

MECHANIZMY RUCHÓW KOMÓRKOWYCH

- DZIAŁANIE ANESTETYKÓW NA KOMÓRKI

Zakres materiału, który należy przygotować do ćwiczeń:

- 1) Budowa błony komórkowej
- 2) Mechanizm działania anestetyków
- 3) Aktywność ruchowa komórek mięśniowych
- 4) Chemotaksja komórek
- 5) Rola jonów wapnia w komórce

Anestetyki są to leki wywołujące stan anestezji. Są one powszechnie używane do wywołania narkozy (**ogólnie działające środki znieczulające**) lub do miejscowego znieczulenia (**anestetyki lokalne**). Pod względem budowy najczęściej stosowane anestetyki lokalne są **aminoestrami** : pochodnymi kwasu benzoowego (kokaina), kwasu p-aminobenzoowego (prokaina , tetrakaina) lub amidoamidami (lidokaina, bupiwakaina). Wszystkie te związki charakteryzują się obecnością ugrupowania lipofilnego (pierścień aromatyczny) połączonego wiązaniem estrowym lub amidowym z łańcuchem węglowym oraz obecnością grupy hydrofilowej (trzeciorzędowa grupa aminowa). Do grupy anestetyków zaliczamy również wodę destylowaną, roztwory sacharozy, chlorków potasu i magnezu, etanol, benzen, eter, benzamid i wiele innych.

Mimo trwających od lat intensywnych badań działania anestetyków na komórki oraz powszechnego ich stosowania od ponad stu lat w medycynie, molekularny mechanizm działania tych leków na komórki nie jest w pełni poznany.

Prace prowadzone przez wiele lat koncentrowały się na **wpływie anestetyków na błonę komórkową** (płynność dwuwarstwy fosfolipidowej, przepuszczalność dla jonów, aktywność kanałów jonowych w błonie). Wyniki ostatnich lat wskazują jednak na bardziej złożony mechanizm działania anestetyków. Powszechnie przyjmowany jest pogląd, że leki znieczulające miejscowo **przechodzą przez błonę w formie zasady rozpuszczalnej w tłuszczach, w cytoplazmie ulegają protonowaniu i**

w formie kationu wchodzi w kontakt z fosfolipidami i białkami po cytoplazmatycznej stronie błony komórkowej.

Jedną z hipotez zakłada, że anestetyki mają zdolność wbudowywania się do dwuwarstwowej fosfolipidowej. Zakłada się na podstawie wyników badań w układach pozakomórkowych, że dochodzi do zobojętnienia ujemnych ładunków fosfolipidowych „główek” przez dodatnio naładowane ugrupowanie aminowe anestetyków co prowadzi do destabilizacji struktury błony i zwiększenia jej przepuszczalności dla wody. Jednak według najpowszechniej przyjmowanej teorii działanie znieczulające anestetyków związane jest z **hamowaniem napływu jonów sodu do cytoplazmy poprzez zależne od potencjału kanały sodowe w błonach** komórek nerwowych. Przyłączenie anestetyku zachodzi w obrębie poru kanału i powoduje zmiany konformacyjne białka utrudniające przechodzenie jonów.

W ostatnich latach przybywa wiele dowodów na poparcie tezy, że działanie anestetyków nie ogranicza się jedynie do blokowania zależnych od potencjału kanałów sodowych. Wykazano na przykład **hamowanie przez te leki napływu do wnętrza neuronów jonów wapnia poprzez zależne od potencjału kanały wapniowe**. Anestetyki, szczególnie w przypadku znieczuleń głębokich (znieczulenie rdzeniowe) mogą działać nie tylko poprzez zależne od potencjału kanały jonowe. Sugeruje się zahamowanie przez te związki przekazu synaptycznego. Wykazano, że takie zależne od ligandu kanały jonowe jak receptor nikotynowo-acetylocholinowy, receptor serotoninowy hamowane są przez anestetyki. Wiadomo również że anestetyki mogą wpływać na aktywność innych niż kanały jonowe białek błonowych, w tym na **aktywność enzymów związanych z przeniesieniem sygnału w komórce**.

Działanie anestetyku nie ogranicza się do błony komórkowej. Obejmuje także inne organelle komórkowe. Związki te zmieniają stężenie wewnątrzkomórkowe jonów wapnia, które są wtórnym przekaźnikiem sygnału w komórce. Stężenie jonów wapnia zależne jest nie tylko od aktywności kanałów wapniowych w błonie komórkowej, ale głównie od uwalniania tych jonów z wnętrza cystern siateczki śródplazmatycznej. W błonach tej siateczki znajdują się dwa typy kanałów jonowych. Jeden z nich określany jest typem **receptora IP₃** (inozytolo-(1,4,5)-trifosforanu), **drugi typ kanału to kanał rianodinowy** (aktywowany przez wapń). Jego obecność wykazano w komórkach mięśniowych, oocytach, neuronach, fibroblastach, hepatocytach. Aktywność tego kanału jest stymulowana między innymi przez kofeinę a hamowana przez prokainę i inne środki miejscowo znieczulające. Należy więc

przypuszczać, że anestetyki w znaczącym stopniu wpływają na równowagę wapniową w komórkach. Zmiana aktywności białek receptorowych i enzymów zaangażowanych w transdukcję sygnału w wyniku zmian płynności błony komórkowej pod wpływem działania anestetyku wpływa znacząco na stężenie wewnątrzkomórkowego wapnia. Zmiana poziomu jonów wapnia w komórce jest pierwotną reakcją komórkową. Wiadomo, że aktywność wielu enzymów zależy od stężenia jonów wapnia w komórce (fosforylacja i defosforylacja białek poprzez aktywację Ca-zależnych kinaz białkowych), wzrost aktywności cyklazy adenylanowej, skurcz komórek mięśniowych i niemięśniowych, regulacja wydzielania komórkowego i inne.

Wykazano także, że leki z grupy anestetyków lokalnych hamują wzrost komórek ludzkich w hodowli. Istnieją również doniesienia na temat hamującego wpływu anestetyków na oddychanie mitochondrialne.

Działanie anestetyków nie ogranicza się do komórek nerwowych i mięśniowych. Leki te wpływają na komórki innych typów, co może prowadzić do pojawienia się skutków ubocznych stosowania tych leków. **Przedmiotem zainteresowania jest ich wpływ na fibroblasty, komórki epitelialne, komórki układu immunologicznego, gdyż stosowanie tych środków mogłoby zakłócać proces gojenia się ran i upośledzać zdolności obronne organizmu.**

Wiele prac wskazuje, że pod wpływem anestetyku zaburzeniu ulegają procesy, których przebieg uzależniony jest od **organizacji cytoszkieletu**. Do procesów takich należą wzrost aksonów komórek nerwowych i transport w aksonach, przepływ cytoplazmy, ruch komórek, procesy endocytozy. Ruch komórek i związane z nim zmiany kształtu i organizacji cytoszkieletu mają znaczenia w procesach gojenia się ran, odpowiedzi immunologicznej i wytwarzaniu przerzutów przez komórki nowotworowe. Anestetyki stosowane w celach znieczulenia lub narkozy mogą wywierać uboczny wpływ na wyżej wymienione procesy.

Wykonanie ćwiczenia

1. Przygotować do pracy mikroskop kontrastowo-fazowy (obiektyw 20x PhA, okulary 10x SK). Założyć do mikroskopu zielony filtr.
2. Przygotować 6 komór, pamiętając o dokładnym umyciu i odtłuszczeniu szkiełek, gdyż warunkuje to przyczepienie się ameb do szkła:



3. Umieścić na szkiełku 3 ameby, po czym nałożyć szkiełko nakrywkowe. Począć około 3 minut, aż ameby przyczepią się do szkła, przybiorą typowy spolaryzowany kształt



i zaczną się poruszać. Opisać kształt, wygląd powierzchni i rozkład ziarnistości oraz hialoplazmy. Ocenić przeciętną prędkość poruszania się ameby.

4. Obserwując amebę w mikroskopie, bardzo delikatnie, uważając by strumień cieczy nie oderwał ameby od podłoża **wprowadzić do komory 2% roztwór etanolu w roztworze Chalkley`a**. Pipetką umieszczać kroplę roztworu z jednej strony i odciągać bibułą z drugiej strony komory. Zannotować kolejne zmiany w wyglądzie i ruchu ameby i czas jaki upłynął od chwili dodania alkoholu (kształt, wygląd powierzchni, rozkład ziarnistości i hialoplazmy oraz sposób poruszania się.). Obserwacje prowadzić około 10 minut.
5. **W komorze z punktu 4 umieścić 0.5 mM roztwór Ca^{2+} (r-r Chalkley`a z Ca^{2+}).** Zaobserwować ustępowanie zmian wywołanych etanolem.

6. **W nowej komorze umieścić ameby** jak w punkcie 3.
7. **W komorze z punktu 6 umieścić 5% etanol w r-rze Chalkley`a.** Prowadzić obserwacje w taki sam sposób jak poprzednio.
8. Przygotować nową komorę i zbadać wpływ **2% roztworu etanolu z jonami Ca^{2+} .**
9. Podobnie jak w punkcie 8 postąpić z **5% roztworem etanolu z jonami Ca^{2+} .**
10. Umieścić ameby w komorze. Obok komory umieścić kroplę benzenu (uważać, aby nie wdyfundował do komory) i uzupełnić ją gdy wyparuje. Obserwować zachodzące zmiany. Ocenić czy komórki wykazują reakcję chemotaktyczną w odpowiedzi na gradient benzenu. Stwierdzić czy jest to chemotaksja dodatnia czy ujemna.

.