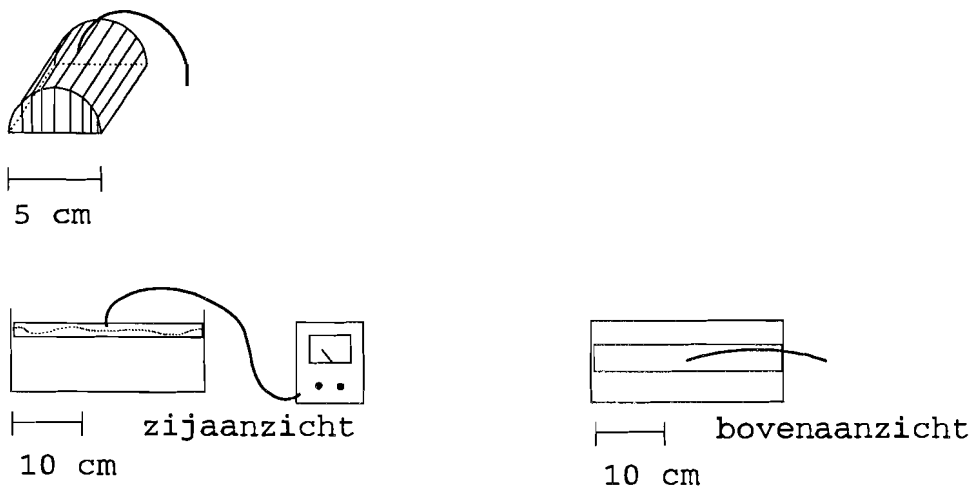
Als deze elektrode in de rugspier van de vis wordt aangebracht dan is niet alleen het ondersteunende oppervlak groter, maar bezit de vis tevens nog enige mate van bewegingsvrijheid. Hij kan als het ware 'schommelen' aan zijn elektrode (figuur 17).



figuur 17: plaatsing van de alternatieve elektrode in de vis

Om de elektrode aan te brengen wordt de vis voorgeprikt met een injectienaald, waarna de aangescherpte elektrode door de spier wordt gestoken en in de juiste vorm wordt gebogen. Door gebruik te maken van deze tevens aanzienlijk goedkopere elektrode blijkt er geen extra beschadiging van de vis meer op te treden.

Bij het toevoegen van een lokaal-anestheticum aan het aquariumwater blijkt dat als de vis zich niet meer op kan richten, hij in tegenstelling tot zijn normale positie een willekeurige oriëntatie bezit. Hij ligt nu niet met zijn kop bij de rand en met zijn staart in het midden van de bak. Bevindt de staart zich nu in de uiterste hoek van de bak, dan wordt de puls een fractie van een seconde te laat afgeslagen, hetgeen resulteert in een foutieve meting. Om dit te voorkomen is de huidige opnemer vervangen door een opnemer die zich over de gehele lengte van de bak uitstrekt (figuur 18).



figuur 18: de alternatieve opnemer

Het moment van afschakelen van de stimulus is nu wederom onafhankelijk van de positie van de vis.

6.2 Invloed van lokaal-anesthetica op goudvissen

Het toevoegen van een lokaal-anestheticum in voldoende hoeveelheid aan het aquariumwater heeft tot gevolg dat de vis omslaat, sneller en minder diep gaat ademen en vervolgens geen teken van leven meer vertoont en volkomen slap in het water ligt. Volgens de literatuur zou de vis nu dood zijn (lit. 21).

Indien de vis dus net zolang in een oplossing van een lokaal-anestheticum gehouden wordt totdat hij niet meer kan reageren op de prikkels (dit gebeurt op het moment dat de ademhaling reeds gestopt is) dan zal hij geplaatst in schoon water niet meer tot leven komen.

Dit niet meer kunnen reageren op de stimulus volgt uit het feit dat ontsnappingspogingen door met de staart te bewegen achterwege blijven. Omdat het prikkelsignaal niet wordt afgeslagen loopt de puls-grootte nu op tot het ingestelde maximale voltage. De vis begint hierdoor te schokken en happende bewegingen te maken met zijn bek.

Na het registreren van een invas-karakteristiek is een vis die niet meer ademde in een bak met schoon water geplaatst om te onderzoeken wat het resultaat zou zijn van een verdere prikkeling van de vis. Hiertoe werd er om de minuut aan de vis een puls aangeboden. Het bleek dat na ongeveer 40 minuten de vis weer spontaan begon te ademen. Na het aanbieden van een prikkel hapte hij eerst nog enige malen na om vervolgens na enkele minuten weer geheel zelfstandig te ademen en de stimulus af te slaan.

In tegenstelling tot wat we volgens de literatuur mogen aannemen zijn de vissen nadat ze zijn gestopt met ademen niet dood, maar dusdanig onder algehele narcose dat de ademhalingspijpen niet meer kunnen functioneren. Er is sprake van een totaal blok van zowel de motorische als sensorische zenuwen. Hierdoor gaat de vis langzaam dood omdat hij geen zuurstof meer uit het water kan opnemen. Omdat we te maken hebben met koudbloedige dieren kan deze toestand van schijndood langere tijd aanhouden.

Middels het aanbieden van het prikkelsignaal vindt er een reanimatie van de vis plaats. Het opwekken van happende bewegingen zorgt er voor dat er een flow van

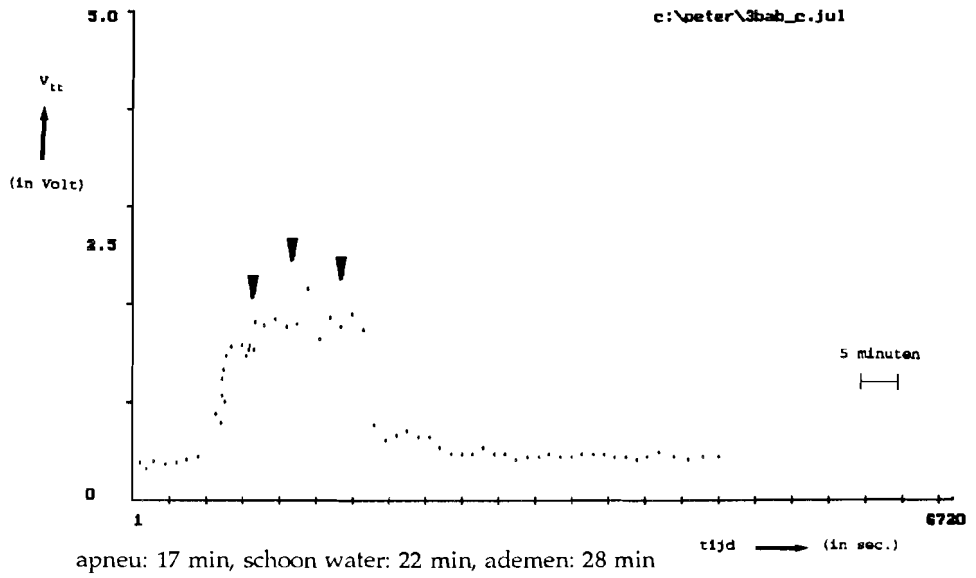
voldoende grootte langs de kieuwen van de vis ontstaat zodat hij in leven blijft en het anestheserende middel kan uitscheiden. Het blijkt tevens mogelijk om de vissen bij te brengen uit hun narcose door ze voldoende lang te 'beademen'. Dit beademen kan geschieden met behulp van een circulatie pomp waarmee het aquariumwater via een slangetje in de mond van de vis gestoken langs de kieuwbogen wordt rondgepompt.

Naar aanleiding van deze bevindingen zijn er proeven gedaan om de in- en uitwas-karakteristiek van twee verschillende lokaal-anesthetica te registreren. In de hierna volgende paragraaf zullen de resultaten hiervan besproken worden.

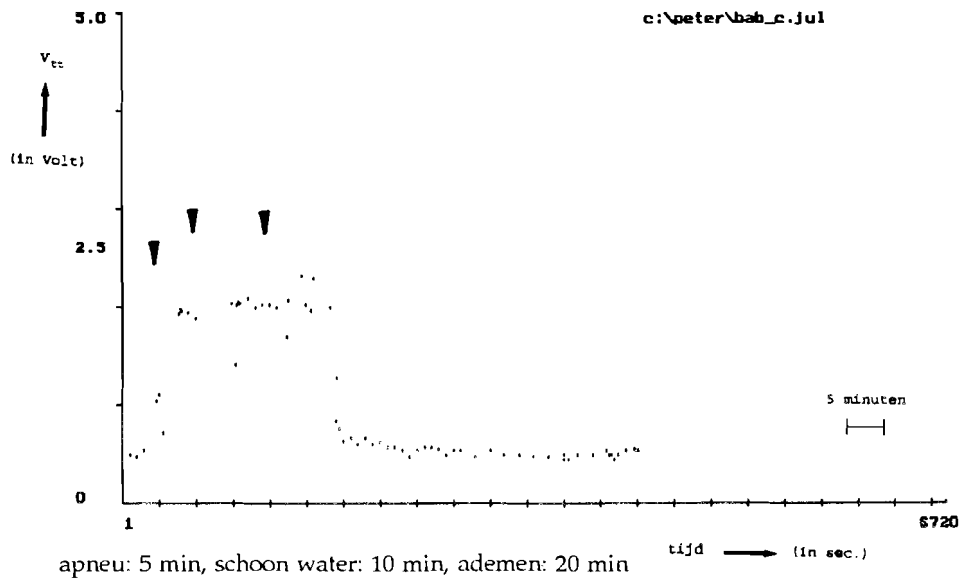
6.3 Een vergelijking tussen BAB en Lidocaïne

Het tijdstip waarop begonnen wordt met de bepaling van de uitwas-karakteristiek kan willekeurig gekozen worden. In de volgende proeven is dit tijdstip vastgelegd op 5 minuten na het stoppen van de ademhaling. Er is uitgegaan van basisconcentraties van BAB- en Lidocaïne-oplossingen waarbij de vissen een 'overturn time' van ongeveer 3 minuten vertonen. Dit zijn respectievelijk concentraties van 0.1 mM/liter en 0.35 mM/liter (lit. 20). Ter vergelijking zijn er metingen gedaan met een twee maal zo hoge en een twee maal zo lage concentratie. Voor iedere stof is gebruikt gemaakt van dezelfde vis waarbij deze na ieder experiment minimaal 24 uur rust heeft gekregen.

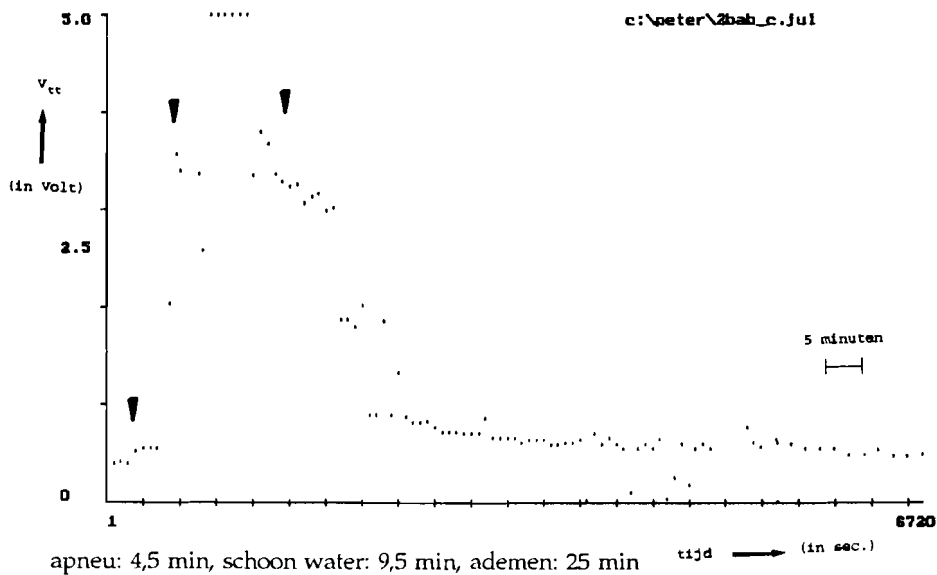
In figuur 19 zijn de resultaten te zien van het blootstellen van de vissen aan een oplossing met BAB. Hierbij is de pulsgrootte ($=V_{10}$) op het moment van afslag uitgezet tegen de verstreken tijd.



figuur 19a: verloop drempelwaarde bij blootstelling aan 0,05 mMol BAB/l



figuur 19b: verloop drempelwaarde bij blootstelling aan 0,1 mMol BAB/l



figuur 19c: verloop drempelwaarde bij blootstelling aan 0,2 mMol BAB/l

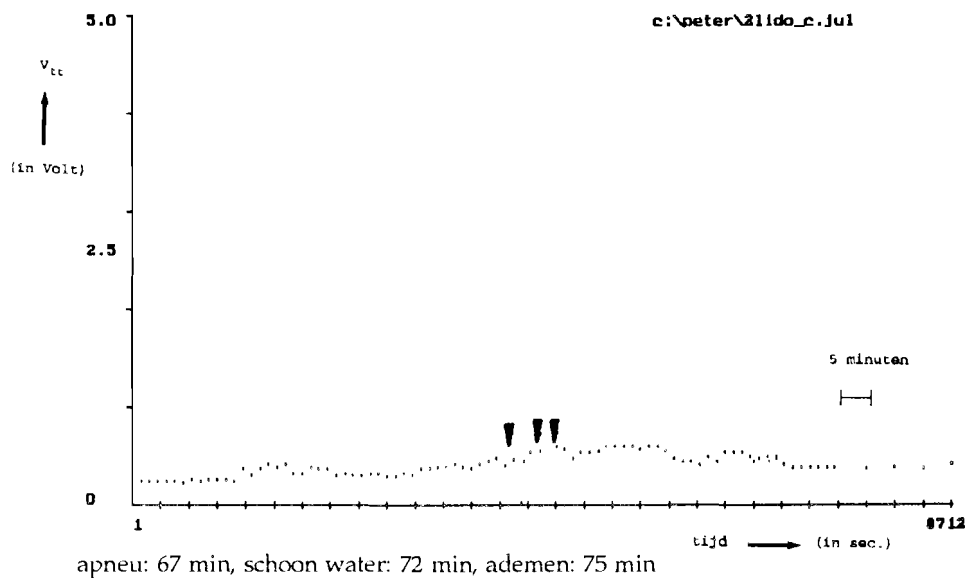
Uit de geregistreerde grafieken kunnen de volgende grootheden gehaald worden: hoe lang duurt het voordat het middel enig effect vertoont, hoe snel neemt dit effect toe, wat is de maximale waarde van dit effect, vindt er een totale verlamming van de vis plaats (kan de vis de prikkel niet meer uitschakelen) en zo ja hoelang houdt deze verlamming aan, wanneer begint het effect weer af te nemen, hoe snel verloopt deze afname en wanneer is de uitgangswaarde weer bereikt.

Grootheden met betrekking tot de ademhaling van de vis zijn: het tijdstip waarop de ademhaling stopt, de duur van de periode van niet ademen en het tijdstip waarop de ademhaling weer op gang komt. Deze grootheden treden slechts op bij een voldoende hoge concentratie en zijn tijdens deze metingen visueel bepaald. Bij het ontwerpen van het systeem is met deze grootheden geen rekening gehouden omdat ter bepaling van een in- en uitwas-karakteristiek de ademhaling niet mag stoppen; de vis zou in dit geval immers dood zijn. In opstellingen waar vissen gebruikt worden om de kwaliteit van drinkwater te kunnen waarborgen, wordt gebruik gemaakt van de ademhalingsdiepte en -frequentie. Hiertoe worden er twee plaat-elektroden in het water geplaatst waarmee het elektrische signaal afkomstig van de ademhalingsspieren geregistreerd kan worden (lit. 30).

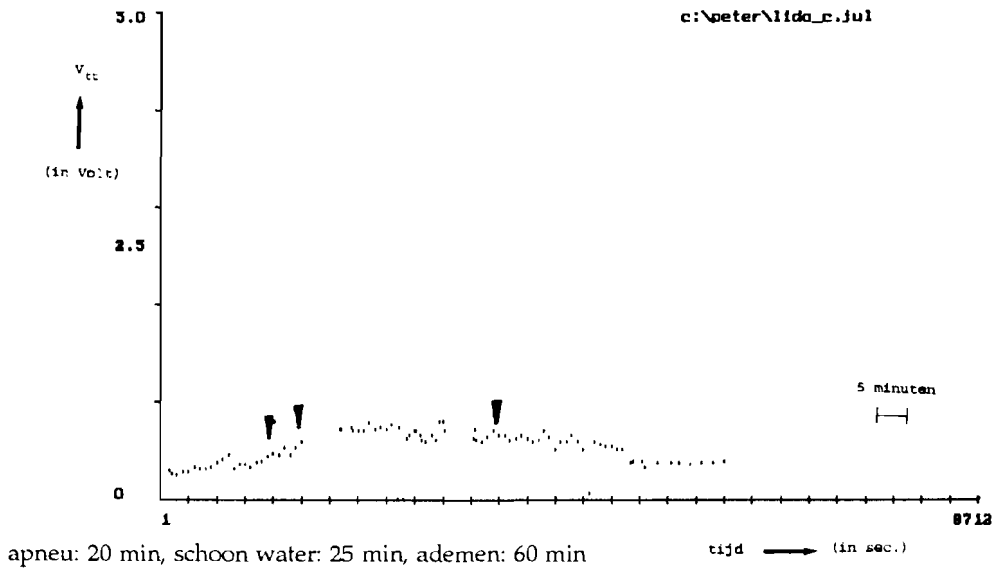
Uit de gevonden meetwaarden blijkt dat in het geval van blootstelling aan een lagere concentratie het langer duurt voordat de vis invloed ondervindt van het

farmacon en dat hij een kortere periode van niet ademen doorloopt. In het geval van een hogere concentratie lijkt het erop dat de vis dusdanig onder invloed van het lokaal-anestheticum verkeert dat niet alleen de sensorische zenuwen minder goed signalen doorlaten maar dat tevens de motorische zenuwen het laten afweten. De gevonden meetwaarden vertonen een grotere spreiding omdat de vis op het oog wat aarzelend reageert. In het geval van een nog hogere concentratie kan de vis op een gegeven moment de stimulus niet meer zelfstandig afslaan en loopt deze vast tegen de maximaal ingestelde waarde.

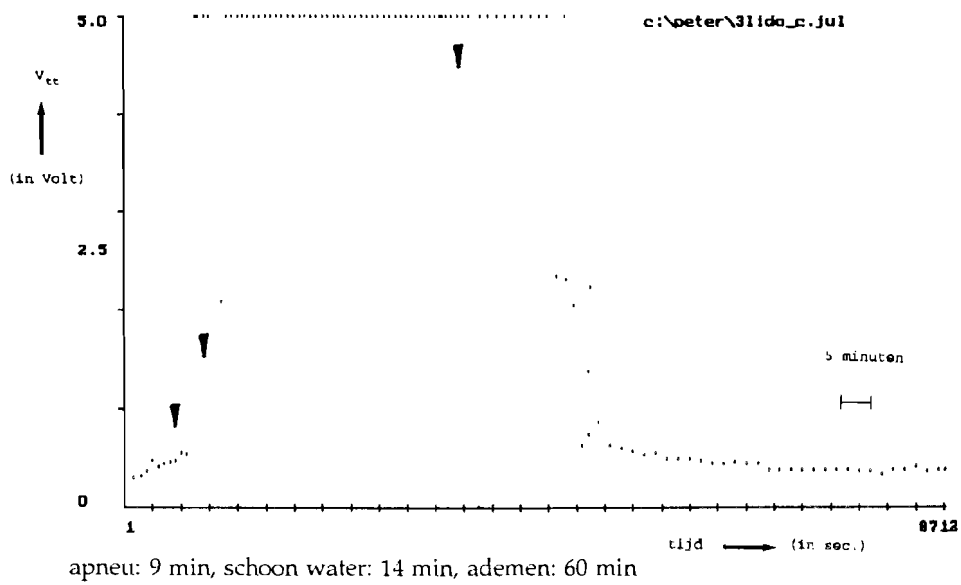
Figuur 20 toont de meetresultaten met betrekking tot blootstelling aan Lidocaïne.



figuur 20a: verloop drempelwaarde bij blootstelling aan 0,175 mMol Lido/l



figuur 20b: verloop drempelwaarde bij blootstelling aan 0,35 mMol Lido/l



figuur 20c: verloop drempelwaarde bij blootstelling aan 0,7 mMol Lido/l

Wederom reageert de vis trager bij een lagere concentratie van het farmacon en stopt hij gedurende een kortere periode met ademen. In tegenstelling tot de grafieken verkregen tijdens blootstelling aan BAB blijft het gebied van overgang tussen wel naar niet kunnen afslaan achterwege bij deze gekozen concentraties.

Als we deze resultaten met elkaar vergelijken dan kunnen we het volgende concluderen m.b.t. het farmacokinetisch en resp. het farmacodynamisch gedrag van de stoffen.

Farmacokinetisch:

Voor beide stoffen levert een lagere concentratie een zwakkere en vertraagde werking op. Dit komt voort uit het feit dat er ten gevolge van de kleinere concentratie verschillen minder, en tevens minder snel, werkzame stof in de vis terecht komt. In het geval van een hogere concentratie zal de benodigde concentratie farmacon om de vis te doen stoppen met ademen in korte tijd ruimschoots overschreden worden doordat de concentratie farmacon in de vis ten gevolge van de grote concentratie verschillen snel en fors toeneemt. Het zal enige tijd duren voordat door middel van uitwas de concentratie dusdanig gedaald is dat de ademhaling weer op gang kan komen.

Farmacodynamisch:

De werking van BAB blijkt bij gelijke concentraties sterker te zijn dan die van Lidocaïne. In het geval van blootstelling aan een hogere concentratie stopt de vis eerder met ademen en duurt het langer voordat de ademhaling weer op gang komt. Omdat er bij het gebruik van Lidocaïne geen overgangsgebied gevonden is waar de vis enigermate verlamd begint te raken kan dit erop duiden dat BAB in tegenstelling tot Lidocaïne selectiever te werk gaat: het maakt onderscheid tussen sensorische- en motorische zenuwen. Dit komt overeen met resultaten die het toedienen van BAB aan proefdieren en patiënten te zien geeft (lit. 14,15).

7 Conclusies en aanbevelingen

Uitgaande van de opgestelde aandachtspunten van paragraaf 2.1 is er een meetsysteem ontwikkeld dat het mogelijk maakt om op een geautomatiseerde wijze de in- en uitwas-karakteristiek met betrekking tot de werking van lokaal-anesthetica op goudvissen te bepalen. Hiertoe bekijken we het verloop van de drempelwaarde, waarboven gereageerd wordt op het aanbieden van een elektrisch prikkelsignaal, als functie van de tijd. We kunnen hierbij het volgende concluderen:

1) In tegenstelling tot de literatuur waar gekeken wordt naar de 'overturn time' en het tijdstip waarop de dood intreedt, kunnen er aan de hand van de verkregen resultaten de volgende meetgrootheden bepaald worden: hoe lang duurt het voordat het middel enig effect vertoont, hoe snel neemt dit effect toe, wat is de maximale waarde van dit effect, vindt er een totale verlamming van de vis plaats (kan de vis de prikkel niet meer uitschakelen) en zo ja hoelang houdt deze verlamming aan, wanneer begint het effect weer af te nemen, hoe snel verloopt deze afname en wanneer is de uitgangswaarde weer bereikt.

2) Het stoppen van de ademhaling (zie punt 10) is een farmakologisch eindpunt dat als referentiepunt kan dienen ter bepaling van de uitwas-karakteristiek. Het vervolgens weer op gang komen van de ademhaling en de tijd gedurende dat deze niet aanwezig is, zijn tevens goed definieerbare grootheden.

3) Indien de meetgrootheden met betrekking tot de ademhaling automatisch gemeten kunnen worden dan zal deze optie, geïntegreerd binnen het huidige systeem, een extra dimensie aan de mogelijkheden van het systeem toevoegen. Van het registreren en detecteren van de ademhalingsfrequentie en -diepte wordt veelvuldig gebruik gemaakt in systemen met vissen die bijvoorbeeld de waterkwaliteit in de buurt van drinkwater-voorzieningen kunnen bewaken (lit. 30). Hiertoe worden er twee plaat-elektroden parallel ten opzichte van elkaar in het water geplaatst waarmee het elektrische signaal afkomstig van de ademhalingsspieren geregistreerd kan worden. Met behulp van de Lab-Master-kaart kan nu tussen het aanbieden van prikkels door gemeten worden wat er met de ademhaling van de vissen gebeurt.

4) Als stimulus wordt een blokgolfvormig signaal gebruikt. De vis vertoont een

goede reproduceerbare respons als de pulsgrootte ($=V_{it}$) met 0,66 Volt per seconde toeneemt.

5) De gebruikte prikkelfrequentie binnen de uitgevoerde experimenten is vastgelegd op 200 Hz omdat deze frequentie het onwillekeurig trillen van de vis voorkomt en zo het mogelijk foutieve afslaan ten gevolge van dit trillen tegengaat.

6) Omdat we automatisch willen meten wordt de stimulus via een door de rugspier geprikte elektrode aangeboden. Een op een eenvoudige wijze van gebogen koperdraad gemaakte elektrode geeft de vis enige mate van bewegingsvrijheid ten opzichte van deze elektrode en zorgt voor een robuuste aanhechting.

7) De respons van de vis kan gemeten worden door gebruik te maken van een druksensor die via een luchtkoppeling met het wateroppervlak verbonden is. Hiertoe wordt er een drukopnemer gebruikt die zich over de gehele lengte van de experimenteerbak uitstrekt.

8) Indien er binnen de uit te voeren experimenten gebruik gemaakt wordt van een elektrode die door de schubben van de vis geprikt is, dan zal de maximaal haalbare pulsgrootte van 30 Volt kunnen komen te vervallen. In dit geval voldoet een kleinere maximale spanning zodat de 4096 stapjes die de A/D- en D/A converters tot hun beschikking hebben een kleinere kwantisatiefout tot gevolg hebben.

9) BAB vertoont een potente en snelle werking. Het lijkt tevens een selectieve werking met betrekking tot het blokkeren van de geleiding in sensorische- en motorische zenuwen te bezitten.

10) Het ontbreken van ademhaling bij vissen blootgesteld aan oplossingen van lokaal-anesthetica betekent niet, zoals veelvuldig in de literatuur vermeld wordt, dat de vissen dood zijn. Zij zijn slechts dusdanig diep 'onder narcose' dat de ademhalingsspieren niet meer kunnen functioneren. Ondanks het feit dat de vis in schoon water wordt geplaatst zal hij toch vanwege zuurstofgebrek dood gaan. Het aanbieden van een waterstroom langs de kieuwen geeft de vis voldoende zuurstof om de periode van niet-ademen te doorstaan. Dit kan gebeuren door de vis bloot te stellen aan de elektrische prikkels waardoor hij happende bewegingen gaat maken of door de vis met behulp van een circulatiepomp te 'beademen'.

11) Het geschreven programma STIM_FISH is ruim van opzet. Tezamen met de

gebruikte Lab-Master-kaart maakt zij het de gebruiker mogelijk om meerdere parameters zoals de prikkelfrekwentie, de maximale pulsgrootte, de drempelwaarde van de druksensor en de frekwentie van het aanbieden van de prikkels naar keuze in te stellen. Het systeem kan ook gebruikt worden om bijvoorbeeld de werking van spierverslappende middelen te onderzoeken.

De besproken experimenten zijn in de eerste plaats uitgevoerd om de werking van het meetsysteem in de praktijk te testen. Uit de gevonden resultaten zijn wat voorzichtige vergelijkingen gemaakt tussen de werking van BAB en een ander lokaal-anestheticum Lidocaïne. Als er echter na deze testfase experimenten gedaan worden om de werking van BAB te kunnen specificeren dan zullen omdat men met proefdieren werkt, meerdere parameters goed in de gaten moeten worden gehouden. Hierbij valt de denken aan:

- de kwaliteit en temperatuur van het water waarin de vissen verblijven (het water in de experimenteer bakken dient tevens afkomstig te zijn uit dit reservoir),
- de hoeveelheid licht waaraan de vissen blootgesteld worden,
- het gevolgde dieet.

Meer specifiek met betrekking tot BAB kan gelet worden op de invloed van:

- de zuurtegraad van het water,
- de aanwezige hulpstoffen,
- 'particle size' van de deeltjes.

De huidige manier waarop het signaal van de druksensor gebruikt wordt is om aan te geven of de respons van de vis al dan niet aanwezig is. Met name in het gebied waar de pulsgrootte een grotere spreiding vertoont op moment van afslag, zou met behulp van de Lab-Master-kaart het druksensor-signaal bekeken kunnen worden. Het bekijken van dit signaal dat de 'aktiviteit' van de vis weergeeft, kan wellicht interessante informatie opleveren met betrekking tot de mate van verlamming van de vis.

Literatuurlijst

- (1) Grouls, R.J.E. et al
N-butyl-p-aminobenzoate:
Preparation and quality control of a suspension
injection for epidural analgesia.
Pharm. Weekbl. Scientific Edition, 13:13-17, 1991
- (2) Grouls, R.J.E. et al
Pharmacology of epidural suspensions of local anesthetics,
comparison of lidocaine and BAB in the dog.
First Eur. Cong. of Pharm. Sci., oct 92, Amsterdam
- (3) Grouls, R.J.E. et al
Partition coefficients of Local anesthetics measured by HPLC.
First Eur Cong of Pharm Sci., oct 92, Amsterdam
- (4) Korsten, H.H.M. et al
Long-lasting epidural sensory blockade by
n-butyl-p-aminobenzoate in the dog.
Neurotoxic or local anesthetic effect ?
Anesthesiology, 73:491-498, 1990
- (5) Korsten, H.H.M et al
Long-lasting epidural sensory blockade by
n-butyl-p-aminobenzoate in the terminally ill
intractable cancer pain patient.
Anesthesiology, 75:950-960, 1991
- (6) Korsten, H.H.M et al
The true epidural space: possible consequences for
material based drug delivery systems (letter).
Anesthesiology 1992 in press.

- (7) Gostine, M.L.
Michigan, USA: Treatment of cancer patients
with epidural BAB.
World Congress of Anaesthesiologists; 12-19 june 1992
- (8) Ackerman, E.W. et al
Eindhoven: New possibilities of epidural drug delivery.
World Congress of Anaesthesiologists; 12-19 june 1992
- (9) Korsten, H.H.M et al
Eindhoven: Long-lasting epidural sensory blockade
by BAB in the terminally ill intractable cancer pain patient.
World Congress of Anaesthesiologists; 12-19 june 1992
- (10) Grouls, R.J.E et al
Epidural lidocaine suspension, a clinical study in dogs.
World Congress of Anaesthesiologists; 12-19 june 1992
- (11) Shulman, M.
Epidural BAB for the treatment of metastatic cancer pain.
9th World Congress of Anesthesiologists, Washington, May 1988.
- (12) Shulman, M.
Treatment of cancer pain with epidural BAB suspension.
Reg. Anesth., 12:1-4, 1987
- (13) Shulman, M. et al
Effect of epidural and subarachnoid injections of a 10% BAB suspension.
Reg. Anesth., 15:142-46, 1990
- (14) Shulman, M.
Chicago, USA: Use of a 10% BAB suspension
for the treatment of cancer pain.
World Congress of Anaesthesiologists; 12-19 june 1992

- (15) Shulman, M. et al
Chicago, USA: Treatment of chronic intractable pain
with injection of 10% BAB suspension.
World Congress of Anaesthesiologists; 12-19 June 1992
- (16) Bond, M.R.
Het verschijnsel pijn:
Oorsprong analyse en behandeling.
Intro, Nijkerk,
bladz. 139, 1983
ISBN: 90 266 1721 6
- (17) Prescott, F.
De strijd tegen pijn.
Em. Querido's Uitgeverij N.V.
Wetenschappelijke Uitgeverij N.V.
bladz. 139, 1967
- (18) Shulman, M.
Epidural butamben for the treatment
of metastatic cancer pain [Abstract].
Anesthesiology, 76:A245, 1987
- (19) Powers, D.A.
Fish as Model Systems
Science, 246:352-358, 1989
- (20) Yalkowsky, S.H., Slunick, T.G., Flynn, G.L.
Effects of Alkyl chain length on biological activity:
Alkyl p-aminobenzoate-induced narcosis in goldfish.
J. Pharm. Sci., 63(5):691-695, 1974
- (21) Feldman, F., DeFrancisco, M., Cascella, P.J.
Activity of local anesthetic agents in goldfish.
J. Pharm. Sci., 64(10):1713-1715, 1975

- (22) Yalkowski, S.H.
Drug absorption kinetics in Goldfish
J. Pharm. Sci., 62(12):1949-1954, 1973
- (23) Cascella, P.J.
Effects of Lidocaine and derivatives on time of death
and overturn in goldfish.
J. Pharm. Sci., 68(4):401-407, 1979
- (24) Ona, E.
Use of acoustics in studies of fish reaction to
imposed stimuli.
Model. Int., 7(4):219-226, 1986
- (25) Bond, M.R.
Het verschijnsel pijn:
Oorsprong analyse en behandeling.
Intro, Nijkerk,
bladz. 44, 1983
ISBN: 90 266 1721 6
- (26) Horner, J.L., Longo, N., Bitterman, M.E.
A shuttle box for fish and a control circuit of
general applicability.
American Journal of Psychology, 74:114-120, 1961
- (27) Woodard, W.T., Bitterman, M.E.
Punishment in the goldfish as a function of
electrode orientation.
Behav. Res. Meth. Instru., 3(2):72-73, 1971
- (28) Jansen, G.A., Greene, M.D.
Morphine metabolism and morphine tolerance
in goldfish.
Anesthesiology, 32:231-235, 1970

- (29) collegediktaat TUE
Metingen in de geneeskunde 1.
nr. 5006, bladz. 16.3
- (30) Evans, G.P., Johnson, D.
Automatic detection of pollution
at drinking water intakes using fish.
Wat. Supply, 3:179-186, 1985

Bijlage 1: De Lab-Master instelling

De gebruikte lab-Master bestaat uit een 'mother board' voor in een XT/AT-computer, verbonden met een 'daughter board' via een 50-pins 'flatcable'.

Met behulp van jumpers is de volgende instelling gemaakt (zie Lab Master DMA Handbook):

JUMPER

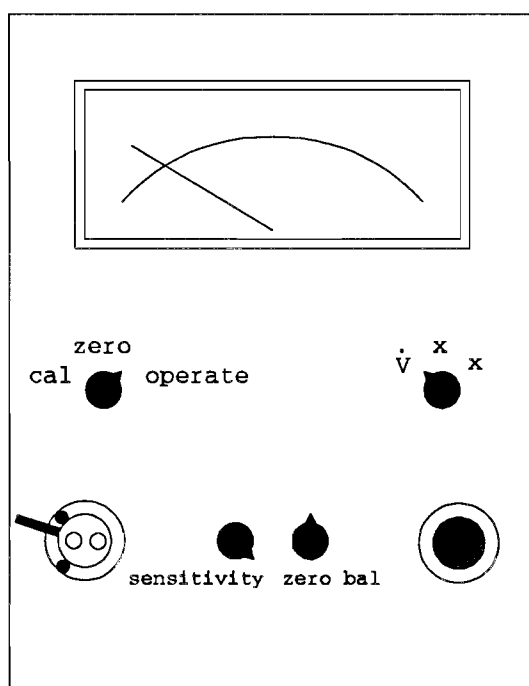
- TINT :output van timer 1 naar flipflop,
- JSD :single-ended inputs,
- JAD :-10V to +10V range,
- JCD :normal mode of operation,
- JDD :two's complement output,
- J3 :-10V to +10V range,
- J7 :ouput timer 1 genereert interrupt,
- J4 :verbindt 9513A counter output
:met IRQ2.

bijlage 2: De druksensor

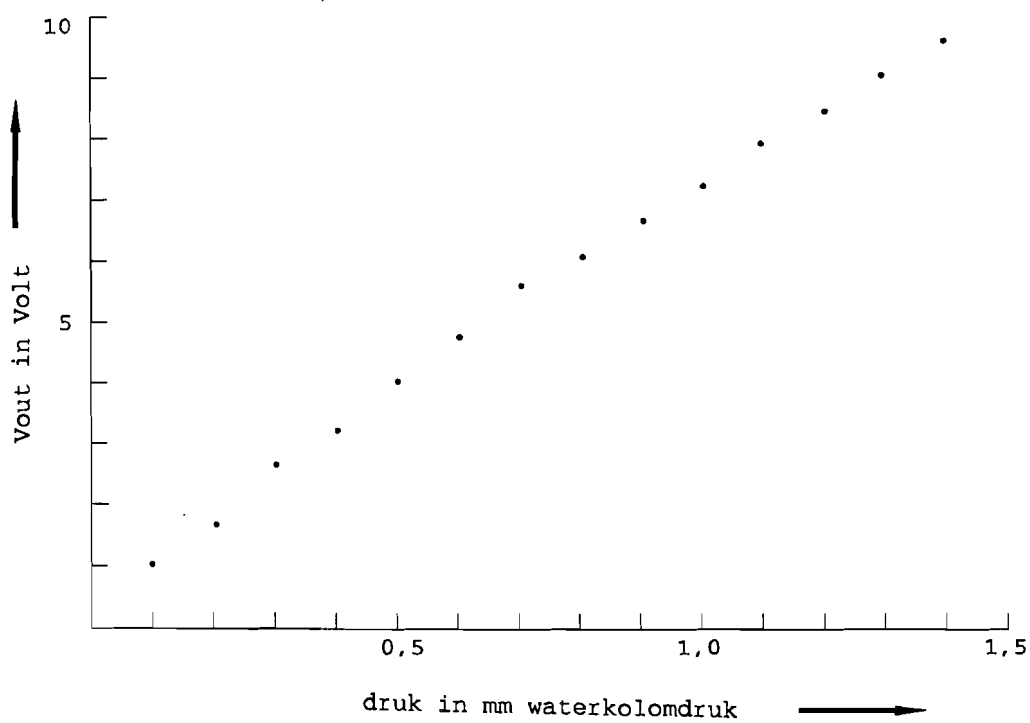
Om de gebruikte 'pneumotagograph' van het merk Godart te gebruiken als een druksensor dient deze als volgt ingesteld te worden:

- kies voor de stand 'OPERATE',
- selecteer de functie 'V',
- draai de 'sensitivity' op maximaal (is helemaal rechtsom),
- stel met de 'zero balance' knop de uitslag van de meter in op waarde nul (met behulp van toets 'T' van het keyboard is het mogelijk om deze waarde op het beeldscherm weer te geven).

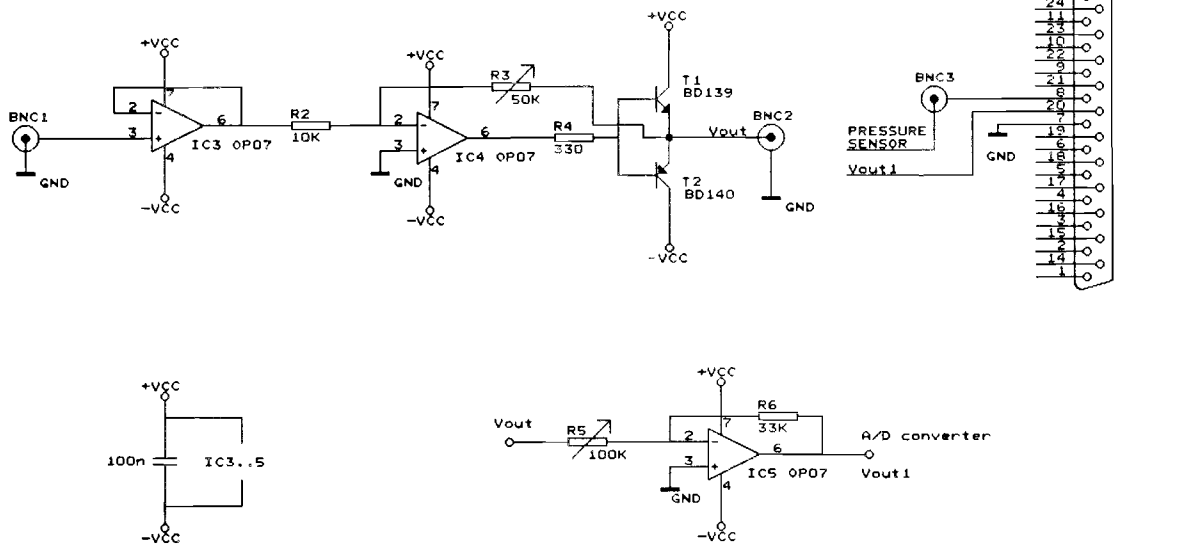
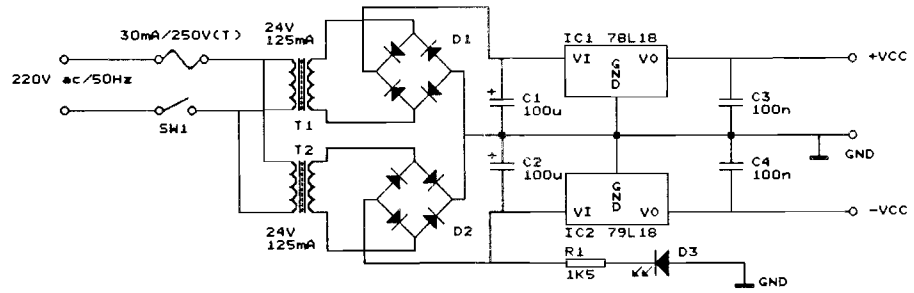
De uitgangsspanning is aan de achterzijde van het apparaat beschikbaar bij de aansluiting V.



Met behulp van een manometer is de volgende grafiek bepaald die de relatie weer-geeft tussen de aangeboden druk in mm waterkolom druk en de afgegeven span-ning in Volt.



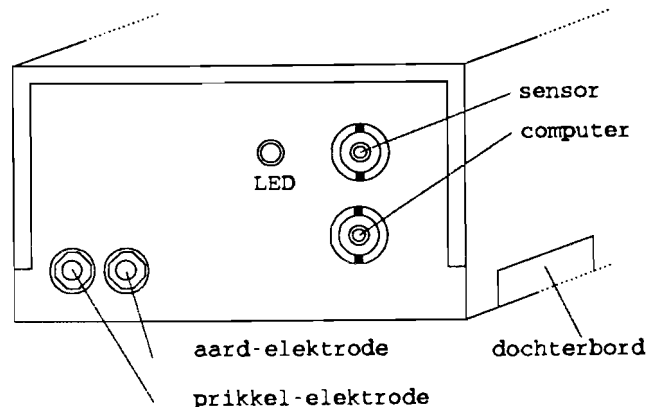
bijlage 3: Het schema



TUE MEDISCHE ELEKTROTECHNIEK		
Title	ELEKTRISCHE PRIKKELAAR VOOR VISSEN	
Size	Document Number	1
B		REV

Bijlage 4: Het opzetten van het systeem

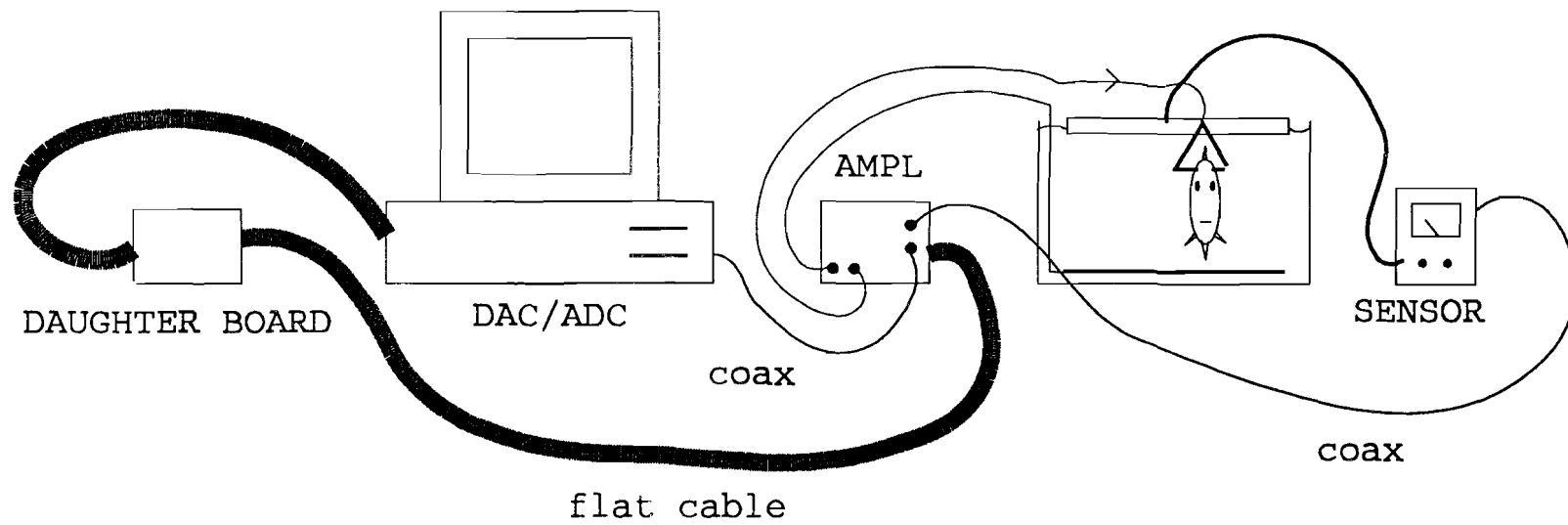
De gebouwde versterker is in de onderstaande behuizing geplaatst:



Om de meetopstelling op te bouwen moeten de volgende verbindingen tussen de afzonderlijke componenten gemaakt worden:

- verbind het D/A-converter-sigitaal, beschikbaar aan de achterzijde van de computer, met de ingang van de versterker,
- verbind de uitgangsspanning van de druksensor met de sensor-aansluiting van de versterker,
- verbind het dochterbord met de A/D aansluiting van de versterker.

Het geheel van computer, sensor, versterker en aquarium met vis komt er nu als volgt uit te zien:



Maak Uw keuze: Start, Restart, spatie = meting, Helpfunctie, Einde

=====

SAMPLE	TIJD	PULSGROOTTE	S TOT PULS
0.00 volt	0: 0: 5	-	-
0.00 volt	0: 0: 6		
0.00 volt	0: 0: 6		
0.00 volt	0: 0: 7	(prikkel is onderdrukt)	
0.00 volt	0: 0: 8		
0.00 volt	0: 0: 9	Wilt U automatisch meten? (Ja/Nee)	
0.00 volt	0: 0: 9		
0.00 volt	0: 0:10	Geef het tijdsinterval tussen de	
0.00 volt	0: 0:11	metingen in minuten.	
0.00 volt	0: 0:12	1	
0.00 volt	0: 0:12		
0.00 volt	0: 0:13		
0.00 volt	0: 0:14		
0.00 volt	0: 0:15		
0.00 volt	0: 0:15		
0.00 volt	0: 0:16		
0.00 volt	0: 0:17		
0.00 volt	0: 0:18		
0.00 volt	0: 0:18		