

Univerza v Ljubljani
Medicinska fakulteta



Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo
Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani

PRAKTIKUM IZ SPLOŠNE FARMAKOLOGIJE IN TOKSIKOLOGIJE

Navodila za vaje za študente
medicine, dentalne medicine in farmacije

Katarina Černe
Ilonka Ferjan
Mojca Kržan
Metoda Lipnik-Štangelj
Lovro Stanovnik
Lovro Žiberna

Ljubljana, 2015

KOLOFON

Naslov, podnaslov: Praktikum iz splošne farmakologije in toksikologije, Navodila za vaje za študente splošne medicine, dentalne medicine in farmacije.

Avtorji: doc. dr. Katarina Černe, asist. dr. Ilonka Ferjan, prof. dr. Mojca Kržan, prof. dr. Metoda Lipnik – Štangelj, izr. prof. dr. Lovro Stanovnik, doc. dr. Lovro Žiberna

Ilustrator: Matic Kržan

Fotograf: Bogdan Martinčič

Recenzenta: doc. dr. Sergej Pirkmajer, doc. dr. Miran Brvar

Podatki o izdaji ali natisu: 1. izdaja

Založnik: Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija.

Kraj izida: Ljubljana

Leto izida: 2015

Naklada (podatek o številu natisnjenih izvodov): elektronski vir
publikacija bo elektronska v formatu PDF. Nahajala se bo na naslovu: <http://www.mf.uni-lj.si/media-library/2015/09/afx7a5f9e8629672b7bd9wht2025.pdf>

Enotna maloprodajna cena publikacije: brezplačen dostop

PREDGOVOR

V naših študijskih letih so nam tri vaje iz Farmakologije in eksperimentalne toksikologije ponazorile usodo snovi, ki bi lahko postala zdravilo. V prvih dveh vajah smo preverili učinkovitost snovi (acetilholina) na izoliranem organu (izoliranem tankem črevesu budre), v drugi pa smo mišim intraperitonealno vbrizgali neznano snov in na podlagi njihovega vedenja sklepali, ali smo mišim vbrizgali antipsihotik, uspavalo ali fiziološko raztopino. V tretji vaji smo se srečali z dvojno slepim poskusom. Asistent ali demonstrator nam je naključno dodelil atropin ali laktozo v farmacevtski obliki razdeljenega praška. In potem smo si merili krvni tlak, pulz, premer zenice in ugotavljali kako je suhostjo naše kože in sluznic. In potem smo s sončnimi očali odkolesarili v sončen majski večer ali pa ubogali starejše kolege in šli z razširjenimi zenicami v kino.

Šele konec prejšnjega tisočletja (1999) so kolegi (Lovro Stanovnik, Ladko Korošec in Tatjana Irman-Florjanc) poskrbeli za prvi učbenik Izbrana poglavja iz farmakologije, s katerim so se študentje še ducat let novega tisočletja pripravljali na vaje iz farmakologije. In potem je prišla bolonjska reforma študija, predmet Farmakologija in eksperimentalna toksikologija se je za študente splošne medicine razdelil v tri predmete, za študente dentalne medicine letos še zadnjič poteka v enem predmetu. Obseg predmeta se je pa zmanjšal za tretjino. Tudi študentje farmacije imajo četrtno manj stika s farmakologijo kot so jo imeli starejši kolegi. Sočasno sprejeta zakonodaja nam je prepovedala uporabo poskusnih živali v pedagoške namene, zato smo morali posneti vajo z miškami in vam jo zdaj predvajamo. Kljub temu da nam je Republiška komisija za medicinsko etiko izdala dovoljenje za vajo z atropinom, smo se odločili, da je ne izvajamo več. Po novem študentje še vedno na izoliranih delih tankega črevesa budre preverjajo delovanje acetilholina in rišejo krivulje odnosa med koncentracijo in učinkom. V drugi vaji preverijo, če antagonist spodrine agonist z vezavnih mest in spremeni učinek. V tretji vaji spoznajo osnove farmakokinetike; v četrti si študentje ogledajo poskus na celi živali, ki se ji vbrizga snov, ki deluje na osrednje živčevje; in v zadnji vaji spoznajo zastrupitev z organofosfati. Za prvo generacijo bolonjskih študentov smo pripravili teoretične osnove in protokole vaj, ki so bili dostopni na spletni strani Inštituta za farmakologijo in eksperimentalno toksikologijo. Za peto bolonjsko generacijo študentov medicine, dentalne medicine in farmacije smo sodelavci Inštituta nadgradili študijsko gradivo in izdali dva spletna učbenika: 'Splošno farmakologijo in toksikologijo 1' in 'Praktikum iz splošne farmakologije in toksikologije'.

Upamo, da vam bosta učbenika olajšala prvi stik s splošno farmakologijo in toksikologijo.

KAZALO

VAJA 1: Določanje odnosa med koncentracijo in učinkom na izoliranem organu.....	5
VAJA 2: Določitev odnosa med koncentracijo agonista in njegovim učinkom ob prisotnosti antagonist na izoliranem organu	16
VAJA 3: Farmakokinetika	22
VAJA 4: Neklinično preizkušanje zdravil z učinkom na osrednje živčevje.....	23
VAJA 5: Osnovni vidiki klinične in eksperimentalne toksikologije – Toksični učinki organofosfornih insekticidov in karbamatov	37

VAJA 1: Določanje odnosa med koncentracijo in učinkom na izoliranem organu

NAMEN VAJE

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

UVOD

Izolirani terminalni ileum budre

Pri našem eksperimentalnem delu bomo uporabljali izolirani terminalni del ileuma budre. Tkivni elementi, ki dajejo merljiv odgovor, t.j. 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: Meissnerjev 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).

Na membrani različnih vrst gladkih mišic so prisotni številni različni receptorji. Za kontrakcijo izoliranega črevesa budre pridejo med drugimi v poštev holinergični, histaminergični receptorji in receptorji za nekatere prostaglandine. Receptorji za kateholamine (α in β), v glavnem posredujejo relaksacijo gladke mišice. 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 CO₂), 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.

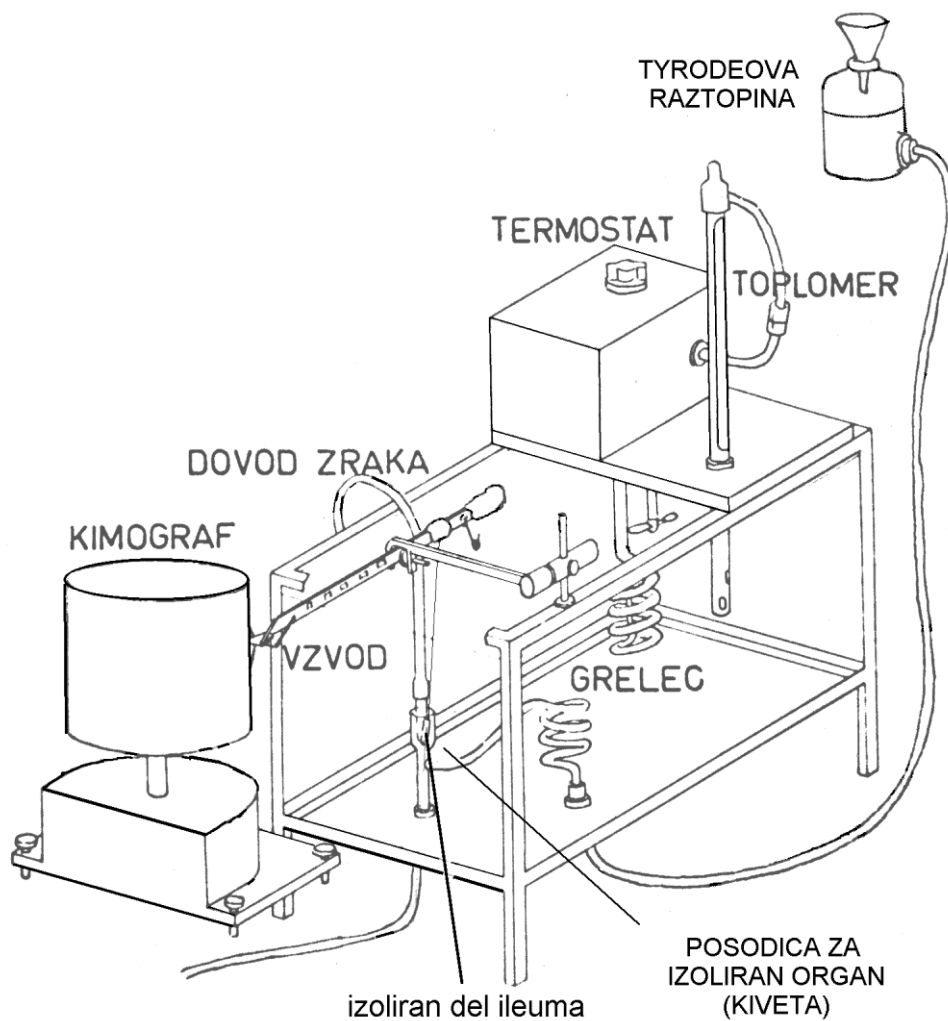
Pomemben del kopeli je grelec s termostatom, ki vzdržuje hranilno raztopino pri stalni temperaturi. Vdrževanje temperature tehnično dosežemo na različne načine. Pri nekaterih modelih je kiveta nameščena v večji posodi, napoljnjeni s termostatirano vodo, pri drugih pa ima kiveta dvojno steno, v vmesnem 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 1.1.

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 (oksigenacija)
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 1.1: Shematski prikaz kopeli za izolirane organe. Posoda s hranilno raztopino je dvignjena nad kopel, da se, ko odpremo dovodno cev, zaradi hidrostatskega pritiska napolni kiveta z izoliranim organom.

IZVEDBA 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.

Potek poskusa na izoliranem organu

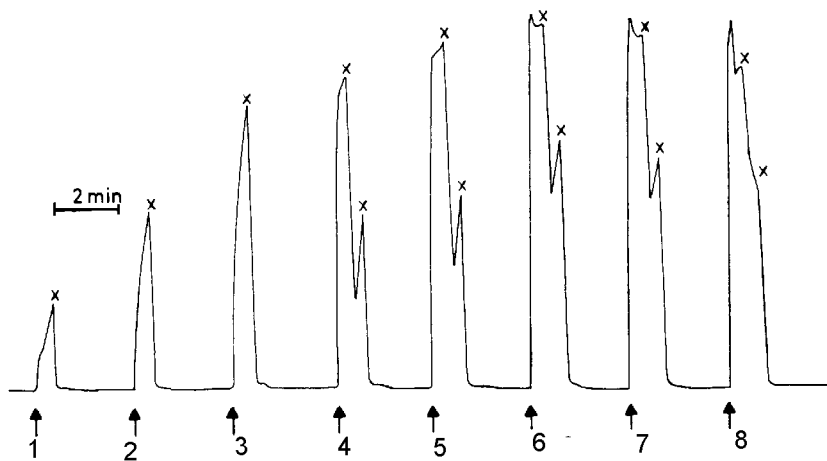
Najprej speremo preparat. Nato začnemo z dodajanjem acetilholina. Na voljo imamo več raztopin in sicer v naslednjih koncentracijah: 10^{-6} M, 10^{-5} M in 10^{-4} M.

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 1.2.

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 1.2: 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

Kontrakcije 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 neznan koncentracijo acetilholina.

Za tem narišemo še graf po *Lineweaver-Burkovi* enačbi:

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

Graf rišemo 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 neznan koncentracijo acetilholina.

Ko ugotovimo ED_{50} in na dva načina maksimalni učinek, določimo neznan 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?

POROČILO LABORATORIJSKE VAJE

Vaja 1: **Določitev odnosa med koncentracijo agonista in njegovim učinkom na izoliranem organu**

Ime in priimek:

datum: _____

koncentracija ACh v izhodni raztopini (M)	volumen (mL)	Koncentracija ACh v kivetu (M)	log konc. ACh	kontrakcija (mm)
10^{-6}	0,1			
	0,2			
	0,5			
10^{-5}	0,1			
	0,2			
	0,5			
10^{-4}	0,1			
	0,2			
	0,5			
neznana koncentracija	0,1			
	0,2			
	0,5			

Em=

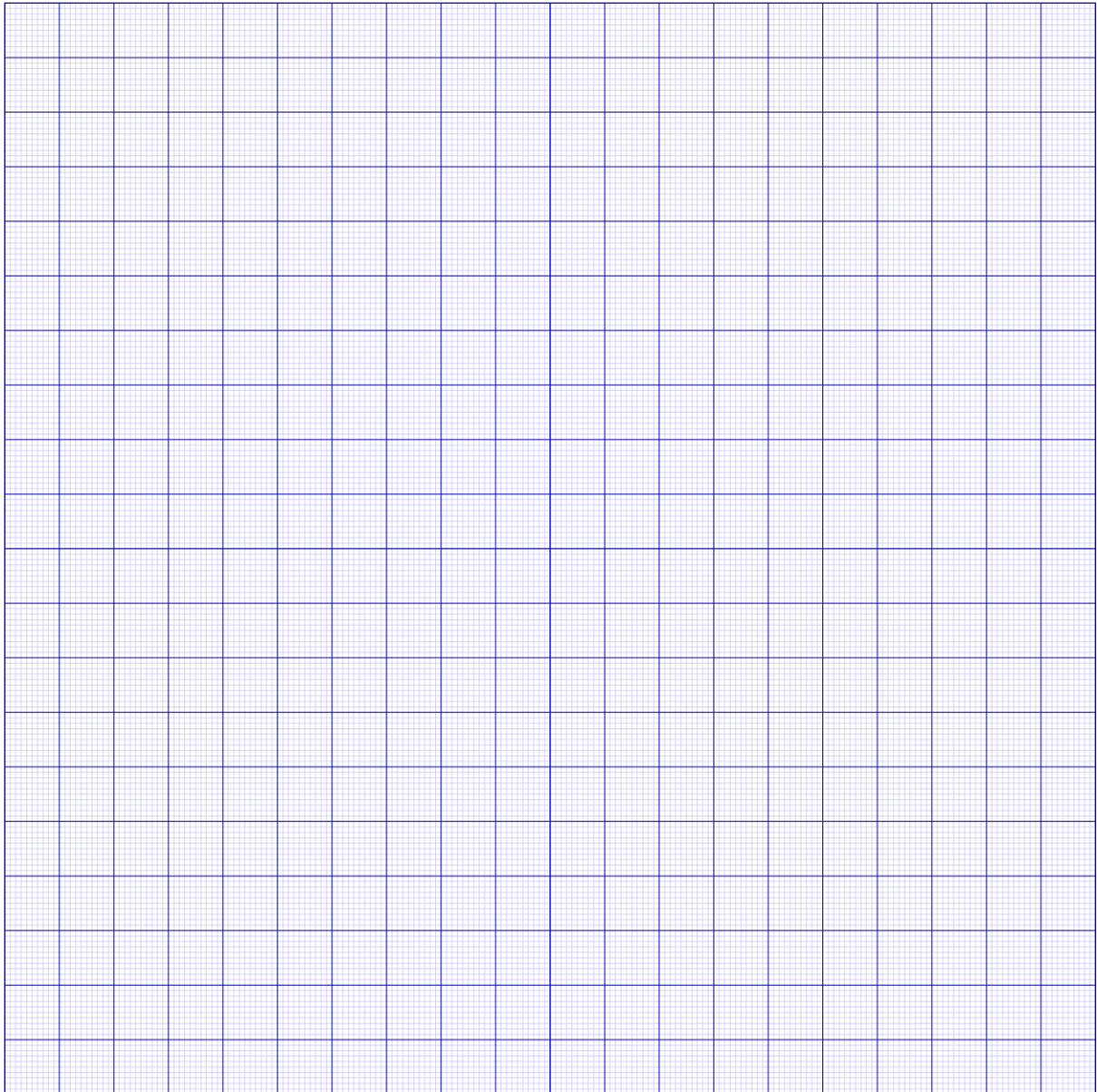
Em=
(Lineweaver-Burk)

EC₅₀=

C_x =

POROČILO LABORATORIJSKE VAJE

Graf 1. Krivulja odnosa med koncentracijo acetilholina in učinkom (kontraktcija) na izoliranem terminalnem delu ileuma budre.

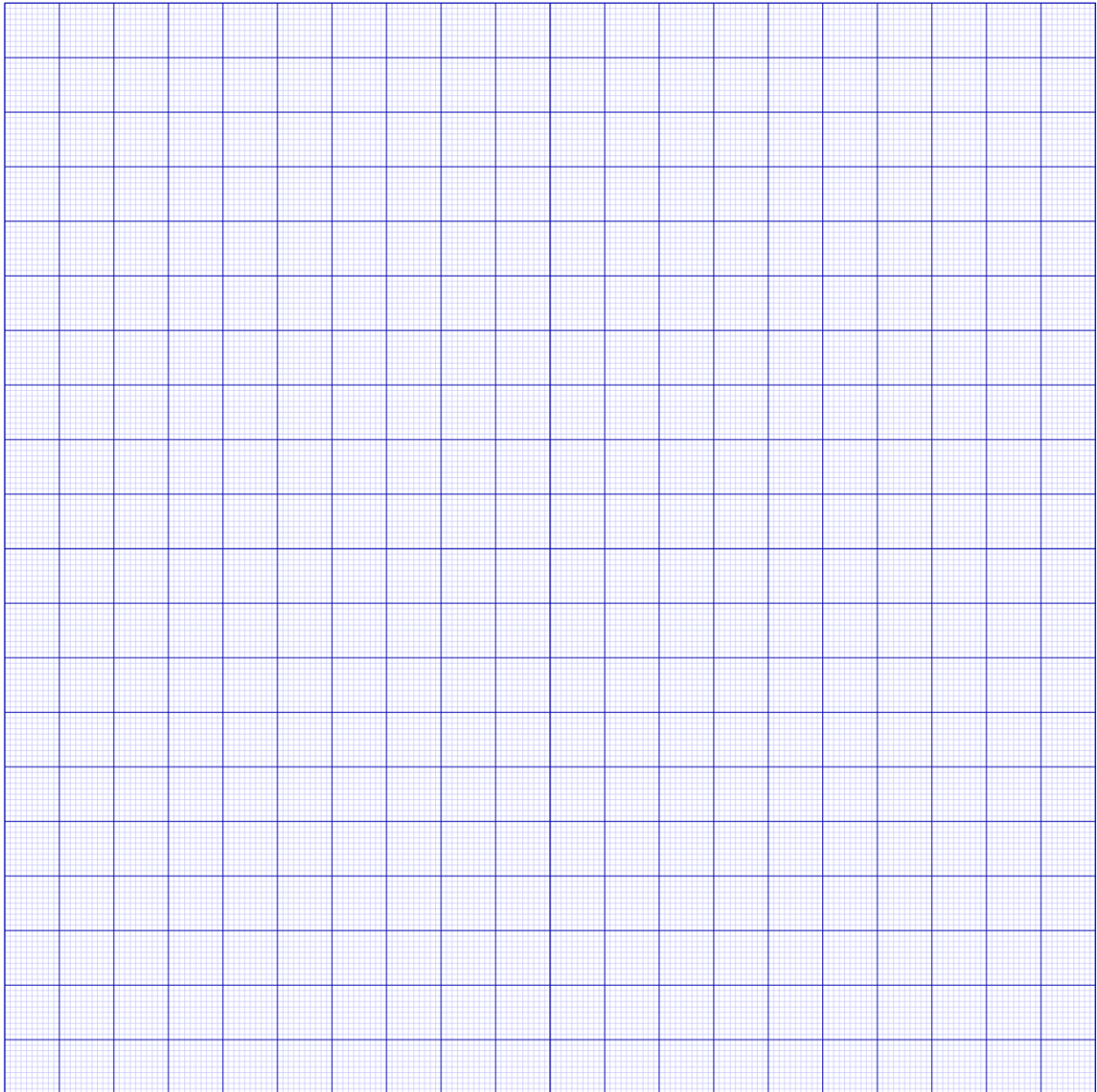


Odnos med koncentracijo agonista [A] in njegovim učinkom (E):

$$E = \frac{E_m \cdot [A]}{EC_{50} + [A]}$$

POROČILO LABORATORIJSKE VAJE

Graf 2. Lineweaver-Burkov diagram odnosa med koncentracijo acetilholina in učinkom (kontrakcija) na izoliranem terminalnem delu ileuma budre.



Lineweaver-Burkova enačba:

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

VAJA 2: Določitev odnosa med koncentracijo agonista in njegovim učinkom ob prisotnosti antagonist na izoliranem organu

NAMEN VAJE

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

IZVEDBA 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. 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 1.1. 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.

Potek poskusa na izoliranem organu

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 kumulativen način, to pomeni, da kivete med posameznimi dodatki acetilholina ne spiramo. 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. Nato nekajkrat speremo preparat in počakamo, da pride do popolne relaksacije črevesja.

Nato določimo odnos med koncentracijo in učinkom agonista (acetilholina) ob prisotnosti različnih koncentracij antagonistov (atropina). Zato popolnoma relaksiranemu izoliranemu črevesu dodamo 0,1 ml najmanjše koncentracije atropina (10^{-7} M) in pustimo delovati 10 min. Po desetih minutah preparata ne speremo, ampak dodamo 0,1 ml najnižje koncentracije acetilholina. Nadaljujemo z naraščajočimi koncentracijami acetilholina vse dokler ne dosežemo maksimalnega učinka (podobno kot smo naredili v začetnem kontrolnem poskusu brez antagonistov). Na kimografu si označujemo zaporedne številke kontrakcij, ki jih na koncu izmerimo in meritve vpišemo v protokol. Nato nekajkrat speremo preparat in počakamo, da pride do popolne relaksacije črevesja.

Postopek ponovimo še s preostalimi tremi višjimi koncentracijami atropina (10^{-6} M, 10^{-5} M in 10^{-4} M), ki jih prav tako pustimo učinkovati 10 min pred začetkom dodajanja agonista. 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.

Obdelava rezultatov

Iz dodanih volumnov in začetnih koncentracij acetilholina izračunamo koncentracije acetilholina v kiveti, pri čemer moramo biti pozorni, da 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: $\log(DR-1) = \log B - \log KB$). Na abscisno os nanese $-\log[B]$ (B = molarna koncentracija antagonistov), na ordinatno os pa ustrezne $\log(DR-1)$. Za kompetitivni antagonizem velja: $pA_2 = -\log KB$ (KB = konstanta disociacije antagonistov). Skozi tako dobljene točke potegnemo premico. Presečišče tako dobljene premice z abscisno osjo je $\log KB$ 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?

POROČILO LABORATORIJSKE VAJE

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

Ime in priimek:

konc. ACh v izhodni raztopini	dodan volumen (mL)	konc. ACh v kivetu (nM)	log konc. ACh	kontrakcija (mm)	koncentracija atropina v kivetu			
					10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁶ M
10 ⁻⁶ M	0,1							
	0,2							
	0,5							
10 ⁻⁵ M	0,1							
	0,2							
	0,5							
10 ⁻⁴ M	0,1							
	0,2							
	0,5							
10 ⁻³ M	0,1							
	0,2							
	0,5							
10 ⁻² M	0,1							
	0,2							
	0,5							
10 ⁻¹ M	0,1							
	0,2							
	0,5							

Legenda:

A..... EC₅₀ agonista

A'..... EC₅₀ agonista ob prisotnosti antagonista

DR (dose ratio)..... razmerje A'/A

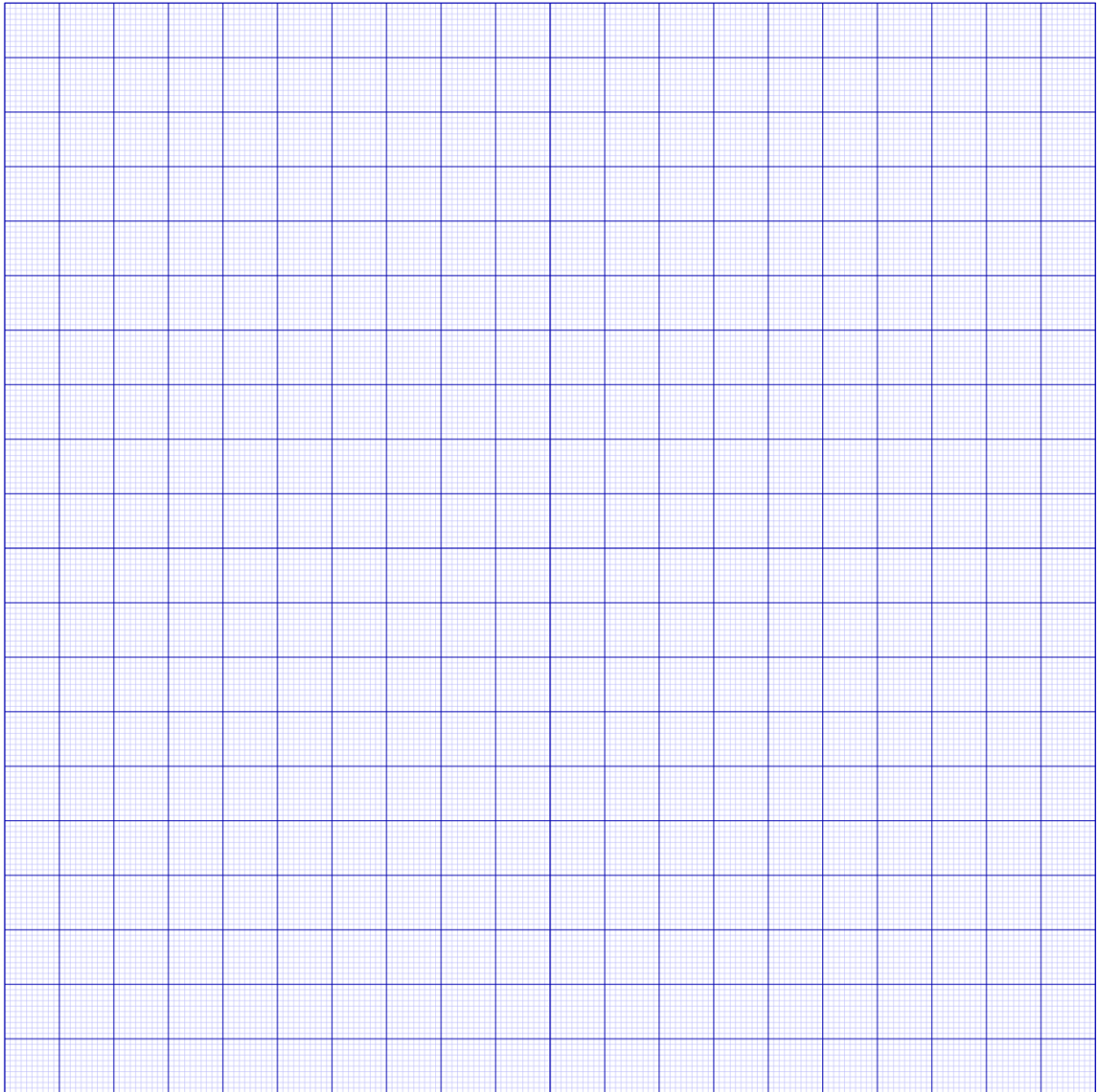
B..... koncentracija atropina

konc. atropina (M)	log A'	A'	DR	- log B	log (DR-1)
10 ⁻⁷ M					
10 ⁻⁶ M					
10 ⁻⁵ M					
10 ⁻⁴ M					

pA2=

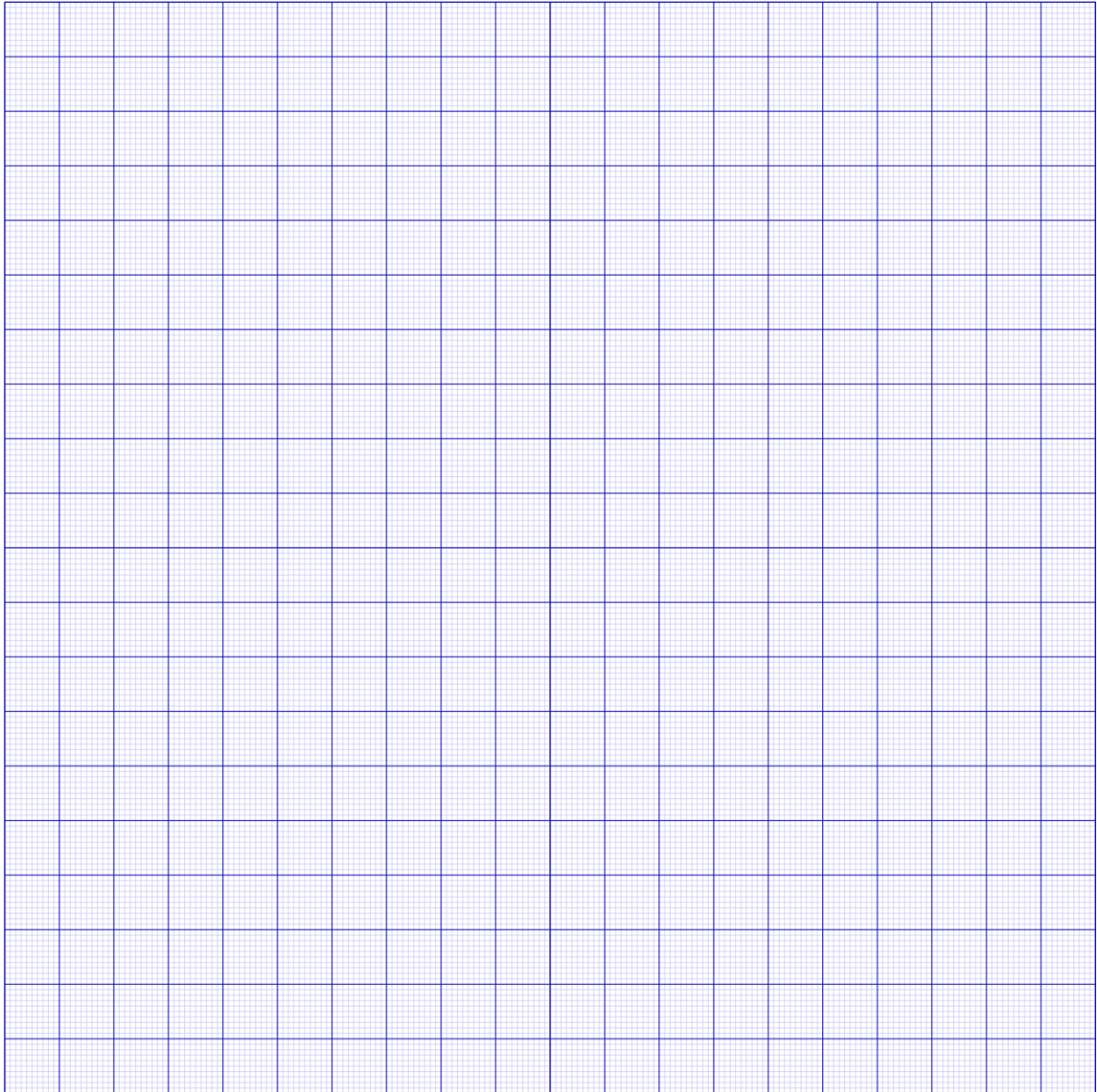
POROČILO LABORATORIJSKE VAJE

Graf 1. Krivulje odnosa med koncentracijo in učinkom agonista (acetilholina) brez (kontrolna krivulja) in ob prisotnosti različnih koncentracij (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M) antagonista (atropina).



POROČILO LABORATORIJSKE VAJE

Graf 2. Schildov graf odnosa med koncentracijo in učinkom acetilholina ob prisotnosti različnih koncentracij atropina (10^{-9} M, 10^{-8} M, 10^{-7} M, 10^{-6} M).



VAJA 3: Farmakokinetika

NAMEN VAJE

Uporaba farmakokinetičnih parametrov V_d , Cl , $t_{1/2}$, C_{max} , C_{ss} , AUC , k_e in spoznavanje odnosov med posameznimi parametri.

IZVEDBA VAJE

Po kratkem teoretičnem uvodu študentje rešujejo naloge iz klinične farmakologije, pri katerih se vsaj eden od farmakokinetičnih parametrov spreminja. Vsak študent bo eno izmed nalog predstavil pred tablo in potem pravilnost preveril v vnaprej pripravljene Excelovi datoteki, ki vsebuje simulacije osnovnih farmakokinetičnih modelov. Ob vsakem vprašanju oz. odgovoru asistent na vaji razloži in pokomentira pravilen odgovor. Vaja je interaktivna, kjer je množica pestrih vprašanj neskončna.

VPRAŠANJA OB VAJI

Kdaj in zakaj se pri zdravljenju farmakokinetični parametri spreminjajo?

Ali na spremembo parametrov vplivajo zdravila, zdravnik in/ali bolnik?

V kateri veji medicine je potrebno še posebej paziti na farmakokinetične parametre?

VAJA 4: Neklinično preizkušanje zdravil z učinkom na osrednje živčevje

NAMEN VAJE

Predstavitev preizkušanja zdravil *in vivo*, ki spada v predklinično testiranje tako učinkovitosti kot toksičnosti. V kasnejšem študiju se študentje srečujejo z bolniki, kjer je vrednotenje delovanja zdravil na vedenje zaradi kompleksnosti položaja manj pregledno in težje. Ker se v zadnjih letih predpisuje vse več psihotropnih zdravil, je pomembno, da študentje nazorno spoznajo individualne razlike v odzivnosti na zdravilo, kjer je sposobnost dobrega opazovanja bistvenega pomena.

IZVEDBA VAJE

Vaja je zaradi zaščite poskusnih živali v obliki videa. V izobraževalni namen so kljub temu opisane vse tehnične podrobnosti poskusa.

Za vajo potrebujemo:

- 3 laboratorijske miši, samci (C57BL/6J)
- fiziološka raztopina (kontrola)
- vodna raztopina klorpromazin klorida (1×10^{-3} M)
- vodna raztopina fenobarbitonnatrija ($3,5 \times 10^{-2}$ M)
- testne naprave (cev, palica, žica, kletka za Spontano Motorično Aktivnost)
- tehnica
- 1 ml brizga
- štoparica
- protokoli za vpisovanje podatkov

V skupini so tri miši. Pred aplikacijo izvedemo kontrolne poskuse s pomočjo 4 različnih testov (čas 0), da ugotovimo, kakšne so motorične sposobnosti in vedenje posamezne miške.

Posamezni miški intraperitonealno injiciramo s šiframi označene raztopine antipsihotika - klorpromazina, uspavala - fenobarbitona in za kontrolo fiziološko raztopino. Volumen injicirane raztopine je 0,01 ml/g telesne mase. Miške damo nazaj v steklenice in opazujemo njihovo vedenje. Testiramo jih 10, 15 in 20 minut po aplikaciji.

Naloga študentov je ugotoviti, katera od 3 mišk je dobila uspavalo, antipsihotik in fiziološko raztopino. Testiranje *in vivo* je bilo posneto na film.

Opis posameznih testov: namen, izvedba in naloge študentov

Na vaji bomo miške testirali s pomočjo 4 testov za preskušanje snovi z delovanjem na OŽ:

1. Test dimnika ali cevi.
2. Test vrteče se palice.
3. Test žice.
4. Test spontane motorične aktivnosti.

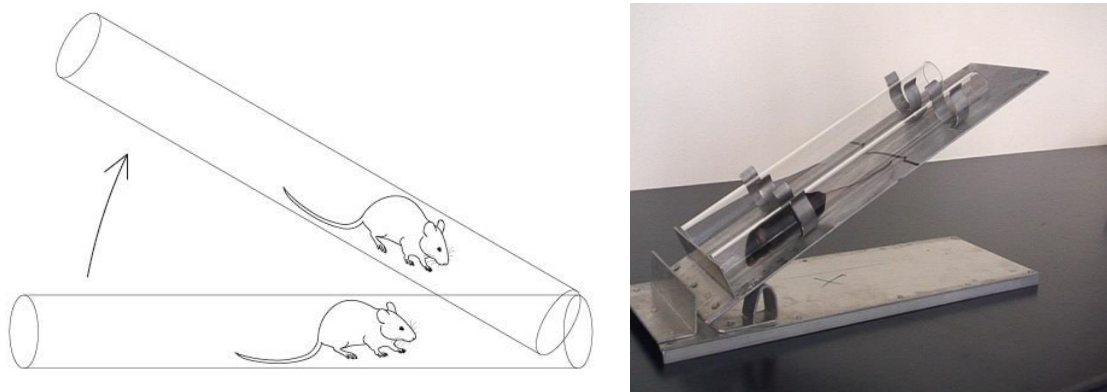
1. Test dimnika – cevi (Chimney test) (Boissier JR et al 1960; Palissa A, Becker A 1986)

Namen testa

Test dimnika je namenjen preskušanju motoričnih sposobnosti (refleksa negativne geotakse, živčno-mišične koordinacije, mišične moči) kot tudi psihičnega nivoja (raziskovanje, strah). Boissier je test prvič opisal kot presejalni test za ugotavljanje učinkov psihofarmakov pri miših.

Tehnični podatki (Slika 4.1)

2 stekleni cevi dolgi 30 cm (oznaka pri dolžini 20 cm) dveh različnih premerov, ki ustrezata dvema različnima velikostma miši. Cevi sta pritrjeni na plošči, ki jo lahko dvignemo.



Slika 4.1: Test dimnika – cevi.

Izvedba testa

Izvajalec poskusa rokuje z mišmi. Preden izvajalec mišim injicira raztopino zdravila oz. fiziološko raztopino, preskusi njihove sposobnosti in vedenje (čas 0 min). Steklена cev, katere velikost ustreza velikosti miši, je pripeta na plošči. Cev je tako široka, da miš lahko zleze vanjo, a se ne more obrniti. Na eni strani ima cev zaprto odprtino. Oznaka na cevi je pri dolžini 20 cm. Izvajalec poskusa da miš z glavo naprej v cev. Ko pride žival do konca cevi, cev dvigne, tako da je žival obrnjena z glavo navzdol (smrček se dotika dna). Sedaj bo miš poskušala zadensko splezati iz cevi. Študentje izmerijo čas, ki ga miš porabi, da spleza iz cevi (od takrat ko smo cev dvignili, dokler miš s konico smrčka ne doseže oznake na cevi). Izmerijo tudi latentni čas, dokler miš ne začne plezati. Če miš ne doseže oznake v 30 sekundah, jo izvajalec poskusa vzame iz cevi in študentje označijo v protokolu kot »ni opravljeno« (NO). Obenem študentje opazujejo vedenje (npr.: miš poskuša splezati iz cevi, saj jo normalno navpični položaj moti) in opažanja zapišejo pod "ostalo". Ugotovijo tudi, če je prišlo do defekacije. Test ponovimo 10, 15 in 20 minut po tem, ko so miši dobile uspavalno, antipsihotik in fiziološko raztopino.

Naloga študentov

Študentje bodo izmerili čas, ki ga vsaka od treh miši potrebuje, da se zadensko vzpne iz cevi ter latentni čas, ki preteče dokler žival ne začne plezati oz. ne poskuša plezati. Obenem bodo dobro opazovali vedenje živali med testiranjem in ugotovili, če je žival poskušala splezati, a ni zmogla ter ali je prišlo do defekacije. S pomočjo rezultatov testiranja in dobrega opazovanja bodo skušali ugotoviti, katera miš je dobila uspavalno, antipsihotik in fiziološko raztopino.

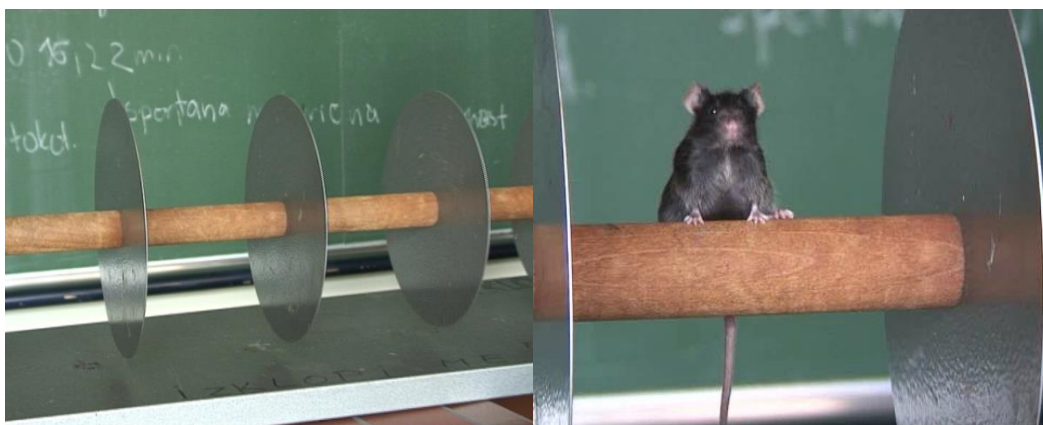
2. Test vrteče se palice (Rotarod) (Dunham NW, Miya TS 1957)

Namen testa

Test vrteče se palice je namenjen preskušanju motoričnih sposobnosti in ravnotežja. Dunham in Miya sta prvič opisala test za ugotavljanje nevroloških motenj pri miših in podganah. Poleg preizkušanja zdravil, ki vplivajo na motoriko, lahko z njim odkrijemo poškodbe bazalnih ganglijev in cerebeluma.

Tehnični podatki (Slika 4.2)

Palica, ki se vrti s stalno hitrostjo 10 do 14 obratov v minuti.



Slika 4.2: Test vrteče se palice.

Izvedba testa

Izvajalec poskusa rokuje z mišmi. Preden izvajalec mišim injicira raztopino zdravila oz. fiziološko raztopino, preskusi njihove sposobnosti in vedenje (čas 0 min). Izvajalec poskusa na palico nežno položi miško v nasprotni smeri vrtenja palice. Študentje opazujejo in izmerijo čas, dokler miš ne pade s palice. Normalno se miš prestopa in tako ostane na vrhu palice. Če miš po 30 sekundah ostane na vrhu palice, označimo v protokolu kot »opravljeno« (O), miš pa izvajalec poskusa vzame s palice. Študentje bodo ugotovili tudi, če se miš vrti skupaj s palico. Hitrost vrtenja palice je pri našem poskusu stalna, medtem ko jo lahko pri drugih izvedbah poljubno nastavimo ter jo med poskusom stopnjujemo, s čimer povečujemo težavnost. Test

ponovimo 10, 15 in 20 minut po tem, ko so miši dobile uspavalo, antipsihotik in fiziološko raztopino.

Naloga študentov

Študentje bodo opazovali miši in izmerili, koliko časa vsaka od treh miši ostane na vrhu palice tako, da se prestopa (dokler ne pade s palice ali na njej obvisi). Ugotovili bodo tudi, če miš ne ostane na vrhu palice, ampak se drži za palico in se vrti z njo vred. S pomočjo rezultatov testiranja in dobrega opazovanja bodo skušali ugotoviti, katera miš je dobila uspavalo, antipsihotik in fiziološko raztopino.

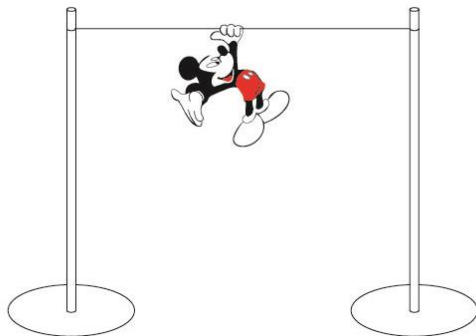
3. Test žice (Prehensile traction) (Combs & D'Alecy 1987)

Namen testa

Test žice je namenjen preskušanju motoričnih sposobnosti, mišične moči sprednjih okončin, ravnotežja in posturalnega refleksa.

Tehnični podatki (Slika 4.3)

Žica razpeta med dvema stojalom v višini 30 – 40 cm.



Slika 4.3: Test žice.

Izvedba testa

Preden izvajalec mišim injicira raztopino zdravila oz. fiziološko raztopino, preskusi njihove sposobnosti in vedenje (čas 0 min). Miš izvajalec poskusa obesi za prednji tački na sredino

žice. Študentje opazujemo njene reakcije. Ugotovijo, če se je miš sposobna držati s prednjimi tačkami na žici. Če miš samo visi, jo izvajalec poskusa po 10 sekundah vzame z žice, študentje pa v protokolu označijo kot (+). Če se prej spusti, izmerijo čas do spusta in ga zapišejo v protokol. Normalno se miš s tačkami in repom oprime žice in se pomakne na eno od stojal. Študentje izmerijo čas, ki ga miš potrebuje, da doseže stojalo. Če je miš samo zmožna tega oprijema, ne uspe pa ji priti do stojala v 30 sekundah, jo izvajalec poskusa vzame z žice, študentje pa označijo v protokolu kot (+). Test ponovimo 10, 15 in 20 minut po tem, ko so miši dobile uspavalo, antipsihotik in fiziološko raztopino.

Naloga študentov

Študentje bodo ugotovili, če se je vsaka od treh miši sposobna držati s prednjimi tačkami na žici in izmerili bodo čas, dokler se miš ne spusti z žice. Ugotovili bodo tudi, če se je miš sposobna z zadnjimi tačkami zgrabiti za žico ter se z repom oprijeti žice in se tako pomakniti na eno od stojal. S pomočjo rezultatov testiranja in dobrega opazovanja bodo skušali ugotoviti, katera miš je dobila uspavalo, antipsihotik in fiziološko raztopino.

4. Test spontane motorične aktivnosti (SMA) (Activity cage)

Namen testa

Test SMA je namenjen za ugotavljanje vpliva spremembe okolja na vedenje poskusnih živali (raziskovanje, strah, odnosi), čas nastopa depresivnega / stimulativnega odmerka ter kvantitativno oceno depresivnega (DD_{50}) in stimulativnega (SD_{200}) učinka zdravil na OŽ.

Tehnični podatki za kletko za merjene spontane motorične aktivnosti (Slika 4.4)

Za izvedbo poskusa uporabimo aparat "activity cage". Tla kletke so narejena iz 30 kovinskih žic, ki so povezane s števcem. Vsakič, ko žival stopi na žico, se to zabeleži, tako da je številka na števcu proporcionalna spontani motorični aktivnosti na določen časovni interval. Tok, ki teče skozi telo živali, je velikosti nekaj μA , kar je veliko pod pragom zaznave. Uporabimo 2 kletki, eno za kontrolne in drugo za testne živali. Spontano aktivnost testne in kontrolne skupine merimo sočasno in ugotovimo, če obstaja razlika za vsak časovni interval. Če obstaja

razlika, lahko določimo depresivni odmerek – 50 (DD₅₀) in stimulatívni odmerek - 200 (SD₂₀₀).



Slika 4.4: Test spontane motorične aktivnosti.

Izvedba testa

Preden izvajalec mišim injicira raztopino zdravila oz. fiziološko raztopino, preskusi njihove sposobnosti in vedenje (čas 0 min) tako, da vsako miš posebej da v kletko in jo študentje opazujejo 30 sekund. To ponovimo vsaj 20 minut po aplikaciji oz. ko so miši opravile ostale 3 teste. Kletke ne bomo uporabili za kvantitativne meritve, ker je čas opazovanja prekratek. Študentje opazujejo vedenje in gibanje podobno kot pri testu odprtega polja (Open-Field-Test), pri katerem živali v novem okolju nimajo možnosti, da se kam skrijejo. Normalno miš v novem okolje najprej raziskuje, nato pa se umiri. Ugotovili bodo tudi, če je prišlo do defekacije.

Naloga študentov

Študentje bodo ugotovili, kako vpliva sprememba okolja na vedenje miši ter opazovali njihovo gibanje in odnos do druge miši. S pomočjo dobrega opazovanja bodo skušali ugotoviti, katera miš je dobila uspavalno, antipsihotik in fiziološko raztopino.

LITERATURA

1. Boissier JR, et al. A new simple method for exploring "Tranquilizing" action: the chimney test. *Med. Exptl.* 1960, 3, 81-84.
2. Dunham NW, Miya TS. A note on simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of Pharmaceutical Science* 1957, 46, 208-209.
doi:10.1002/jps.3030460322
3. Combs DJ, D'Alecy LG. Motor performance in rats exposed to severe forebrain ischemia: effect of fasting and 1,3-butanediol. *Stroke* 1987, 18(2), 503-11.
4. Platel A, Porsolt RD. Habituation of Exploratory Activity in Mice: A screening Test for Memory Enhancing Drugs. *Psychopharmacology* 1982, 78, 346-352.

POROČILO LABORATORIJSKE VAJE

Vaja 4: Neklinično preizkušanje zdravil z učinkom na osrednje živčevje

IME IN PRIIMEK: _____ DATUM: _____

Rezultati: miš številka 1 je dobila: _____

miš številka 2 je dobila: _____

miš številka 3 je dobila : _____

1. Rezultati: Test dimnika – cevi

čas aplikacije [min]	miš	plezalni čas ¹ [sek]	latentni čas ² [sek]	defekacija ³	ostalo ⁴
0	1				
	2				
	3				
10	1				
	2				
	3				
15	1				
	2				
	3				
20	1				
	2				
	3				

¹Če miš ne uspe splezati v 30 sekundah, označimo kot NO (ni opravljeno).

²Čas dokler miš ne začne plezati ali vsaj to poskuša.

³Je prišlo do defekacije (+), ni (-).

⁴Npr.: poskuša splezati, ne upa v cev...

2. Rezultati: Test vrteče se palice

čas aplikacije [min]	miš	čas na vrhu / do padca ¹ [sek]	vrtenje s palico ²	ostalo
0	1			
	2			
	3			
10	1			
	2			
	3			
15	1			
	2			
	3			
20	1			
	2			
	3			

¹Če ostane miš 30 sekund na vrhu vrteče se palice, označimo kot O (opravljeno).

²Miš se drži in vrtil skupaj s palico (+).

3. Rezultati: Test žice

čas aplikacije [min]	miš	visenje na žici ¹	čas do spusta [sek] ²	oprijem z zadnjimi tačkami	doseže stojalo [sek] ³	ostalo
0	1					
	2					
	3					
10	1					
	2					
	3					
15	1					
	2					
	3					
20	1					
	2					
	3					

¹Če se miš drži s prednjimi tačkami 10 sekund, označimo kot (+).

²Čakamo največ 10 sekund.

³Čakamo največ 30 sekund.

4. Rezultati: Test spontane motorične aktivnosti SMA

čas aplikacije [min]	št. miš	gibanje in vedenje
0	1	
	2	
	3	
20	1	
	2	
	3	

ANALIZA REZULTATOV

1. Test dimnika ali cevi:

Kontrolna miš se v približno 30 sekundah zadensko vzpne po cevi navzgor. Miš, ki je dobila uspavalo, skuša splezati iz cevi, saj jo na glavo obrnjen položaj moti. Miš, ki je dobila antipsihotik, ostane kljub relativno ohranjeni mišični moči v položaju z glavo navzdol. Vztrajanje v nenavadnem položaju imenujemo katalepsija.

2. Test žice:

Kontrolna miš se s tačkami in repom oprime žice in se pomakne na eno od stojal. Miš s prizadeto motoriko se ne uspe držati na žici, miš, ki je dobila antipsihotik, pa ostane v začetnem položaju.

3. Test vrteče se palice:

Kontrolna miš se prestopa in tako ostane na vrhu palice. Miška, ki dobi antipsihotik, se zaradi ohranjene motorike drži za palico in se vrti z njo vred. Miš, ki ji injiciramo uspavalo, pa se s težavo drži na palici, dokler se ne spusti in pade z vrteče se palice.

4. Test spontane motorične aktivnosti:

Kontrolna miš previdno raziskuje kletko. Pri premikanju po žičkah nima težav z ravnotežjem. Miška, ki je dobila antipsihotik, ostane na mestu, kamor jo položimo. Miško, ki je dobila uspavalo, novo okolje prebudi in ga raziskuje manj zadržano kot kontrolna miš. Pri premikanju po žičkah ima težave z ravnotežjem.

Miš opazujemo tudi med posameznimi testi, ko je v steklenici. Pozorni smo na način čiščenja, ki je pri miškah lahko znak sproščenega ali pa nevrotičnega vedenja. Opazimo lahko Straubov fenomen (dvig repa) (Slika 3.8.). Slednji je posledica centralne aktivacije in zahteva kontrakcijo sakrokocigealne dorzalne mišice.



Slika 3.8: Miš, pri kateri je izražen Straubov fenomen.

VAJA 5: Osnovni vidiki klinične in eksperimentalne toksikologije – Toksični učinki organofosfornih insekticidov in karbamatov

NAMEN VAJE

- Spoznati razlike med klinično in eksperimentalno toksikologijo.
- Ugotoviti razliko med odgovorom 'vse ali nič' in postopnim odgovorom.
- Spoznati zastrupitev z organofosfornimi insekticidi in karbamati.

IZVEDBA VAJE

Po teoretičnem uvodu študentje rešujejo naloge iz toksikologije.

NALOGE

1. naloga: Organofosforni pesticidi in odnos med toksičnim učinkom in odmerkom

V tabeli so podatki za organofosforni pesticid. Organofosforni pesticide inhibirajo acetilholinesterazo v eritrocitih kar lahko uporabimo kot kvantitativni učinek pri delavcih, ki so bili izpostavljeni tej vrsti pesticidov. Drug učinek je mioza.

Spodnji podatki predstavljajo oba tipa učinkov izmerjena pri delavcih, ki so škropili poljščine.

Podatki so podani kot:

- % delavcev z miozo (kolona A)
- % inhibicije acetilholinesteraze v eritrocitih (kolona B)

Izpostavljenost oz. odmerek je ocenjen s pomočjo razgradnega produkta v urinu.

Narišite 1. graf kjer na absciso nanašate koncentracijo metabolita v urinu, na ordinato pa oba učinka. Skozi točke potegnite krivuljo. Na grafu označite TD_{50} in NOAEL. Nato narišite 2. graf, kjer na ordinato naneseite frekvenco mioze da ugotovite ali je učinek normalno porazdeljen v populaciji delavcev.

Tabela: Učinki organofosfatnih (OP) insekticidov na delavce

Izpostavljenost nM OP/nM kreatinina	A	B
	% delavcev z miozo	povprečen % inhibicije encima pri vsakem delavcu
0	0	0
10	0	0
20	0	0
30	0	2
40	1	3
50	10	4
60	40	5
70	80	10
80	90	18
90	97	30
100	100	43
110	100	55
120	100	68
130	100	81
140	100	90
150	100	95
160	100	98
170	100	100
180	100	100

Nato odgovorite na naslednja vprašanja:

1. Kaj je TD_{50} za to kemikalijo?
2. Kaj je NOAEL?
3. Pri katerem nivoju metabolitov v urinu bi morali zaustaviti izpostavljenost?
4. Kateri od obeh učinkov je bolj občutljiv?
5. Ali obstaja nivo pri katerem je izpostavljenost varna?

6. Ali obstaja temeljna razlika med obema odnosoma med odmerkom in učinkom?
7. Ali ste pri grafu uporabili biomarkerje in če ste, katerega tipa?
8. Ali je mioza v populaciji delavcev normalno porazdeljena?
9. Kaj je pri zastrupitvi z organofosfati toksikološko relevanten učinek?
10. Kateri toksindrom spremlja zastrupitev z organofosfornimi pesticide? Kateri so njegovi najpomembnejši simptomi in znaki?
11. Zdravljenje zastrupitve z organofosfornimi pesticidi!

2. naloga: Nevrotoksičnost karbamatov in biomarkerji.

Podgane so dobile 3 različne odmerke karbamata X z zaužitjem. Za vsak odmerek je bilo v skupini 10 samcev. V tabeli so navedeni rezultati holinesterazne aktivnosti v % od kontrole po treh urah po zaužitju.

Tabela: Učinek karbamata X na holinesterazno aktivnost pri samcih podgan.

Skupina podgan	Nizek N=10	Srednji N=10	Visok N=10
odmerek (mg/kg telesne teže)	5	50	200
<i>holinesterazna aktivnost (% od kontrole)</i>			
eritrociti	81	86	78
plazma	75*	63*	63*
možgani	92	77*	69*

*statistično značilna razlika

Odgovorite na naslednja vprašanja:

1. Kakšna je relevantnost podatkov za vse tri vrste encimov?
2. Kaj je NOAEL pri tej študiji?

3. Ali je študija pravilno načrtovana, če vemo, da se snov X hitro izloči iz telesa (vrh koncentracije v plazmi je po 1 h)?

3. naloga: Rezultati 90-dnevne standardne študije (subkronična) na psih.

V vsaki skupini je bilo 8 živali (4 samci in 4 samice). V študiji morajo biti vsaj trije različni odmerki snovi. Zato imamo tri skupine živali in kontrolno skupino. Učinki, ki jih pri standardni študiji spremljamo, so predpisani v njenem protokolu.

Tabela: Rezultati standardne subkronične študije na psih

Odmerek (mg/kg hrane)	0 N=8		50 N=8		5000 N=8		50000 N=8	
	<i>m</i>	<i>ž</i>	<i>m</i>	<i>ž</i>	<i>m</i>	<i>ž</i>	<i>m</i>	<i>ž</i>
spol								
UČINEK								
umrljivost	Ni toksikološko relevantnega učinka							
klinični znaki: - salivacija					+	+		
telesna teža (%)			-15*	-13*	-7	+4	+6	-3
poraba hrane	Ni toksikološko relevantnega učinka							
poraba vode	Ni toksikološko relevantnega učinka							
oftalmoskopija	Ni toksikološko relevantnega učinka							
hematologija	Ni toksikološko relevantnega učinka							
klinična kemija	Ni toksikološko relevantnega učinka							
makroskopski znaki	Ni toksikološko relevantnega učinka							
teža organov: - jetra (%)			-2	+3	+8*	+9	+17*	+21*
holinestrazna aktivnost (%) - eritrociti			5	0	-6	-5	-23	-22

*statistično značilna razlika

Odgovorite na naslednja vprašanja:

1. Kaj je NOAEL pri tej študiji? Izrazite v pravih enotah! Katere podatke zato še potrebujemo?
2. Ali lahko to študijo uporabimo tudi kot referenčno študijo za akutno toksičnost?
3. Kaj je/so kliničen/no relevantni znak/i pri tej študiji?