

1 MEHANIZMI DELOVANJA ZDRAVIL

Velika večina zdravil deluje tako, da se veže na sestavine organizma. Mesta vezave zdravil imenujemo *receptorji za zdravila* v najširšem pomenu besede. Lahko so zunaj celic, večinoma pa gre pri receptorjih za celične sestavine. Da zdravilo povzroči učinek mora delovati specifično. To pomeni, da se molekula zdravila veže le na določeno celično sestavino in posamezna celična sestavina prepozna samo določeno vrsto zdravila. Glede na njihovo funkcijo je celičnih receptorjev za zdravila več vrst:

- receptorji za endogene prenašalce (mediatorje) - to so receptorji v ožjem pomenu besede, pogosto jih imenujemo tudi *farmakološki receptorji*. Največkrat so v celični membrani, lahko pa so tudi v citoplazmi ali v jedru.
- ionski kanali; ti lahko nastopajo kot samostojni receptorji, lahko so del farmakološkega receptorja ali pa so funkcionalno sklopljeni z njim.
- transporterji, namenjeni prenašanju molekul skozi celične membrane,
- encimi, ki so velikokrat neposredna tarča delovanja zdravil.

Receptorji za endogene prenašalce (farmakološki receptorji)

Farmakološki receptor je proteinska molekula, ki prepozna endogeni kemijski dražljaj in nanj odgovori. Ta vrsta receptorjev je najpogosteje povezana z učinkom zdravil, bodisi da ta delujejo na receptorje neposredno ali pa spremenijo njihovo delovanje na posreden način. S temi receptorji se ukvarja veliko farmakoloških raziskav. Odkrivajo vedno nove pod tipe, njihovo strukturo in delovanje. To pa odpira pot v sintezo novih in vse bolj selektivnih zdravil.

Agonisti in antagonisti

Pri zdravilih, ki delujejo neposredno na receptorje, ločimo dve kategoriji: agoniste in antagoniste. Zdravila, ki ob vezavi na receptor tega aktivirajo in izzovejo učinek, tako kot endogeni mediator, so **agonisti**.

Druga zdravila se vežejo na receptor, sama ob tem ne izzovejo učinka, pač pa preprečujejo vezavo agonistom; to so **antagonisti**. Antagonisti se lahko vežejo na isto mesto na receptorju kot agonisti in z njim tekmujejo za vezavo, govorimo o *kompetitivnem antagonizmu*. Če je ta vezava reverzibilna, je to *reverzibilni kompetitivni antagonizem*, če je ireverzibilna, pa imamo opraviti z *ireverzibilnim kompetitivnim antagonizmom*. Vezava antagonista na receptor je reverzibilna kadar lahko agonist izpodrine agonista z receptorja. (primer: propranolol je kompetitivni antagonist na adrenergičnih receptorjih β .) Pri ireverzibilni vezavi pa nastane med antagonistom in receptorjem močna kovalentna vez. Agonist v tem primeru ne more izpodriniti antagonista z receptorja. Čas delovanja ireverzibilnega antagonista je odvisen od sinteze novih receptorskih molekul.

Antagonist se lahko veže na receptorju tudi na drugo mesto kot agonist in s tem spremeni konformacijo receptorja tako, da se spremenijo lastnosti receptorja in s tem tudi delovanje agonista; lahko se veže na katero od komponent, ki povezujejo aktivacijo receptorja z učinkom, in tako zmanjša delovanje agonista; v takih primerih gre za *nekompetitivni antagonizem*, ki je glede na vrsto vezave antagonista spet lahko reverzibilen ali ireverzibilen.

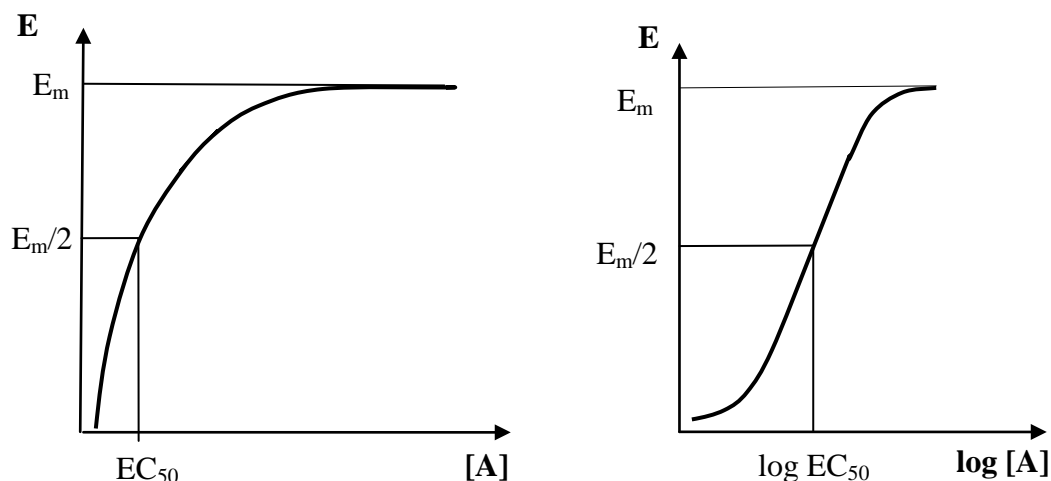
Doslej omenjenim vrstam antagonizma, ko se antagonist veže na isti receptorski sistem kot agonist, pravimo **farmakološki antagonizem**. Poznamo pa še druge vrste antagonizma, kjer gre za le to, da eno zdravilo zmanjša učinek drugemu, ne glede na mehanizem. Sem sodijo:

- **kemični antagonizem**, kjer gre za kemično interakcijo med antagonistom in agonistom, še preden se ta veže na receptor (primer: tvorba kelatov med kelirajočim reagentom in težkimi kovinami)
- **fiziološki antagonizem**, pri katerem agonist in antagonist delujeta na različna prijemališča, celo v različnih organih, ter povzročita učinke, ki si nasprotujejo (primer: histamin z vezavo na histaminske receptorje zveča izločanje želodčne kisline, inhibitor protonskr črpalke pa z zaviranjem delovanja protonske črpalke izločanje želodčne kisline zavre)
- **farmakokinetični antagonizem**, kjer antagonist zaradi interakcij z agonistom na enem ali več farmakokinetičnih nivojih (absorpcija, porazdelitev, metabolizem, izločanje) zmanjša koncentracijo agonista na mestu delovanja (primer: indukcija metabolnih encimov z barbituratom pospeši metabolizem antikoagulant in tako zmanjša njegov učinek)

Prikazovanje in matematični opis odnosa med koncentracijo agonista in učinkom

Iz analize odnosa med koncentracijo agonista in njegovim učinkom je mogoče sklepati na lastnosti agonista in receptorja, na katerega se veže. Pri raziskavah delovanja agonistov in antagonistov na receptorje navadno uporabljamo **izolirane organe ali tkiva**.

Učinek agonista z naraščanjem koncentracije raste do določene maksimalne vrednosti; funkcija, ki ta odnos najbolje opisuje, je pravokotna hiperbola. Grafično je odnos med koncentracijo agonista in njegovim učinkom prikazan na sliki 1. Za prikazovanje tega odnosa je na abscisni osi (koncentracija agonista) navadno logaritemska skala, ker se tako osrednji del krivulje lahko obravnava kot premica in je s tem olajšana primerjava učinkov različnih agonistov. Parametri, ki določajo funkcijo odnosa med koncentracijo agonista in učinkom, so naslednji: maksimalni učinek - E_m in koncentracija agonista, ki izzove polovico maksimalnega učinka - EC_{50} (- efektivna koncentracija, ki izzove **50%** maksimalnega učinka). Ker se ta parameter uporablja tudi pri poskusih na celi živali, tam pa uporabljamo doze in ne koncentracij, se včasih uporablja tudi oznaka ED_{50} , tudi pri poskusih na izoliranih organih, ko gre dejansko za koncentracijo. Navadno uporabljamo molarne koncentracije agonistov in antagonistov.



Slika 1.1 : Grafični prikaz odnosa med koncentracijo agonista in njegovim učinkom. Na levem grafu je na abscisni osi linearna skala, na desnem logaritemska. E_m - maksimalni učinek, $[A]$ - koncentracija agonista, EC_{50} - koncentracija agonista, ki izzove učinek, enak polovici maksimalnega učinka.

Funkcija, ki povezuje koncentracijo agonista [A] z njegovim učinkom E je naslednja:

$$E = \frac{E_m \cdot [A]}{EC_{50} + [A]} \quad (1.1)$$

Če uvedemo v enačbo še parameter p , ki določa naklon krivulje, prikazane v desnem grafu slike 1 (v enačbi 1 ima vrednost 1), dobimo naslednji odnos, ki je posebna oblika ti. logistične funkcije:

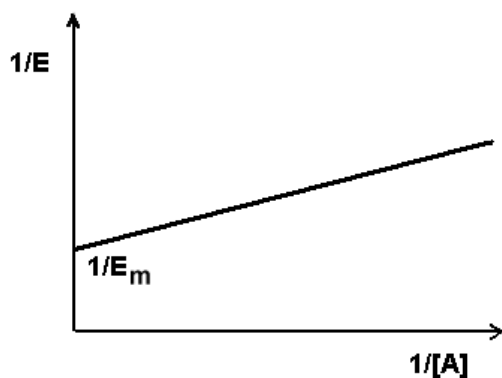
$$E = \frac{E_m \cdot [A]^p}{EC_{50}^p + [A]^p} \quad (1.2)$$

Če je $p < 1$, je krivulja, ki jo opisuje enačba 2, bolj položna, če je $p > 1$, je krivulja bolj strma.

S pomočjo teh enačb lahko določimo za agoniste maksimalni učinek in EC_{50} , Enačbo (1) lahko pretvorimo tudi v linearno obliko, podobno enačbi po *Lineweaver-Burku*, ki jo poznamo iz encimske kinetike:

$$\frac{1}{E} = \frac{1}{[A]} \cdot \frac{EC_{50}}{E_m} + \frac{1}{E_m} \quad (1.3)$$

Pri grafičnem prikazovanju enačbe (1.3) je odvisna spremenljivka (na osi y) na levi strani enačaja, neodvisna spremenljivka (na osi x) pa je $\frac{1}{[A]}$. S pomočjo linearne transformacije lažje določimo E_m in ED_{50} kot iz enačb (1.1) ali (1.2), kar pa ob splošni dostopnosti računalniških programov za prilagajanje izbrane funkcije eksperimentalnim podatkom (curve fitting) ne predstavlja posebne prednosti. Pri enačbi (1.3) je presečišče premice z ordinatno (y) osjo enako recipročni vrednosti maksimalnega učinka. Graf na sliki 1.2 prikazuje odnos med koncentracijo in učinkom, kot ga opisuje enačba (1.3).

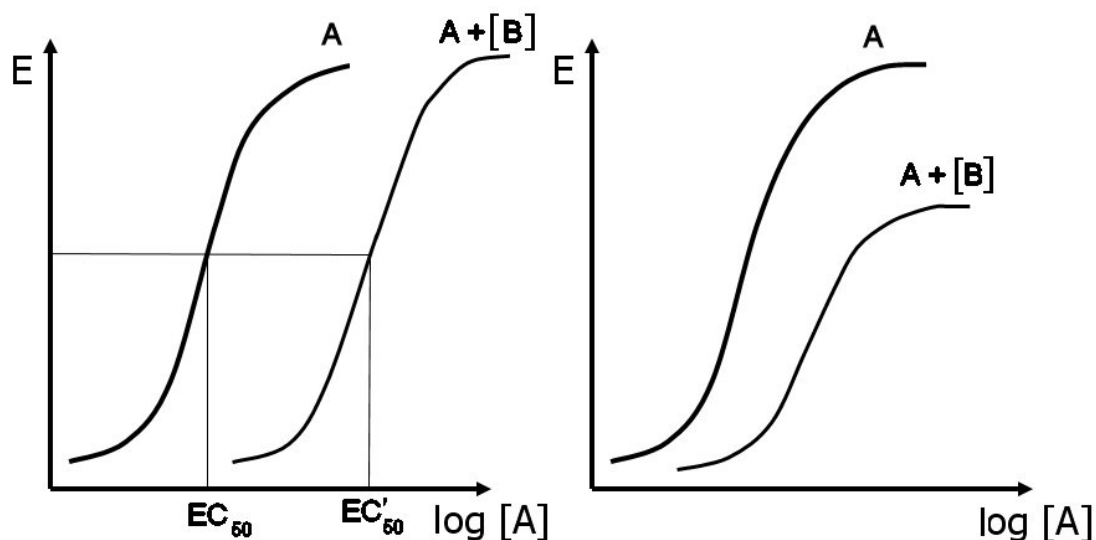


Slika 1.2: Grafični prikaz odnosa med koncentracijo agonista in njegovim učinkom, pri katerem na abscisno os nanašamo recipročno vrednost koncentracije agonista ($1/[A]$), na ordinatno pa recipročno vrednost učinka ($1/E$). Presečišče premice z ordinatno osjo nam kaže

recipročno vrednost maksimalnega učinka ($1/E_m$), naklon premice je določen z razmerjem EC_{50}/E_m .

Agonisti se lahko med sabo razlikujejo v E_m in EC_{50} . Za zdravilo z večjim E_m pravimo, da je bolj *učinkovito*, za zdravilo z manjšim EC_{50} pravimo, da je *močnejše*; govorimo torej o **učinkovitosti** zdravila, ki ga določa njegov maksimalni učinek, in o **moči** zdravila, ki je določena z EC_{50} . Namesto EC_{50} (ED_{50}) se pogosto uporablja pD_2 ($-\log ED_{50}$).

Ob prisotnosti antagonista se krivulja odnosa med koncentracijo in učinkom agonista spremeni, kot je prikazano na sliki 3: Pri reverzibilnem kompetitivnem antagonizmu se maksimalni učinek ne zmanjša, krivulja pa se pomakne v desno, v območje večjih koncentracij agonista; pri nekompetitivnem antagonizmu se maksimalni učinek zmanjša in krivulja se lahko pomakne v desno.



Slika 1.3: Grafični prikaz odnosa med koncentracijo agonista in njegovim učinkom ob prisotnosti reverzibilnega kompetitivnega antagonista (levi graf) in ob prisotnosti nekompetitivnega antagonista (desni graf). $[A]$ – molarna koncentracija agonista, $[B]$ – molarna koncentracija antagonista, EC_{50} – molarna koncentracija agonista, ki izzove učinek, enak polovici maksimalnega učinka, EC'_{50} – EC_{50} spremenjen zaradi delovanja antagonista.

Za določanje moči antagonistov se uporablja vrednost pA_2 , ki je negativni desetiški logaritem tiste koncentracije antagonista, ki učinek dvojne koncentracije agonista zniža na učinek enojne (definicija po *Schildu*). Vrednost pA_2 je pri reverzibilnih kompetitivnih antagonistih enaka disociacijski konstanti kompleksa antagonist-receptor. S pomočjo določanja vrednosti pA_2 za iste pare agonist-antagonist na različnih tkivih je mogoče določiti različne podtipe receptorjev.

Teorije receptorjev

Povezavo med aktivacijo receptorjev in učinkom agonista opisujejo teorije receptorjev; te izhajajo iz različnih predpostavk in skušajo pojasniti eksperimentalno ugotovljene značilnosti učinka zdravil.

Še najmanj tvegana je predpostavka, da se agonist veže na receptor po zakonu o delovanju mas: Ob reverzibilni reakciji agonista A z receptorjem R nastane kompleks AR, ki nato preko vmesnih stopenj privede do učinka E:

Hitrost reakcije v smeri nastajanja kompleksa (v_1) je:

$$v = k_1 \cdot [A] \cdot [R_p] \quad (1.4)$$

pri čemer je k_1 hitrostna konstanta v smeri nastajanja kompleksa, $[A]$ molarna koncentracija agonista in $[R_p]$ molarna koncentracija prostih receptorjev.

Hitrost reakcije v nasprotni smeri (v_2) pa je:

$$v_2 = k_2 \cdot [AR] \quad (1.5)$$

pri čemer je k_2 hitrostna konstanta v smeri disociacije kompleksa in $[AR]$ molarna koncentracija zasedenih receptorjev.

V ravnotežju velja:

$$v_1 = v_2$$

in

$$\frac{k_2}{k_1} = \frac{[A] \cdot [R_p]}{[AR]} = K_D \quad (1.6)$$

K_D je ravnotežna disociacijska konstanta kompleksa agonist-receptor.

Teorije, ki poskušajo pojasniti in kvantitativno ovrednotiti interakcijo med agonistom in receptorjem, se že v tej fazi med seboj razhajajo.

Hitrostna teorija, uvedel jo je Paton, izhaja iz predpostavke, da je učinek agonista odvisen od *hitrosti nastajanja* kompleksa agonist-receptor. S to teorijo je mogoče razložiti nekatere eksperimentalne podatke; npr. pogosto opazimo, da takoj po dodatku agonista nastopi hiter in močan učinek, ki dokaj hitro upade do neke ravnotežne vrednosti, podobno kot se spreminja hitrost nastajanja kompleksov.

Druge teorije predpostavljajo, da je za učinek agonista odločilna koncentracija kompleksa agonist-receptor, oziroma *delež z agonistom zasedenih receptorjev*. To so **okupacijske teorije**.

Povezavo med koncentracijo agonista in koncentracijo kompleksa agonist-receptor lahko ob upoštevanju nekaterih predpostavk izvedemo iz enačbe (1.6):

$$[AR] = \frac{[R_t] \cdot [A]}{K_D + [A]} \quad (1.7)$$

$[R_t]$ je koncentracija vseh receptorjev: $[R_t] = [AR] + [R_p]$.

Najbolj preprosta je klasična okupacijska teorija, t.i. Ariënsova teorija, ki temelji na predpostavki, da gre med koncentracijo kompleksa in učinkom za premo sorazmeren odnos, sorazmernostni faktor je t.i. intrinzična aktivnost zdravila (α):

$$E = \alpha \cdot [AR] \quad (1.8)$$

maksimalni učinek je dosežen, ko so zasedeni vsi receptorji:

$$E_m = \alpha \cdot [R_t] \quad (1.9)$$

Intrinzična aktivnost je mera za sposobnost agonista, da izzove učinek, in ima lahko vrednosti od 0 do 1. Vrednost 1 imajo polni agonisti, vrednost 0 antagonist, vmesne vrednosti pa t.i. delni agonisti. Njihov maksimalni učinek je manjši od maksimalnega učinka polnih agonistov in lahko delujejo tudi kot antagonist. Precej zdravil kaže lastnosti delnih agonistov.

Z združitvijo enačb (1.7), (1.8) in (1.9) dobimo:

$$E = \frac{E_m \cdot [A]}{K_D + [A]} \quad (1.10)$$

Če enačbo (1.10) primerjamo z enačbo (1.1), vidimo, da EC_{50} ustreza K_D ; po klasični okupacijski teoriji je torej disociacijsko konstanto kompleksa agonist-receptor, K_D , mogoče določiti neposredno iz funkcije odnosa med koncentracijo agonista in učinkom.

Predpostavke tega pristopa pa ne držijo v vseh primerih. Pri poskusih z ireverzibilnimi antagonistami se je pokazalo, da pri nekaterih močnih agonistih za dosego maksimalnega učinka ni potrebna zasedenost vseh receptorjev. To je privedlo do t.i. **ničelnega pristopa** pri (okupacijskih) teorijah receptorjev, ki ga je uvedel Stephenson. V analizo odnosa med koncentracijo kompleksa AR in učinkom je uvedel nov pojem: *stimulus*, ki je premo sorazmeren koncentraciji kompleksa agonist-receptor. Sorazmernostni faktor je imenoval *učinkovitost* - e (efficacy). Funkcija, ki povezuje stimulus (S) s končnim učinkom agonista, **ni znana** (zato ničelni pristop) in je odvisna od tkiva, na katerem deluje agonist. Ti odnosi so ponazorjeni v naslednjih enačbah:

$$S = e \cdot [AR] \quad (1.11)$$

in

$$E = f(S) \quad (1.12)$$

Če združimo enačbe (1.7), (1.11) in (1.12), dobimo:

$$E = f\left(\frac{e \cdot [R_t] \cdot [A]}{K_D + [A]}\right) \quad (1.13)$$

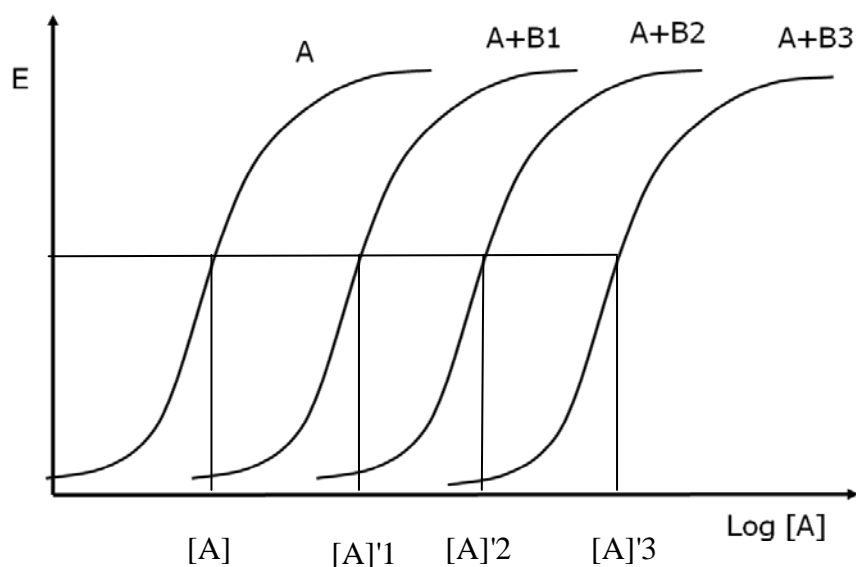
Pri tem sta funkcija f in $[R_t]$ lastnosti tkiva (celice), učinkovitost e in K_D pa lastnosti agonista.

Medtem ko je pri klasični okupacijski teoriji K_D mogoče določiti kar neposredno iz krivulje odnosa med koncentracijo in učinkom agonista (enak je ED_{50}), pa je pri Stephensonovi ničelni teoriji za to potreben še ireverzibilni antagonist in šele iz dveh krivulj (agonist sam in ob prisotnosti antagonist) lahko določimo disociacijsko konstanto kompleksa agonist-receptor, K_D .

Z napredovanjem molekularne farmakologije in z boljšim poznavanjem strukture in delovanja receptorjev je prišlo do razvoja **alosterične teorije**, ki temelji na **modelu dveh stanj** (two state model). Receptor naj bi obstajal v dveh oblikah, aktivni in neaktivni, ki lahko prehajata ena v drugo in sta njuni koncentraciji v ravnotežju. Ta teorija dopušča določeno aktivnost receptorskega sistema in s tem učinek tudi brez prisotnosti agonista. Vezava agonista, ta se veže predvsem na aktivno obliko, pomika ravnotežje na stran aktivne oblike in s tem povečuje učinek. Antagonist, ki se veže v enaki meri na obe obliki, ne spremeni osnovne aktivnosti receptorja, preprečuje pa vezavo agonistu. Zdravila, ki se z večjo afiniteto vežejo na neaktivno obliko receptorja, zmanjšujejo bazalno delovanje receptorja in se imenujejo **inverzni agonisti** ali **negativni antagonisti**.

Določanje učinkovitosti kompetitivnih antagonistov

Levi graf na sliki 1.3 lahko razširimo, tako da uporabimo več koncentracij kompetitivnega antagonist B (B_1 , B_2 in B_3), pri čemer je $B_1 < B_2 < B_3$. Večje koncentracije kompetitivnega antagonist pomaknejo krivuljo odnosa med koncentracijo agonista in učinkom bolj v desno (Slika 1.4).



Slika 1.4: Prikaz odnosa med koncentracijo agonista in učinkom, ko je agonist sam in ob prisotnosti rastočih koncentracij kompetitivnega antagonist B . $[A]'$ so molarne koncentracije agonista ob prisotnosti ustreznih koncentracij antagonist, ki izzovejo enak učinek kot $[A]$.

Kako lahko opišemo odnos med koncentracijo agonista in njegovim učinkom ob prisotnosti kompetitivnega antagonista? Ne glede na teorijo receptorjev lahko trdimo, da je ob enakih učinkih z agonistom zaseden enak delež receptorjev.

Iz enačbe 1.7 lahko izrazimo delež zasedenih receptorjev (y), ki ga opredelimo kot razmerje med koncentracijo kompleksa agonist-receptor (RA) in koncentracijo vseh receptorjev (R_t):

$$y = \frac{[A]}{[A] + K_A} \quad (1.14)$$

Ko je prisoten kompetitivni antagonist (B), je delež z agonistom zasedenih receptorjev (y') seveda manjši:

$$y' = \frac{[A]}{[A] + K_A (1 + [B] / K_B)} \quad (1.15)$$

pri tem je $[B]$ molarna koncentracija antagonista, K_B pa disociacijska konstanta kompleksa antagonist receptor.

Ob enakih učinkih je delež zasedenih receptorjev enak:

$$\frac{[A]}{[A] + K_A} = \frac{[A]'}{[A]' + K_A (1 + [B] / K_B)} \quad (1.16)$$

Pri tem je $[A]$ koncentracija agonista brez antagonista, $[A]'$ pa koncentracija agonista, ko je prisoten antagonist.

Iz enačbe 1.16 lahko izvedemo naslednjo povezavo:

$$\frac{[A]'}{[A]} - 1 = \frac{[B]}{K_B} \quad (1.17)$$

Če razmerje koncentracij agonista ob prisotnosti antagonista in agonista brez antagonista (in ki izzoveta enak učinek) označimo z DR (dose ratio – razmerje doz oz. koncentracij), vstavimo to v enačbo 1.17 in jo logaritmiramo, dobimo iz enačbe 1.17 izraz (Schildova enačba):

$$\log (DR - 1) = \log [B] - \log K_B \quad (1.18)$$

Enačba 1.18 je enačba premice. Če na ordinarno os nanašamo log (DR-1) na abscisno pa ustrezne logaritme koncentracije antagonista, dobimo na presečišču premice z abscisno osjo vrednost pA_2 , ki smo jo uvedli kot mero za učinkovitost antagonista že na začetku tega podglavlja in navedli, kako jo je opredelil Schild.

Navedimo nekaj lastnosti pA_2 :

- Visok pA_2 – velika specifičnost in učinkovitost antagonista (in narobe)
- Podobne vrednosti pA_2 za isti par agonist – antagonist na različnih tkivih (organih) – podobni receptorji
- Vrednosti pA_2 istih antagonistov v kombinaciji z različnimi agonisti so enake
- Različen pA_2 z istim antagonistom na različnih tkivih kaže na različne podtipe receptorjev.

Izolirani organi

Za študij odnosa med koncentracijo zdravila in učinkom navadno uporabljamo izolirane organe, ker je na njih učinek agonistov precej lažje merljiv in manj občutljiv za 'motnje' kot pri poskusih na celi živali, kjer homeostatski mehanizmi spremenijo osnovni učinek in je koncentracija agonistov in antagonistov ob receptorju spremenjena zaradi farmakokinetičnih dogajanj. Tako je na izoliranih organih lažje nadzorovati koncentracijo agonista na mestu delovanja, tj. ob receptorju.

Organ ali del organa izoliramo tako, da ga bolj ali manj odstranimo iz organizma, ga damo v posebno raztopino in tam merimo njegovo delovanje.

Izolirane organe uporabljamo za naslednje vrste poskusov:

- določanje parametrov odnosa med koncentracijo in učinkom za razne agoniste in določanje disociacijske konstante kompleksa agonist-receptor,
- primerjava učinkovitosti in moči različnih agonistov
- določanje vrste antagonizma in lastnosti antagonistov (pA_2),
- določanje (pod)tipov receptorjev (s pomočjo specifičnih antagonistov), na katere deluje določeno zdravilo,

Glede na stopnjo izolacije ločimo različne tipe izoliranih organov; največkrat se uporabljajo taki, ki so iz organizma povsem odstranjeni in dobivajo kisik, potrebne ione ter hranivo iz modificirane fiziološke raztopine, prirejene potrebam organa.

Glede na vrsto učinka so izolirani organi mišični, pri katerih na bolj ali manj direkten način merimo mišično kontrakcijo, in žlezni, pri katerih merimo sekretorni odgovor.

Mišično kontrakcijo merimo in registriramo na različne načine: čisto mehansko, ko se kontrakcija prenese in ojači preko vzvodov in mehansko zapisuje, ali z uporabo mehanskoelektričnih pretvornikov, ki kontrakcijo pretvorijo v električni signal, ki ga nato registriramo ali neposredno obdelamo z računalnikom.

Kot izolirane organe uporabljamo dele mišičnih organov poskusnih živali (diafragma, srce, črevo, uterus, duktus deferens, razne žile, traheja) ali žleze (želodec, slinavke), pač glede na to, katere agoniste in antagoniste oziroma katere receptorje želimo raziskovati.

Izolirani terminalni ileum budre

Pri našem eksperimentalnem delu bomo uporabljali izolirani terminalni del ileuma budre. Tkivni elementi, ki dajejo merljiv odgovor, tj. kontrakcijo, so gladke mišice v steni črevesa, kjer sta dve plasti mišičnih celic, cirkularna in longitudinalna. Drugi vzdražni element v steni črevesa so živci; črevesu zagotavljata avtonomnost peristaltičnega gibanja dva živčna pleteža: Meisnerjev in Auerbachov pletež; v tem lokalnem živčevju so prisotni tudi gangliji z ustreznimi receptorji. Mišično kontrakcijo lahko izzovemo neposredno z aktivacijo receptorjev na membrani mišičnih celic, poleg tega pa tudi posredno, z aktivacijo receptorjev na živčnih celicah ali v ganglijih. Mišico lahko stimuliramo tudi električno, pri čemer spet lahko vplivamo nanjo neposredno ali posredno preko živčnih elementov (to je mogoče doseči s prilagoditvijo parametrov stimulacije).

Receptorji na membrani različnih vrst gladkih mišic so prikazani na sliki 1.5. Od receptorjev, prikazanih na tej sliki, ne pridejo za kontrakcijo izoliranega črevesa budre v poštev receptorji za kateholamine (agonisti receptorjev α in receptorjev β), ker ti kontrakcijo inhibirajo (fiziološki antagonizem). Podobno velja za nekatere prostaglandine.

Hranilne (fiziološke) raztopine

Pri delu z izoliranimi organi se uporabljajo različne hranilne raztopine, ki izoliranemu organu omogočajo preživetje in delovanje. Njihova sestava je prilagojena potrebam izoliranega organa in tipu poskusa. Vsebujejo različne koncentracije ionov, puferskih sistemov, glukoze in še nekaterih drugih snovi. Raztopine so oksigenirane na različne načine (zrak, čisti kisik ali kisik s primesjo CO_2), od česar je odvisen tudi njihov pH. Sestava nekaterih hranilnih raztopin za izolirane organe je prikazana v tabeli 1.1. Za izolirani terminalni ileum budre uporabljamo Tyrodeovo raztopino.

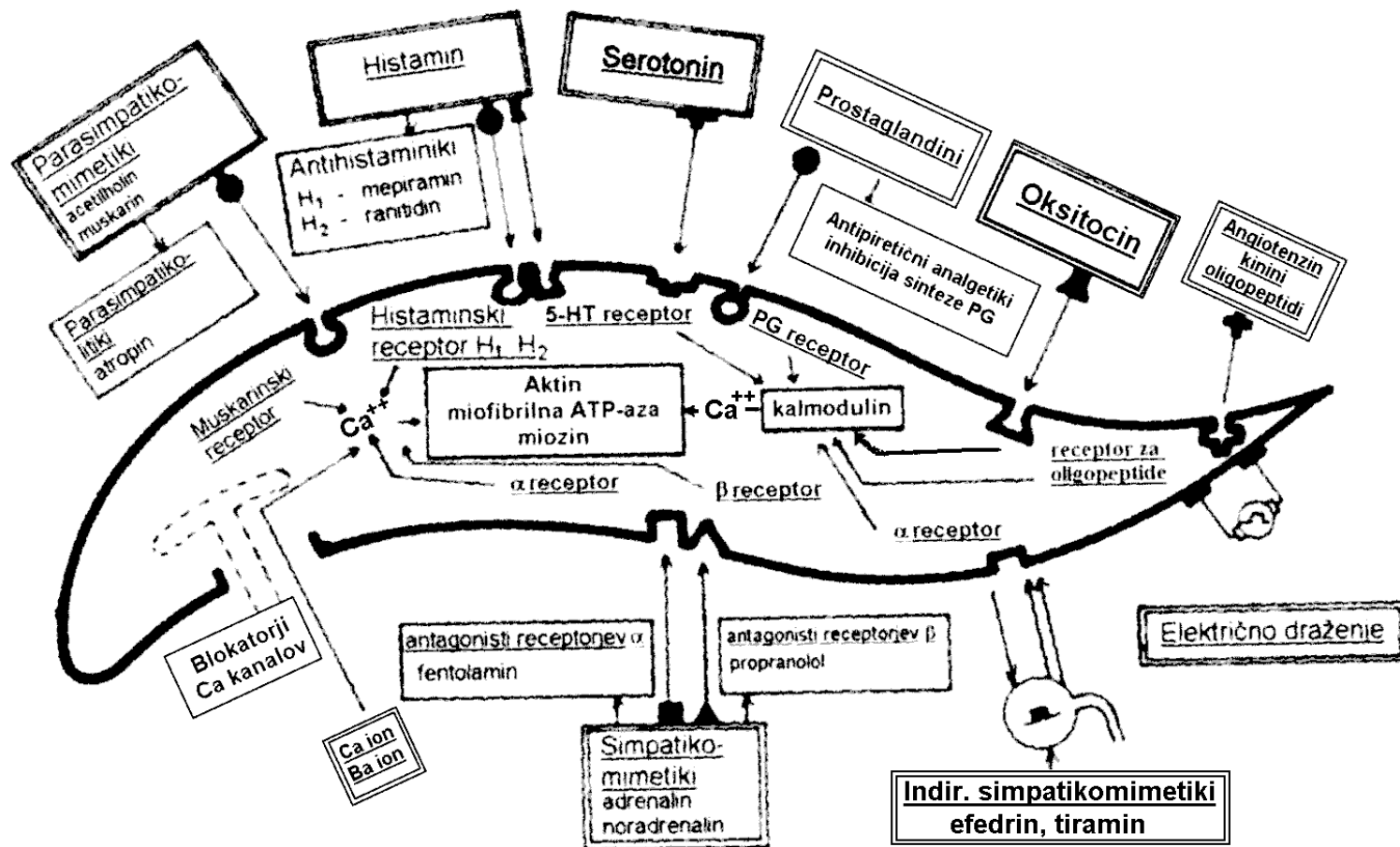
Kopel za izolirane organe

To je naprava, ki omogoča izoliranemu organu preživetje in dovoljuje registracijo in merjenje učinkov, ki jih pokaže organ (kontrakcija in sekrecija). Bistven del kopeli je posodica z izoliranim organom (kiveta), ki je napolnjena s hranilno raztopino. Kiveta ima cevi za dovajanje in odvajanje hranilne raztopine z nameščenimi ventili (ali stiščki na gumenih ceveh) za odpiranje dotoka in odtoka raztopine. V kiveti je tudi cevka za oksigenacijo raztopine in nastavek, na katerega namestimo izoliran organ. Pri nekaterih tipih poskusov so v kiveti tudi elektrode za električno stimulacijo organa. Na kiveti je oznaka za volumen, da lahko med poskusom vzdržujemo v njej vedno enak volumen raztopine in s tem kontroliramo koncentracijo dodanih snovi.

Pomemben del kopeli je grelec s termostatom, ki vzdržuje hranilno raztopino pri stalni temperaturi. Vdrževanje temperature tehnično dosežemo na različne načine. Pri nekaterih modelih je kiveta nameščena v večji posodi, napolnjena s termostatirano vodo, pri drugih pa ima kiveta dvojno steno, v vmesnem prostoru pa kroži termostatirana tekočina.

Tretja del je sistem za registracijo učinka. Pri mišičnih organih je prosti konec mišice (z enim koncem je pritrjena v kiveti) z nitko povezan s pretvornikom ali z vzvodom, ki kontrakcijo prenaša in ojači in jo zapisuje na kimografu. To je naprava z valjem, ki se obrača z določeno hitrostjo in na katerem se zapisujejo kontrakcije. Pri modernejših sistemih z mehansko električnimi pretvorniki se električni signal registrira na pisalniku ali se preko analogno-digitalnega pretvornika prenese neposredno v računalnik.

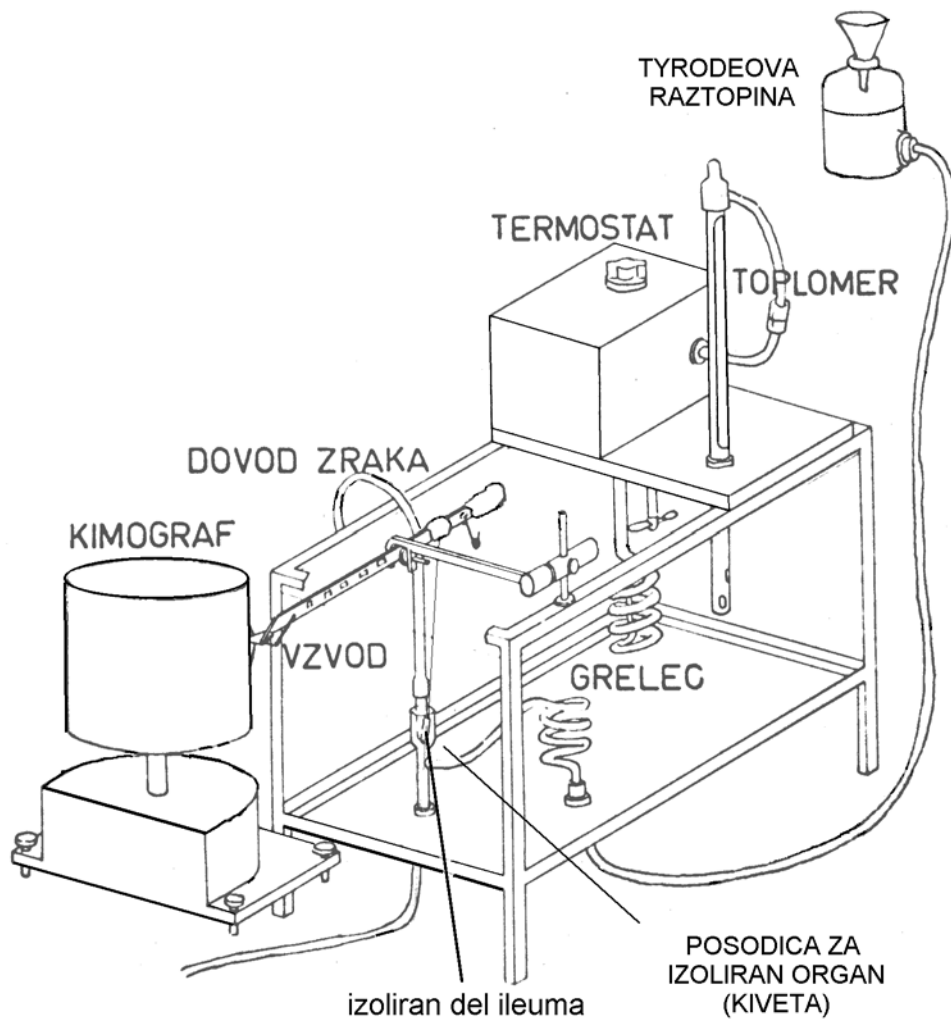
Kopel za izolirane organe je shematsko prikazana na sliki 1.6.



Slika 1.5: Shematski prikaz receptorjev na membrani gladke mišične celice. Snovi v okvirih z dvojno črto so agonisti, snovi v okvirih z enojno delujejo kot antagonisti raznih vrst. Dogajanja, ki povezujejo aktivacijo receptorjev s kontrakcijo, so prikazana poenostavljeno. 5-HT - 5-hidroksitriptamin, serotonin.

Tabela 1.1: Sestava nekaterih fizioloških raztopin, ki se uporabljajo pri delu z izoliranimi organi. Raztopine se imenujejo po avtorjih. pH raztopin določajo puferski sistemi, ki so v njih, in način oksigenacije: zrak ali kisik z dodatkom določene koncentracije CO₂ (vol %). Karbogen - mešanica O₂ (95%) in CO₂ (5%).

Vrsta fiziološke raztopine	Koncentracija sestavin [mmol/l]										
	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	MgSO ₄	NaHCO ₃	NaH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄	glukoza	Na-piruvat	plinska mešanica (oksidacija)
Tyrode	136,9	2,68	1,8	1,05	-	11,9	0,42	-	5,55	-	100 % O ₂ pH 7,9 + 3% CO ₂ pH 7,4 + 5% CO ₂ pH 6,8
Tyrode (znižan Ca ⁺⁺)	136,9	2,68	0,9	1,05	-	11,9	0,42	-	5,55	-	karbogen pH 7,2
Tyrode po Langendorfu (znižan Ca ⁺⁺ in K ⁺)	136,9	1,01	0,9	-	-	0,6	-	-	5,55	-	
Locke	157,4	5,63	2,09	-	-	1,78	-	-	5,55	-	100 % O ₂ pH 8,5 + 1% CO ₂ pH 6,8 + 5% CO ₂ pH 6,4
Krebs-Henseleit	118,0	4,7	2,52	-	1,64	24,88	-	1,18	5,55	2,0	karbogen pH 7,4
Ringer	153,9	2,68	1,8	-	-	1,19	-	-	-	-	100 % O ₂ pH 8,4 + 1% CO ₂ pH 6,7 + 5% CO ₂ pH 6,1
De Jalon	154,0	5,63	0,54	-	-	5,95	-	-	2,78	-	karbogen



Slika 1.6: Shematski prikaz kopeli za izolirane organe. Posoda s hranilno raztopino (Tyrodeova raztopina) je dvignjena nad kopel, da se, ko popustimi stišček na dovodni cevi, zaradi hidrostatskega pritiska napolni kiveta z izliranim organom (delom ileuma).

Določanje odnosa med koncentracijo in učinkom

Cilj vaje

- Ugotavljanje parametrov odnosa med koncentracijo acetilholina in njegovim učinkom, EC_{50} in E_m na dva različna načina,
- Ugotavljanje neznane koncentracije acetilholina.

Potek vaje

Vajo sestavlja eksperimentalni del ob kopeli za izolirane organe in obdelava pri tem dobljenih rezultatov.

Za vajo potrebujemo:

- Izoliran terminalni ileum budre v kopeli za izolirane organe
- raztopine acetilholina različnih koncentracij,
- brizgo za dodajanje raztopine acetilholina v kiveto,
- štoparico,
- ravnilo za merjenje velikosti kontrakcij.

Nekaj pojmov:

Spiranje preparata: Iz kivete z izoliranim delom ileuma izpustimo Tyrodeovo raztopino (popustimo stišček na odvodni cevi) in dotočimo novo (popustimo stišček na dovodni cevi) do oznake, ki kaže volumen kivete (10 ml).

Dodajanje raztopine agonista (antagonista): V injekcijsko brizgo vzamemo ustrezen volumen raztopine (ta naj ne presega 5% volumna kivete, 0,5 ml) in ga vbrizgamo v kiveto z izoliranim organom; pri tem pazimo, da se ne dotaknemo nitke, ki povezuje črevo s pretvornikom oziroma vzvodom, preko katerega se registrirajo kontrakcije.

Priprava izoliranega terminalnega ileuma budre

Po žrtvovanju poskusni živali (budri) odpremo trebušno votlino, odvzamemo terminalni (končni) del ileuma in ga prenesemo v Tyrodeovo raztopino, katere sestava je prikazana v tabeli 1. Od tega odrežemo 5 do 10 mm dolg kos in ga namestimo v kopel za izolirane organe. Ko se preparat uravnoteži v novih razmerah, to traja 15 do 30 minut, lahko začnemo s poskusom.

Izvedba vaje

Najprej speremo preparat. Nato začnemo z dodajanjem acetilholina. Na voljo imamo več raztopin in sicer v naslednjih koncentracijah:

$1 \cdot 10^{-6}$ M

$1 \cdot 10^{-5}$ M in

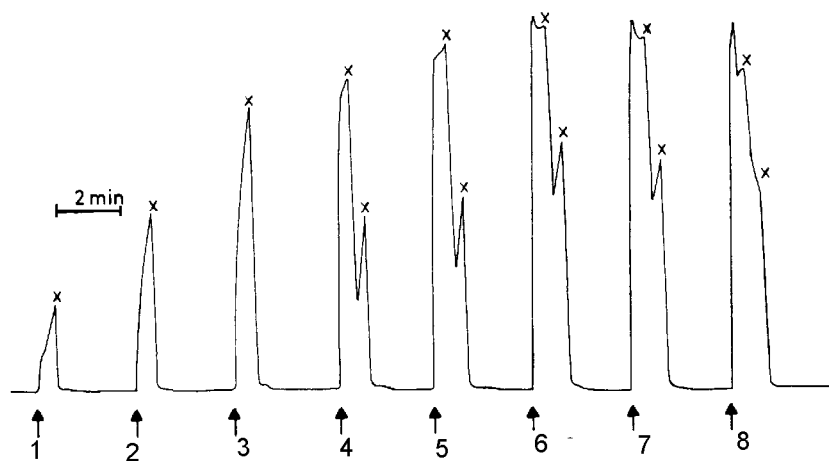
$1 \cdot 10^{-4}$ M

Najprej dodamo 0,1 ml raztopine z najnižjo koncentracijo, nato 0,2 ml in nato 0,5 ml iste raztopine, nato vzamemo raztopino z višjo koncentracijo acetilholina in spet dodajamo enake volumne kot prej.

Kako minuto pred vsakim dodatkom raztopine acetilholina vklopimo kimograf, pripravimo v brizgi ustrezen volumen raztopine acetilholina in ga dodamo v kiveto. Acetilholin pustimo učinkovati 30 sekund, nato ustavimo kimograf in speremo preparat. Počakamo, da se črevo relaksira do prvotne dolžine; pri višjih koncentracijah acetilholina bo morda potrebno še eno spiranje. Nato spet vklopimo kimograf, pripravimo naslednjo koncentracijo acetilholina in jo dodamo. Z dodajanjem nadaljujemo toliko časa, dokler ne dobimo (kljub rastočim koncentracijam acetilholina v kiveti) treh enako velikih kontrakcij, kar je znak, da smo dosegli maksimalni učinek; včasih se pri višjih koncentracijah učinek celo zmanjša.

Kontrakcije na papirju kimografa si označujemo z zaporednimi številkami, na dodatnem listu pa zapisujemo koncentracije acetilholina pri posameznih kontrakcijah. Ob koncu tega dela vaje naj bi na kimografu dobili zapis, podoben tistemu, ki je prikazan na sliki 1.7.

Ob koncu dodamo še 0,1 ml 0,2 ml in 0,5 ml raztopine z neznano koncentracijo acetilholina in določimo njihove učinke. Nato nekajkrat speremo preparat.



Slika 1.7: Zapis kontrakcij izoliranega ileuma budre pri naraščajočih koncentracijah acetilholina. Z x je označeno spiranje preparata. Kontrakcije so označene z zaporednimi številkami, v protokolu poskusa pa zapisujemo podatke o uporabljenih koncentracijah.

Obdelava rezultatov

Kontraksije ob različnih koncentracijah acetilholina izmerimo in rezultate vnesemo v tabelo. Iz dodanih volumnov in začetnih koncentracij acetilholina izračunamo koncentracije acetilholina v kiveti, pri čemer ne upoštevamo spremembe volumna v kiveti zaradi dodane raztopine. Koncentracije izrazimo v nmol/l ali v $\mu\text{mol/l}$. Nato koncentracije še logaritmiramo in izračunamo recipročne vrednosti koncentracij in ustreznih učinkov in vse te vrednosti vnesemo v tabelo.

Najprej narišemo graf, kjer na abscisno os nanašamo logaritem koncentracije acetilholina v kiveti, na ordinatno pa učinek (kontrakcijo) v mm. Skozi točke, dobljene v našem poskusu, na oko potegnemo krivuljo, kot je prikazana na desnem grafu slike 1.1, in iz nje ugotovimo maksimalni učinek, E_m , in ED_{50} . Iz tega grafa skušamo določiti tudi neznano koncentracijo acetilholina.

Za tem narišemo še graf, ki ga opisuje enačba (1.3), tako da na abscisno os nanašamo recipročno vrednost koncentracije acetilholina, na ordinatno pa recipročno vrednost učinka. Skozi tako dobljene točke skušamo potegniti premico in iz njenega presečišča z ordinatno osjo ugotoviti (recipročno vrednost) E_m . Tudi iz te premice je mogoče določiti neznano koncentracijo acetilholina.

Ko ugotovimo ED_{50} in na dva načina maksimalni učinek, določimo neznano koncentracijo acetilholina in odgovorimo na spodnja vprašanja, je vaja zaključena.

Vprašanja ob vaji

- ❖ Kaj je vplivalo na natančnost vaših poskusnih rezultatov?
- ❖ Koliko in kako vpliva določitev E_m na določitev ED_{50} ?
- ❖ Sta bila E_m , ugotovljena na en in drug način, enaka? Poskusite pojasniti morebitno neskladje.
- ❖ Katerim točkam bi pri grafu po Lineweaver- Burku dali večji pomen, tistim iz območja nižjih ali iz območja višjih koncentracij?

Določanje pA_2

Cilj vaje

- Določitev pA_2 iz podatkov za odnos med koncentracijo samega agonista in učinkom, dobljenih na 1. vaji, in iz podatkov za odnos med koncentracijo in učinkom agonista ob prisotnosti različnih koncentracij antagonistov; te podatke priskrbi vodja vaj.

Potek vaje

Vaja je računska. Potrebujemo kalkulator, s katerim lahko določimo logaritme.

Najprej ponovno narišemo graf odnosa med koncentracijo in učinkom za sam agonist, ki smo jih dobili na 1. vaji, nato na isti graf narišemo še krivulje odnosa med koncentracijo in učinkom za agonist ob prisotnosti različnih (rastočih) koncentracij antagonistov. Iz grafa nato odčitamo koncentracije agonista, ki povzročijo enako velik učinek in to za agonist sam in ob prisotnosti različnih koncentracij antagonistov. Najugodnejše je, da izberemo kar EC_{50} . Za vsako od koncentracij antagonistov nato določimo DR (enačba 1.17) in nato $\log(DR-1)$. Za tem narišemo Schildov graf (enačba 1.18), tako da na abscino os naneseemo $-\log[B]$ (molarne koncentracije antagonistov), na ordinatno os pa ustrezne $\log(DR-1)$. Skozi tako dobljene točke potegnemo premico in iz njenega presečišča z absisno osjo določimo pA_2 našega antagonistov.