

Anesthetic interactions with lysophosphatidate signaling

Citation for published version (APA):

Durieux, M. E. (1999). *Anesthetic interactions with lysophosphatidate signaling*. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19990604md>

Document status and date:

Published: 01/01/1999

DOI:

[10.26481/dis.19990604md](https://doi.org/10.26481/dis.19990604md)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

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
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 12

SUMMARY AND CONCLUSIONS / SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Marcel E. Durieux

Summary and conclusions

This thesis reports the development of a system for the study of molecular interactions between G protein-coupled receptors and anesthetics. Although the main site of action for most intravenous and inhaled anesthetics appears to be the GABA_A receptor (ketamine's action on the NMDA glutamate receptor is an exception), the different effect and side effect profiles of these drugs is a result of their interactions with other systems. As discussed in Chapter 2, ion channels - both voltage-regulated and ligand-gated - have received most attention as sites of anesthetic action. Indeed, many channel types have been shown to be affected. The nicotinic acetylcholine receptor is an example of an ionotropic receptor significantly inhibited by low concentrations of anesthetics. Voltage-gated Ca and K channels are similarly inhibited by inhaled anesthetics. In contrast, the large superfamily of G protein-coupled receptors (GCRs) has received relatively little attention. Although scattered reports exist of anesthetic interactions with GCRs, only the effects on muscarinic acetylcholine signaling have been investigated in some detail. Part of this lack of investigative attention is due to technical difficulties in studying GCRs in isolation. Therefore, we adapted the *Xenopus* oocyte model, long used for the expression and cloning of GCRs, to the study of anesthetic interactions with these signaling molecules. Of particular interest would be GCRs for lipid mediators, as these would be likely targets for (lipophilic) anesthetics.

As reviewed in Chapter 4, the *Xenopus* oocyte has a number of compelling advantages for use in such studies. The frogs are easily maintained and oocytes are obtained with a simple procedure. In addition, once oocytes are adequately defolliculated, they are remarkably devoid of endogenous GCRs, with the exception of those described in the present thesis. GCRs can be expressed either by microinjection of RNA (extracted from tissue or prepared in vitro) or cDNA. Particularly Ca²⁺-signaling GCRs are easily studied, as the oocyte expresses an endogenous Ca²⁺-dependent Cl⁻ channel, which is routinely used as a reporter for intracellular Ca²⁺ release. The results of the investigations in this thesis demonstrate that anesthetics of various classes can be applied without significantly modifying the behavior of the oocyte.

Chapters 5 and 6 describe our observations of two endogenous GCRs which are expressed consistently in oocytes: those for the phospholipid messengers lysophosphatidate (LPA) and sphingosine-1-phosphate (S1P). These two compounds are closely related structurally and functionally. As described in Chapter 3, LPA signaling has received much investigative attention recently. The compound has long been known to be an essential intermediate in phospholipid metabolism, but only in recent years has it become clear that it also acts as a signaling molecule. Its cellular effects are varied and dramatic. The compound acts as a contractile agent on various types of smooth muscle, including vascular smooth muscle. It is a potent mitogen for many types of fibroblasts. It activates platelets and - in turn - is released into the blood stream from activated platelets. It induces shape changes in a number of cell types, including neuronal cells. Its relevance to biological systems is shown by the fact that LPA acts as a chemoattractant in a species as far removed from mammals as *Dictyostelium discoideum*. A variety of studies over the past ten years have provided detailed insight into the cellular mechanism of action of LPA. Although a membrane receptor has not yet been cloned convincingly, biochemical evidence strongly supports its existence. LPA binding to this receptor leads to intracellular activation of several G proteins, inducing IP₃ and DAG generation, as well as decreases in cAMP levels. The mitogenic and cytoskeletal actions of the compound are mediated by small cytoplasmic G proteins and the MAP kinase cascade. Thus, LPA is a molecule of significant interest. Some of its actions may be

relevant in the perioperative period, and anesthetic effects on LPA signaling are therefore worthy of investigation. As in addition the compound forms a good model for lipid mediator signaling in general, and the receptor is endogenously expressed in oocytes, we decided to study the effects of several classes of anesthetics on LPA signaling.

Chapter 5 reports our finding of the endogenous LPA response in *Xenopus* oocytes. LPA induced transient dose-dependent currents in uninjected cells. The response was found to be highly specific, as related compounds (phosphatidic acid, lysophosphatidylcholine, lysophosphatidylserine) were without effect. Intracellular LPA application did not induce intracellular Ca^{2+} release, strongly suggesting an extracellular site of action. In addition, the response to LPA could be inhibited by incubation in pertussis toxin, indicating G protein involvement. We could establish that the induced currents were Ca^{2+} -activated Cl^- currents, as they were abolished by intracellular injection of EGTA, and the reversal potential became more positive at lower extracellular Cl^- concentrations. Suramin, which had been shown to inhibit LPA responses in other systems, blocked the current. Hence, we concluded that this novel oocyte response to LPA was mediated by a specific membrane receptor linked to a pertussis toxin-sensitive G protein.

When searching for related responses in oocytes, we tested S1P, and found it also to induce currents. As detailed in Chapter 6, these currents were similarly Ca^{2+} -activated Cl^- currents, virtually indistinguishable from those induced by LPA. Intracellular injection of S1P was without effect, as was extracellular application of several compounds structurally related to S1P (sphingosine, sphingosylphosphorylcholine and N,N-dimethylsphingosine). In order to investigate if S1P and LPA might signal through the same receptor, we employed cross-desensitization, and found that LPA and S1P cross-desensitized completely. Both responses were inhibited by suramin and dithiothreitol. Thus, this suggests the existence of a single receptor for the two compounds. We were able to elicit responses to both LPA and S1P in HEK293 fibroblasts, but to neither of the compounds in K562 cells. However, no cross-desensitization between the compounds was observed in HEK293 cells.

As standard electrophysiology systems are not designed to function effectively with the long time courses and large currents induced by GCR signaling in oocytes, we developed a software system specifically geared to this function, as described in Chapter 7. OoClamp, as it is called, is a MS-DOS based package for the acquisition, analysis and storage of data from GCR studies in *Xenopus* oocytes. The system is designed to provide standardization of test conditions, rapid, on-line analysis of data, and self-documentation and compact storage of data files. All system settings are optimized for use with the *Xenopus* expression system. This system has been used for data acquisition in all subsequent studies reported in this thesis.

In the course of these investigations, we discovered an additional endogenous oocyte response: a current induced by trypsin. As described in Chapter 8, trypsin induces Ca^{2+} -activated Cl^- currents when applied in concentrations as low as 0.1 mg/ml to defolliculated, uninjected oocytes. The response is dose-dependent and specific, as other proteases (chymotrypsin, Lys-C and Arg-C) or trypsin pretreated with soybean trypsin inhibitor, were without effect. The response was due to an extracellular site of action, as microinjected trypsin did not induce currents. We also tested if the trypsin response could be due to proteolytic activation of LPA signaling, but found this not to be the case.

After these initial studies of oocyte physiology, we studied the effects of three classes of anesthetics on LPA signaling in oocytes. Chapter 9 reports the effects of propofol, a highly lipophilic intravenous anesthetic known to have its primary site of action on the GABA_A receptor. Propofol in Intralipid[®] dose-dependently inhibited LPA signaling (IC_{50} 5.38 μM). Propofol 28

μM inhibited LPA by more than 80%. Intralipid[®] (0.01%) was without effect. To ascertain that intracellular signaling pathways and the Ca^{2+} -activated Cl^- channel were not affected by propofol, we tested the effects of propofol on currents induced by methylcholine in oocytes expressing m1 muscarinic acetylcholine receptors. No inhibition was observed. As both receptors share the same intracellular signaling pathway, we concluded that clinically relevant concentrations of propofol inhibit LPA signaling, acting most likely on the receptor or the associated G protein. Thus, lipophilic anesthetics indeed interfere significantly with signaling through lipid mediator receptors.

Chapter 10 describes the effects of two volatile anesthetics, halothane and isoflurane, on LPA signaling. We found halothane to inhibit LPA signaling in a dose-dependent manner (IC_{50} 0.23 mM). Halothane 0.34 mM inhibited responses to LPA virtually completely. This effect was fully reversible. As we had shown previously that halothane inhibits functioning of muscarinic receptors, we used instead the $\text{AT}_{1\text{A}}$ angiotensin receptor to test for anesthetic effects on the shared intracellular signaling pathway. Halothane, even at the highest concentrations tested, was without effect on angiotensin signaling. To assure that both receptors signaled through the same pathway, we microinjected oocytes with heparin, an IP_3 receptor blocker. Responses to both LPA and angiotensin were inhibited by this treatment, confirming that both receptors signal through IP_3 . Currents elicited by microinjection of IP_3 into oocytes were not affected by halothane. Together, these findings confirm that the effect of halothane is proximal in the signaling pathway, most likely at the LPA receptor or G protein. In contrast to halothane, isoflurane was without effect on LPA signaling. Thus, volatile anesthetics can interfere with lipid mediator signaling, but the action is specific.

Finally, we studied the effect of two local anesthetics, lidocaine and bupivacaine, on LPA signaling, as described in Chapter 11. This study was of particular relevance as a role for LPA in wound healing seems likely, and local anesthetics have been shown to impair wound healing. Both compounds inhibited LPA signaling (IC_{50} 29.9 mM for lidocaine and 4.5 mM for bupivacaine - concentrations reached after local anesthetic injection around wounds). At high local anesthetic concentrations, virtually complete inhibition of LPA signaling was observed. The effect of bupivacaine was completely reversible, whereas lidocaine appeared to have a partially irreversible effect. Both compounds were without effect on angiotensin or IP_3 signaling.

Taken together, these studies show that the *Xenopus* oocytes is a flexible model for the study of anesthetic actions on GCR signaling, and that selected members of the three main classes of anesthetics interfere with at least one lipid mediator receptor.

Further studies suggest themselves. First, more detailed localization of the site of action is useful. We have now been able to induce Ca^{2+} -activated Cl^- currents in oocytes by microinjection of the non-hydrolyzable GTP analog GTP γS , and have found that halothane is without effect on these currents. Thus, the site of action of halothane is more proximal than the G protein effector domain, and therefore either involves the receptor, the receptor-G protein interface or early steps in G protein signaling (such as GDP-GTP exchange). We have obtained similar results have been obtained with local anesthetics. We have shown in addition that charged local anesthetics inhibit the LPA receptor at an intracellular site, using the non-permeable, permanently charged lidocaine analog QX314. Permanently uncharged compounds, exemplified by benzocaine, can also block LPA signaling, and as they interact with QX314 in a synergistic manner, the presence of two binding sites is suggested. It would be of great interest to test stereoisomers of some of the anesthetics, as a stereoselective effect would suggest a protein (receptor) site of action. Such studies are now in progress with the isomers of ropivacaine.

In addition, it is important to extend these results to other lipid mediator receptors. We have chosen the thromboxane A₂ (TXA₂) receptor because of its relevance in vasoconstriction and platelet aggregation, effects similar to those of LPA. We found both general anesthetics and local anesthetics inhibit TXA₂ signaling. Both isoflurane and halothane inhibit signaling, but competition studies suggest different site of action. This is in agreement with data obtained at other receptors, as discussed in Chapter 3. The effect of local anesthetics is profoundly time-dependent. After several hours incubation, concentrations of lidocaine and bupivacaine achieved in plasma during epidural anesthesia are found to inhibit TXA₂ signaling significantly. The mechanism of this delayed effect is under study.

It is also important to confirm findings obtained in a highly isolated model such as the oocyte to receptors in a more native environment. Therefore, studies of the effects of anesthetics on, e.g. LPA-induced platelet aggregation should be performed.

The number of lipid mediator receptors is large, and many of them play important roles during injury and repair. Thus, their functioning is of great importance during the perioperative period. Our data suggest that they may be targets for anesthetic action, and that anesthetics of several classes can significantly limit their functioning. This may have consequences for the bodily response during and after surgery, and a full understanding of these anesthetic-receptor interactions and their consequences is therefore warranted.

SAMENVATTING EN CONCLUSIES

Deze dissertatie beschrijft de ontwikkeling van een systeem voor de studie van moleculaire interacties tussen G-eiwit gekoppelde receptoren en anesthetica. Hoewel het belangrijkste effect voor de meeste intraveneus en per inhalatie toegediende anesthetica de GABA_A receptor schijnt te zijn (het effect van ketamine op de NMDA glutamaat receptor is een uitzondering), zijn de verschillende werkings- en bijwerkingsprofielen van deze geneesmiddelen een gevolg van interacties met andere systemen. Als beschreven in Hoofdstuk 2, hebben ionenkanalen - zowel potentiaal-gestuurd als ligand-gestuurd - de meeste aandacht gekregen als werkingsplaats van anesthetica. Van veel soorten kanalen is inderdaad aangetoond dat ze beïnvloed worden. De nicotinische acetylcholine receptor is een voorbeeld van een ionotropische receptor die in aanzienlijke mate geremd wordt door lage concentraties inhalatieanesthetica. Potentiaal-gestuurde Ca en K kanalen worden op gelijke wijze geremd. De grote superfamilie van G eiwit-gekoppelde receptoren (GCRs) heeft in tegenstelling relatief weinig aandacht gekregen. Hoewel verspreide rapporten bestaan over interacties tussen anesthetica en GCRs zijn alleen de effecten op muscarinische acetylcholine signalering in enig detail bestudeerd. Een deel van dit gebrek aan onderzoeksaandacht is het gevolg van de technische moeilijkheden in het bestuderen van GCRs in isolatie. Om die reden hebben wij het *Xenopus* oocyt model, reeds lang in gebruik voor expressie en clonering van GCRs, aangepast voor de studie van anesthetica interacties met deze signaal-moleculen. Van speciaal belang zouden zijn de GCRs voor lipiedmediatoren, aangezien deze waarschijnlijke doelen zouden vormen voor (lipofiele) anesthetica.

Als beschreven in Hoofdstuk 4, hebben *Xenopus* oocyten een aantal overtuigende voordelen voor het gebruik in dergelijke studies. De kikkers zijn makkelijk in onderhoud en oocyten zijn te verkrijgen met een eenvoudige ingreep. Bovendien zijn oocyten, eenmaal voldoende gedefolliculeerd, opmerkelijk vrij van endogene GCRs, met als uitzondering degenen beschreven in deze dissertatie. GCRs kunnen worden geëxprimeerd hetzij door microinjectie van RNA (ge-

extraheerd uit weefsel of in vitro geprepareerd) of cDNA. Met name GCRs die signaleren via Ca^{2+} zijn makkelijk te bestuderen, omdat de oocyt een endogeen Ca^{2+} -afhankelijk Cl^- kanaal bezit dat routinematig gebruikt wordt als een reporter voor intracellulair vrijgemaakt Ca^{2+} . De resultaten van de onderzoeken in deze dissertatie tonen aan dat anesthetica van verschillende klassen kunnen worden toegediend zonder de eigenschappen van de oocyt noemenswaardig te beïnvloeden.

Hoofdstuk 5 en 6 beschrijven onze waarnemingen betreffende twee endogene GCRs die consistent in oocyten geëxprimeerd zijn: voor de fosfolipide signaalmoleculen lysofosfatidaat (LPA) en sfingosine-1-fosfaat (S1P). Deze twee substanties zijn elkaar sterk verwant, zowel structureel als functioneel. Als beschreven in Hoofdstuk 3 is LPA signalering de laatste tijd onderwerp van veel onderzoeksinteresse. Het molecuul is lang bekend als een essentiële tussenstap in fosfolipied metabolisme, maar slechts in de afgelopen jaren is duidelijk geworden dat het ook functioneert als een signaal molecuul. Het werkt als contractiel agonist op verschillende soorten glad spierweefsel, inclusief vaatspierweefsel. Het is een krachtig mitogeen voor vele typen fibroblast. Het activeert trombocyten en - anderszijds - wordt door geactiveerde trombocyten in de bloedbaan vrijgemaakt. Het induceert vormveranderingen in een aantal celtypen, waaronder zenuwcellen. Het belang voor biologische systemen wordt duidelijk uit het feit dat LPA als chemoottractant functioneert in een soort zo ver verwijderd van zoogdieren als *Dictyostelium discoideum*. Een groot aantal studies over de afgelopen tien jaar heeft gedetailleerd inzicht opgeleverd in de cellulaire werkingsmechanismen van LPA. Hoewel een membraanreceptor nog niet overtuigend is gekloneerd wordt zijn bestaan krachtig gestaafd door biochemische bevindingen. Binding van LPA met zijn receptor leidt tot intracellulaire activering van verschillende G eiwitten, waardoor IP_3 en DAG gegenereerd worden, en cAMP niveaus dalen. De mitogene en cytoskelet effecten van LPA worden gemedieerd door kleine cytoplasmatische G eiwitten en de MAP kinase keten. LPA is derhalve een molecule met aanmerkelijke interesse. Een aantal van zijn effecten zijn mogelijk relevante in de perioperatieve periode, en het is daarom relevant om effecten van anesthetica op LPA signalering te bestuderen. Aangezien de substantie bovendien een goed model vormt voor lipied mediator signalering in het algemeen, en aangezien de receptor endogeen geëxprimeerd is in oocyten, besloten wij de effecten van verschillende klassen anesthetica op LPA signalering te bestuderen.

Hoofdstuk 5 rapporteert onze bevindingen omtrent de endogene LPA respons in *Xenopus* oocyten. LPA veroorzaakt tijdelijke, dosis-afhankelijke ionenstromen in niet-geïnjecteerde cellen. De response was uiterst specifiek, aangezien verwante stoffen (fosfatidaatzuur, lysofosfatidylcholine, lysofosfatidylserine) zonder effect waren. Intracellulaire toediening van LPA maakte geen intracellulair Ca^{2+} vrij, hetgeen sterk wijst op een extracellulaire werkingsplaats. De respons op LPA kon bovendien worden onderdrukt door incubatie in pertussis toxine, wijzend op een rol voor G eiwitten. Wij konden aantonen dat de geïnduceerde stromen Ca^{2+} -geactiveerde Cl^- stromen waren, aangezien ze onderdrukt werden door intracellulaire injectie van EGTA, en aangezien de omkeringspotential meer positief werd met lagere extracellulaire Cl^- concentraties. Suramine, hetgeen LPA effecten in andere systemen onderdrukt, verminderde de stromen. Wij concludeerden dat deze nieuwe oocyt respons op LPA gemedieerd wordt door een specifieke membraan receptor gekoppeld met een pertussis toxine-gevoelig G eiwit.

Op zoek naar vergelijkbare reacties in oocyten testten wij S1P, en vonden dat het eveneens stromen induceerde. Als beschreven in Hoofdstuk 6 waren deze stromen eveneens Ca^{2+} -geïnduceerde Cl^- stromen, vrijwel niet te onderscheiden van degenen geïnduceerd door LPA. Intracellulaire injectie van S1P was zonder effect, evenals extracellulaire toediening van verschil-

lende structureel aan S1P verwante stoffen (singosine, sfingosylfosforylcholine en N,N-dimethylsingosine). Om te onderzoeken of S1P en LPA via dezelfde receptor signaleren testten we kruisdesensitisatie, en vonden dat LPA en S1P volledig kruisdesensitiseren. Beide responsen werden onderdrukt door suramine en dithiothreitol. Dit suggereert derhalve het bestaan van een enkele receptor voor beide substanties. We waren in staat reacties op LPA en S1P te verkrijgen in HEK293 fibroblasten, maar op geen van beide stoffen in K562 cellen. Er werd evenwel geen kruisdesensitisatie waargenomen in HEK293 cellen.

Aangezien de gebruikelijke electrofysiologie systemen niet ontworpen zijn om effectief te functioneren met de lange tijdsduren en grote stromen die door GCRs in oocyten geïnduceerd worden, ontwikkelden we een software systeem specifiek ontworpen voor dit doel, als beschreven in Hoofdstuk 7. OoClamp, zoals het genoemd is, is een MS-DOS-gebaseerd pakket voor opname, analyse en opslag van gegevens verkregen met GCR studies in *Xenopus* oocyten. Het systeem is ontworpen om standaardisatie van test condities, snelle, on-line data analyse, en zelfdocumentatie en compacte gegevensopslag te verschaffen. Alle systeem parameters zijn geoptimaliseerd voor gebruik met het oocyt expressie systeem. Dit systeem is gebruikt voor data opname in alle volgende studies beschreven in deze dissertatie.

In de loop van deze onderzoeken ontdekten we nog een endogene respons van de oocyt: een stroom geïnduceerd door trypsine. Als beschreven in Hoofdstuk 8 induceert trypsine, wanneer toegediend op gedefolliculeerde, ongeïnjecteerde oocyten in concentraties zo laag als 0.1 mg/ml, een Ca^{2+} -geactiveerde Cl^- stroom. De respons is dosis-afhankelijk en specifiek, aangezien andere proteasen (chymotrypsine, Lys-C en Arg-C), zowel als trypsine voorbehandeld met soja trypsine inhibitor, zonder effect waren. De respons was het gevolg van een extracellulaire werkingsplaats, aangezien gemicroïnjecteerd trypsine geen stromen induceerde. We testten ook of de trypsine respons een gevolg kon zijn van proteolytische activering van LPA signalering, maar dit bleek niet het geval.

Na deze voorbereidende studies van oocyt fysiologie bestudeerden we de effecten van drie klassen anesthetica op LPA signalering in oocyten. Hoofdstuk 9 rapporteert de effecten van propofol, een zeer lipofiel intraveneus anestheticum met zijn primaire werkingsplaats op de GABA_A receptor. Propofol in Intralipid[®] onderdrukte LPA signalering op dosis-afhankelijke wijze (IC_{50} 5.38 μM). Propofol 28 μM onderdrukte LPA signalering meer dan 80%. Intralipid[®] (0.01%) alleen was zonder effect. Om zeker te zijn dat intracellulaire signaalwegen en het Ca^{2+} -geactiveerde Cl^- kanaal niet beïnvloed waren door propofol testten we het effect van propofol op stromen geïnduceerd door methylcholine in oocyten die de m1 muscarinische acetylcholine receptor exprimeerden. Er werd geen inhibitie waargenomen. Aangezien beide receptoren dezelfde intracellulaire signaalketen delen concludeerden wij dat klinisch relevante concentraties propofol LPA signalering onderdrukken, waarschijnlijk werkend op de receptor of het geassocieerde G eiwit. Lipofiele anesthetica interfereren derhalve inderdaad aanzienlijk met receptoren voor lipied mediators.

Hoofdstuk 10 beschrijft de effecten van twee inhalatieanesthetica, halothaan en isofluraan, op LPA signalering. We vonden dat halothaan LPA signalering onderdrukte op dosis-afhankelijke wijze (IC_{50} 0.23 mM). Halothaan 0.34 mM onderdrukte LPA responsen vrijwel compleet. Dit effect was volledig reversibel. Aangezien we eerder aangetoond hadden dat halothaan de functie van muscarinische receptoren onderdrukt, gebruikten we de AT_{1A} angiotensine receptor om effecten van het anestheticum op de intracellulaire signaalketen te testen. Halothaan was zelfs in de hoogste concentraties zonder effect op angiotensine signalering. Om er zeker van te zijn dat beide receptoren over dezelfde keten signaleren microïnjecteerden we oocyten met

heparine, een IP_3 receptor antagonist. Responsen op zowel LPA als angiotensine werden door deze behandeling onderdrukt, aantonend dat beide receptoren via IP_3 signaleren. Stromen geïnduceerd door microinjectie van IP_3 in oocyten werden niet beïnvloed door halothaan. Tezamen duiden deze bevindingen er op dat het effect van halothaan proximaal in de signaalketen plaatsvindt, meest waarschijnlijk op de LPA receptor of G eiwit. Isofluraan, in tegenstelling tot halothaan, was zonder effect op LPA signalering. Volatile anesthetica kunnen derhalve interfereren met lipied mediator signalering, maar hun effecten zijn specifiek.

Tenslotte onderzochten we de effecten van twee lokaalanesthetica, lidocaine en bupivacaine, op LPA signalering, als beschreven in Hoofdstuk 11. Deze studie was van bijzonder belang aangezien een rol voor LPA in wondheling waarschijnlijk lijkt, en aangezien is aangetoond dat lokaalanesthetica wondheling nadelig beïnvloeden. Beide anesthetica onderdrukten LPA signalering (IC_{50} 29.9 mM voor lidocaine en 4.5 mM voor bupivacaine - concentraties die bereikt worden na injectie van lokaalanesthetica rond wonden). Met hoge concentraties lokaalanestheticum werd vrijwel volledige onderdrukking van LPA signalering waargenomen. Het effect van bupivacaine was volleding reversibel, maar lidocaine had een deels irreversibel effect. Beide stoffen waren zonder effect op angiotensine of IP_3 signalering.

Tezamen tonen deze studies aan dat *Xenopus* oocyten een flexibel model vormen voor de studie van de effecten van anesthetica op GCR signalering, en dat sommige leden van de drie grote klassen van anesthetica interfereren met op zijn minst één lipied mediator receptor.

Verdere studies zijn mogelijk. In de eerste plaats zou meer gedetailleerde localisatie van de werkingsplaats nuttig zijn. Wij zijn er nu in geslaagd om Ca^{2+} -geactiveerde Cl^- stromen te induceren in oocyten door microinjectie van het niet-hydrolyseerbare GTP analogon GTPyS, en we hebben gevonden dat halothaan zonder effect is op deze stromen. De werkingsplaats van halothaan is derhalve stroomopwaarts van het G eiwit, en omvat dus de receptor of de receptor-G protein interface. We verkregen vergelijkbare resultaten met lokaalanesthetica. Bovendien hebben we aangetoond, gebruikmakend van het niet-permeabele, permanent geladen lidocaine analogon QX314, dat positief geladen lokaalanesthetica de LPA receptor intracellulair beïnvloeden. Permanent ongeladen lokaalanesthetica, bijvoorbeeld benzocaine, blokkeren LPA signalering eveneens, en aangezien ze synergistisch werken met QX314, is de aanwezigheid van twee bindingsplaatsen mogelijk. Het zou zeer interessant zijn om stereoisomeren van enkele van deze anesthetica te testen, aangezien een stereoselectief effect een eiwit (receptor) werkingsplaats zou suggereren. Dergelijke studies zijn nu in uitvoering met de stereoisomeren van ropivacaine.

Het is bovendien van belang deze resultaten uit te breiden tot andere lipied mediator receptoren. Wij hebben de thromboxaan A_2 (TXA_2) receptor gekozen vanwege zijn relevantie in vasoconstrictie en trombocytenuitstrooming, effecten vergelijkbaar met die van LPA. We vonden dat algehele anesthetica zowel als lokaalanesthetica TXA_2 signalering onderdrukten. Zowel halothaan als isofluraan onderdrukten signalering, maar competitie studies suggereren verschillende werkingsplaatsen. Dit is in overeenstemming met gegevens van andere receptoren, als besproken in Hoofdstuk 3. Het effect van lokaalanesthetica is buitengewoon tijdfafhankelijk. Na enkele uren incubatie onderdrukten concentraties van lidocaine en bupivacaine als aanwezig in plasma tijdens epiduraalanesthesie TXA_2 signalering aanzienlijk. Het mechanisme voor dit vertraagde effect is onder studie.

Het is ook van belang om de gegevens verkregen in een zeer geïsoleerd model zoals de oocyt te bevestigen in een meer fysiologisch model. Studies van het effect van anesthetica op bv. LPA-geïnduceerde trombocytenuitstrooming zijn daarom aangewezen.

SUMMARY

Het aantal lipied mediator receptoren is groot, en vele spelen een belangrijke rol tijdens weefselbeschadiging en reparatie. Hun functie is dus van groot belang tijdens de perioperatieve periode. Onze gegevens suggereren dat zij een doel vormen voor anestetica, en dat anestetica van verschillende klassen hun functie aanzienlijk kunnen inperken. Dit kan gevolgen hebben voor de reacties van het lichaam tijdens en na operatieve ingrepen, en een volledig begrip van deze anestetica-receptor interacties en hun consequenties is derhalve van belang.