

2. Vaja: Določitev odnosa med koncentracijo agonista in njegovim učinkom ob prisotnosti antagonista na izoliranem organu

Cilj vaje

- Ugotavljanje parametrov odnosa med koncentracijo acetilholina in njegovim učinkom, EC50 in Em ob prisotnosti različnih koncentracij atropina.
- Določanje pA2 atropina.

Potek vaje

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

1. EKSPERIMENTALNI DEL

Za vajo potrebujemo:

- izoliran terminalni ileum budre v kopeli za izolirane organe. 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.
- raztopine acetilholina različnih koncentracij: 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M.
- raztopine atropina različnih koncentracij: 10^{-7} M, 10^{-6} M, 10^{-5} M, 10^{-4} M.
- brizgo za dodajanje raztopine acetilholina in atropina v kiveto,
- štoparico,
- ravnilo za merjenje velikosti kontrakcij.

Izvedba vaje

Speremo preparat. 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).

Najprej določimo odnos med koncentracijo samega agonista (acetilholina) in njegovim učinkom. Acetilholin dodajamo na enak način, kot smo to naredili pri prvi vaji. Začnemo z najnižjo koncentracijo acetilholina in nadaljujemo z višjimi vse dokler ne dosežemo maksimalnega učinka acetilholina. Na kimografu si označujemo zaporedne številke kontrakcij, ki jih na koncu izmerimo in meritve vpišemo v protokol (tako kot smo to delali pri prvi vaji). Nato nekajkrat speremo preparat.

Nato določimo odnos med koncentracijo in učinkom agonista (acetilholina) ob prisotnosti različnih koncentracij antagonista (atropina). Zato popolnoma relaksiranemu izoliranemu črevesu dodamo 0,1 ml najmanjše koncentracije atropina (10^{-7} M) in pustimo delovati 10 min. Po desetih minutah preparat ne speremo, ampak dodamo 0,1 ml najnižje koncentracije acetilholina. Nadaljujemo z večjimi volumni in naraščajočimi koncentracijami acetilholina vse dokler ne dosežemo maksimalnega učinka. Na kimografu si označujemo zaporedne številke kontrakcij, ki jih na koncu izmerimo in meritve vpišemo v protokol. Nato nekajkrat speremo preparat. Postopek ponovimo še s preostalimi tremi višjimi koncentracijami atropina (10^{-6} M, 10^{-5} M in 10^{-4} M). Med posamezno inkubacijo atropina izmerimo kontrakcije prejšnjih meritev in si jih zapisujemo v protokol. Pri višjih koncentracijah atropina meritve začnemo z najmanjšo koncentracijo acetilholina, ki je pri prejšnji meritvi še izzvala kontrakcijo.

2. OBDELAVA REZULTATOV

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. Nato koncentracije še logaritmiramo in narišemo semilogaritemsko krivuljo, kjer na abscisno os nanašamo logaritem koncentracije acetilholina v kiveti, na ordinatno os pa učinek (kontrakcijo) v mm. Skozi dobljene točke potegnemo krivuljo, in iz nje ugotovimo EC50. Na enak način (v isti graf) narišemo še ostale krivulje, ki prikazujejo odnos med koncentracijo in učinkom agonista (acetilholina) ob prisotnosti različnih (rastočih) koncentracij antagonistov (atropina). Na vsaki krivulji posebej določimo EC50 in ga vpišemo v tabelo (glej protokol).

Za vsako od koncentracij antagonistov določimo razmerje doz DR ($DR=A/A'$; A = EC50 agonista, A' = EC50 agonista ob prisotnosti antagonistov) in nato $\log(DR-1)$. Za tem narišemo Schildov graf (enačba: $\log(DR-1) = \log B - \log K_B$). Na abscisno os naneseemo $-\log[B]$ (B = molarna koncentracija antagonistov), na ordinatno os pa ustrezne $\log(DR-1)$. Za kompetitivni antagonizem velja: $pA_2 = -\log K_B$ (K_B = konstanta disociacije antagonistov). Skozi tako dobljene točke potegnemo premico. Presečišče tako dobljene premice z abscisno osjo je $\log K_B$ oziroma **pA₂** atropina.

Vprašanja ob vaji

- Kakšna je najmanjša koncentracija atropina, pri kateri ste opazili premik krivulje?
- O kateri vrsti antagonizma lahko govorimo v tem primeru?
- Ali so vrednosti pA₂ pri vseh skupinah enake? Zakaj?
- Ali spiranje izoliranega organa vpliva na delovanje antagonistov?