

ARTYKUŁ POGLĄDOWY

Wpłynęło: 01.09.2008 • Poprawiono: 22.09.2008 • Zaakceptowano: 22.09.2008

© Akademia Medycyny

Anestetyki lokalne a apoptoza *Local anaesthetics and apoptosis*

Ewa Bednarek, Hanna Billert

Zakład Anestezjologii Doświadczalnej, Katedra Anestezjologii i Intensywnej Terapii,
Uniwersytet im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu



Streszczenie

Znieczulenie, zarówno ogólne, jak i miejscowe może modulować procesy apoptozy – programowanej śmierci komórki. Wykazano proapoptotyczne działanie anestetyków lokalnych w odniesieniu do komórek układu nerwowego, krążenia, nerek, wątroby, jądra, komórek nabłonkowych, leukocytów, komórek płytkowych i komórek grasicy. Uczynnieniem procesów apoptozy tłumaczy się m.in. neurotoksyczne działanie lidokainy. Aktywacja programowanej śmierci komórki przez anestetyki lokalne odbywa się głównie szlakiem mitochondrialnym, obserwowano też uczynnienie kinaz białkowych i proapoptotycznych białek Bax, zwiększenie stężenia wapnia śródkomórkowego i uczynnienie procesów wolnorodnikowych. Efekt zależy od rodzaju środka, typu komórek i czasu ekspozycji. W warunkach patologii wpływ anestetyków lokalnych na procesy apoptozy może przebiegać odmiennie. Zastosowanie środków znieczulenia miejscowego w różnych sytuacjach klinicznych powinno uwzględnić pro- lub antyapoptotyczne działanie tych związków. *Anestezjologia i Ratownictwo 2008; 2: 314-319.*

Słowa kluczowe: anestetyki lokalne, apoptoza

Summary

Both general and regional anesthesia may modulate apoptosis – a programmed cell death. Proapoptotic influence of local anesthetics could be demonstrated regarding nervous system, heart and vessels, kidney, liver, testis, epithelial cells, leukocytes, thrombocytes and thymus. Apoptosis possibly underlies the neurotoxic effects of lidocaine. Activation of a programmed cell death by local anesthetics proceeds mainly via a mitochondrial pathway; activation of protein kinases, proapoptotic Bax proteins, an increase of intracellular calcium concentration and upregulation of radical processes have also been observed. The effects depend on a particular drug, cell type and a time of exposure. Under pathologic conditions an influence of local anesthetics on apoptosis may be altered. Introduction of local anesthetics in various clinical situations should regard pro- or antiapoptotic action of the compounds. *Anestezjologia i Ratownictwo 2008; 2: 314-319.*

Keywords: local anaesthetics, apoptosis

Procedury znieczulenia, coraz pewniejsze i bezpieczniejsze, wiążą się jednak z szeregiem następstw i konsekwencji patofizjologicznych. Ostatnio zainteresowaniem cieszy się zagadnienie wpływu znieczulenia na procesy apoptozy – programowanej śmierci komórki. Okazuje się, że leki stosowane w znieczuleniu mogą indukować apoptozę [1]. Problem ten wydaje się szczególnie istotny w kontekście tzw. neuroapoptozy rozwojowej - u noworodków ekspozycja na niektóre środki znieczulenia ogólnego wiąże się z neurodegeneracją w tym mechanizmie [2,3]. Indukcją procesów apoptozy próbuje się też tłumaczyć neurotoksyczność anestetyków lokalnych; szereg powszechnie stosowanych środków znieczulenia miejscowego działa proapoptotycznie już w istotnych klinicznie, niskich stężeniach [4]. Jednak związek anestetyków lokalnych z procesami śmierci komórki jest skomplikowany; środki te mogą też indukować procesy nekrozy – martwicy, a w pewnych warunkach wręcz hamować mechanizmy śmierci komórki [5-7].

Apoptoza – programowana śmierć komórki

Równowaga między proliferacją a obumieraniem komórek leży u podstaw homeostazy ustroju. Do eliminacji komórek dochodzi zasadniczo na drodze martwicy-nekrozy i apoptozy - programowanej śmierci komórki. Terminem apoptozy (gr. opadanie liści) wprowadzonym do piśmiennictwa przez Kerr'a i współpracowników w roku 1972 opisuje się cykl zdarzeń prowadzących do śmierci komórek w obrębie żywych tkanek, charakteryzujący się odrębnościami strukturalnymi i biochemicznymi [8]. W przeciwieństwie do martwicy, programowana śmierć komórki jako proces aktywny wymaga dostarczenia energii i znajduje się pod kontrolą genów. Rozpad biologiczny komórki (postrzegany jako kombinacja rozpadu biochemicznego i biofizycznego) można przyrównać do reakcji łańcuchowej przebiegającej w określonym porządku. Śmierć komórki rozpoczyna się w momencie, gdy produkowana energia jest niewystarczająca, aby skompensować procesy rozkładu [9].

W procesie apoptozy komórka kurczy się, ulega zaokrągleniu i traci kontakt z podłożem.

Dzięki zmianom w strukturze błony komórkowej tworzą się pęcherzyki, tzw. ciała apoptotyczne, w obrębie których znajdują się nieuszkodzone organelle komórkowe wraz z fragmentami chromatyny, usuwane

następnie w procesie fagocytozy. We wczesnym okresie apoptozy następuje utrata asymetrii fosfolipidów błony komórkowej i ekspozycja reszt fosfatydyloserynowych na jej powierzchni. Struktury te są rozpoznawane przez receptory makrofagów, ułatwiając fagocytozę, a zjawisko to zostało wykorzystane do identyfikacji komórek znajdujących się w stanie wczesnej apoptozy [8].

Dochodzi do uczynnienia proteaz cysteinowych - białek z rodziny kaspaz, inicjujących (-2,-8, -9, -10), a następnie wykonawczych (efektorowych, -3,-6,-7). Do ich substratów należą między innymi białka pro- i antyapoptotyczne, białka odpowiedzialne za zmiany strukturalne w komórce - powodujące kondensację chromatyny, fragmentację nici DNA, enzymy naprawcze (np. polimeraza poli-(ADP-rybozy) – PARP), kinazy i polimerazy oraz białka strukturalne jądra komórkowego i cytoszkieletu [10,11].

Powszechnie znane są dwa tory aktywacji procesów apoptotycznych. Szlak zewnętrzny (receptorowy) zostaje zainicjowany po przyłączeniu odpowiedniego ligandu do znajdującego się na powierzchni błony komórkowej receptora śmierci (receptory dla nadrodziny cząsteczek czynnika martwicy nowotworu – TNF: TNFR1, Fas/CD95, DR3, DR4, DR5). W następstwie dochodzi do zmiany konfiguracji wewnątrzkomórkowej domeny receptora, połączenia z cząsteczką FADD (Fas-associated death domain), aktywacji prokaspazy 8 i uruchomienia kaskady kaspaz. Do aktywacji wewnętrznego szlaku apoptozy, zwanego mitochondrialnym, dochodzi na skutek wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie, zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT), zaburzeń transportu elektrolitów i uszkodzeń DNA w komórce oraz zablokowania produkcji energii w mitochondriach. Ostatnio podkreśla się rolę hipoksji jako czynnika proapoptotycznego, której konsekwencją jest obniżona, niewystarczająca produkcja energii. W procesie aktywacji szlaku mitochondrialnego istotną rolę odgrywają tzw. megakanały mitochondrialne (PTP – premeability transmission pore) zlokalizowane w miejscu zetknięcia się obu błon mitochondrialnych. Ich otwarcie wiąże się z przechodzeniem do cytoplazmy zawartości przestrzeni międzybłonowej, m.in. cytochromu c i czynnika indukcji apoptozy (AIF – apoptosis-inducing factor). Uwolniony cytochrom c wraz z białkiem adaptorowym Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) oraz prokaspazą 9, przy udziale ATP tworzą tzw. apoptosom, który powoduje aktywację kaspaz efektorowych, a w konsekwencji śmierć komórki [8,10,11].

Wymienia się jeszcze inne tory aktywacji procesów apoptotycznych: pseudoreceptorowy (przy udziale perforyn i granzymu G) i związany z retikulum endoplazmatycznym [12].

W regulacji programowanej śmierci komórki bierze udział wiele czynników, m.in. białka Bcl-2, proteazy oraz RFT i Ca²⁺. Niektóre spośród białek z rodziny Bcl-2, najlepiej poznanej grupy regulatorów, wykazują właściwości antyapoptotyczne (bcl-2, bcl-x), inne zaś proapoptotyczne (Bad, Bax, Bak). Występują one w komórce w swoistej równowadze, zaś przewaga białek proapoptotycznych uaktywnia mechanizm programowanej śmierci. Niektórzy sugerują, że efekt pro-/antyapoptotyczny białek z rodziny Bcl-2 jest warunkowany modyfikacją uwalniania Ca²⁺ z retikulum endoplazmatycznego [13].

Stymulacja fragmentacji DNA i kondensacji chromatyny jądrowej może następować niezależnie od kaspaz, za pośrednictwem endonukleazy G i AIF uwalnianych z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Efekt ten może być związany z produkcją wolnych rodników, zaś inhibitorem czynnika AIF jest białko szoku termicznego HSP70 (heat shock protein 70) o właściwościach cytoprotekcyjnych [14].

Analgetyczne i pozaanalgetyczne mechanizmy działania anestetyków lokalnych. Modulacja procesów apoptozy

Główny punkt uchwytu działania anestetyków lokalnych dotyczy blokowania kanałów sodowych – środki te hamują pobudliwość błon i zapobiegają rozprzestrzenianiu się potencjału czynnościowego. Hamują też kanały potasowe, wapniowe, wykazują działanie blokujące szereg receptorów (np. receptory cholinergiczne, NMDA, GABA-ergiczne i serotoniner-giczne) [15,16]. W działaniu przeciwbólowym wykazują synergizm z opioidami i kanabinoidami [17].

Pozaanalgetyczne, alternatywne efekty środków znieczulenia miejscowego wciąż spotykają się z dużym zainteresowaniem na łamach piśmiennictwa. Anestetyki lokalne niezależnie od działania blokującego przewodnictwo nerwowe mogą działać przeciwnie, wykazując też właściwości bakteriobójcze, mają działanie przeciwrzepliwie, a także mogą zapewniać protekcję ośrodkowego układu nerwowego. Ta szeroka gama efektów farmakologicznych jest następstwem skomplikowanych interakcji ze składnikami białko-

wymi i lipidowymi błon biologicznych, co powoduje modulację czynności kanałów jonowych, enzymów błonowych i cytoszkieletu [18]. Przed ponad 35 laty Seemann wysunął koncepcję „upłynnienia i dysregulacji błony”, co miałyby prowadzić w rezultacie do stymulacji lub hamowania enzymów i białek. Badania Hollmanna i współpracowników wskazują na bezpośrednie blokowanie białek Gq przez anestetyki lokalne – efekt ten miałby tłumaczyć działanie przeciwwzpalne tych związków [19].

Informacje na temat wpływu anestetyków lokalnych na procesy programowanej śmierci komórki pochodzą przede wszystkim z badań *in vitro*. Wykazano, że środki znieczulenia miejscowego mają zdolność indukowania procesów apoptozy w szeregu komórek (Tabela 1).

▪ Układ nerwowy

Zastosowanie lidokainy do znieczulenia podpa-jęczynówkowego może prowadzić do powstawania tzw. zespołu ogona końskiego i przemijających objawów neurologicznych (transient neurologic symptoms, TNS) w mechanizmie niezależnym od blokowania napięciowo-zależnych kanałów sodowych [20]. Lidokaina wykazuje działanie neuroprotektoryjne w stężeniach mikromolarnych, jednak w znieczuleniu podpa-jęczynówkowym stężenia środka w płynie mózgowo rdzeniowym osiągają rząd milimoli, przynajmniej w początkowym okresie znieczulenia. Johnson i współpracownicy wykazali neurotoksyczność lidokainy w odniesieniu do linii komórek zwojów rdzeniowych szczura, stwierdzając całkowity spadek potencjału błony mitochondrialnej w stężeniu $\geq 19\text{mM}$; obserwowano cechy uszkodzenia mitochondriów i aktywację kaspaz [21]. Lirk i współpracownicy, w oparciu o badania *in vitro* z komórkami czuciowymi i model *in vivo* blokady nerwu kulszowego u szczura, sugerują z kolei, że w procesie indukcji apoptozy przez lidokainę kluczową rolę odgrywa uczynnienie kinazy białkowej indukowanej przez mitogen (MAPK) p38, która z kolei powoduje wzrost przepuszczalności błony mitochondrium. Uwolnienie cytochromu c z mitochondrialnej przestrzeni międzybłonowej do cytozolu uruchamia szlak aktywacji kaspaz [22].

W linii ludzkich komórek neuroblastoma SK-N-MC wykazano też proapoptotyczne działanie dibukainy, które, jak się przypuszcza, mogłoby mieć związek z bezpośrednim wpływem związku na integralność

Tabela 1. Wpływ środków znieczulenia miejscowego na procesy programowanej śmierci komórki.

Anestetyk lokalny	Stężenie	Rodzaj komórek	Mechanizm	Referencje
Lidokaina	3-6 mM	Jurkat T-lymphoma	Spadek potencjału błony mitochondrialnej; aktywacja kaspazy 3; uwalnianie cytochromu c	[45]
	≤ 19 mM	Komórki zwojów rdzeniowych (szczur)	Spadek potencjału błony mitochondrialnej; uszkodzenie mitochondrium; aktywacja kaspaz	[21]
	40 mM	Komórki czuciowe (szczur)	Aktywacja kinazy (MAPK)p38; wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej; uwalnianie cytochromu c	[22]
	10-30 mM	Tymocyty (szczur)	Uszkodzenie błon komórek apoptotycznych	[49]
	≥75 μM	Miocyty mięśnia sercowego	Uczynnienie kaspazy-3	[30]
	500 μM	Komórki kanalka proksymalnego nerki (szczur, niedokrwienie-reperfuzja)	Aktywacja kaspaz 3, 6, 7, 8, 9	[36]
Bupiwakaina	LD ₅₀ = 476 μM	Komórki Schwana (linia RT 4-D6P2T)	Aktywacja kaspazy 3; degradacja PARP	[25]
	1-300 μM	Komórki kanalka proksymalnego nerki HK-2	Aktywacja kaspaz 3, 6, 7, 8, 9	[36]
	1-1.5 mM	Komórki linii białaczkowej HL-60	Aktywacja kaspaz 3, 8, 9	[42]
Dibukaina	LD ₅₀ = 100 μM	Komórki linii białaczkowej HL-60	Aktywacja kaspaz 3, 6, 8, 9; depolaryzacja błony mitochondrialnej; uwalnianie cytochromu c	[43]
	1 mM	Komórki płytkowe	Depolaryzacja błony mitochondrialnej; uwalnianie cytochromu c; aktywacja kaspaz 3, 9; wzrost stężenia Ca ²⁺ w cytozolu i mitochondrium	[48]
Kokaina	0.1-10 mM (IC ₅₀ – 4.3 mM)	Neurocyty kory mózgowej (szczur)	Aktywacja kaspaz 2, 3, 9; obniżenie poziomu mitochondrialnego cytochromu c; upośledzenie czynności łańcucha transportu elektronów	[26]
	1.5 μM	Neurony miejsca sinawego płodu szczura	Aktywacja kaspaz 3, 9 oraz kinaz białkowych c-Jun i białek Bax	[28, 29]
	100 μM	Komórki mięśnia sercowego	Indukcja kinazy p38MAPK, obniżenie poziomu białek Bcl-2	[31, 32]

błony komórkowej, zwiększeniem stężenia wapnia śródkomórkowego oraz efektem wolnorodnikowym [23,24]. Stevens i współpracownicy przedstawili dane wskazujące na działanie proapoptotyczne anestetyków lokalnych w linii komórek neuroblastoma SHEP. Badane środki uszeregowano następująco w zależności od ich potencjału proapoptotycznego: tetrakaina > bupiwakaina > prilokaina = mepiwakaina = ropiwa-

kaina > lidokaina > prokaina = ultrakaina [4].

Bupiwakaina ma zdolność indukowania apoptozy w komórkach Schwanna (linia RT4-D6P2T); efekt ten zależy od dawki i czasu ekspozycji i następuje w mechanizmie zwiększenia produkcji RFT, związanych z uczynnieniem kaspazy-3 oraz degradacji PARP, enzymu odpowiedzialnego za naprawę nici DNA [25].

Ekspozycja na kokainę wiąże się ze śmiercią komórek szczególnie w ośrodkowym układzie nerwowym u płodu. Efekt neurotoksyczny kokainy w odniesieniu do neurocytów ośrodkowego układu nerwowego może być związany z indukcją procesów apoptozy [25,27]. Badania na myszach wykazały, że spośród 400 genów związanych z procesami apoptozy, w 53 genach kodujących białka uczestniczące w tych procesach kokaina powodowała zmiany ekspresji. Odchylenia dotyczyły między innymi receptorów śmierci, ich białek regulatorowych i adaptorowych, regulatorów transkrypcji (JNK, NF- κ B, p53), białek z rodziny Bcl-2, czujnika uszkodzenia DNA (PARP-1), kaspazy, ich substratów i białek regulatorowych (m.in. kaspazy -8, -4, -9 i -3), czynników mitochondrialnych (m.in. cytochrom c), czynników związanych z czynnością retikulum endoplazmatycznego i stresem oksydacyjnym, białek szlaków przeżycia komórek Akt oraz HSP70 [27]. W neurocytach kory mózgu szczura w warunkach *in vitro* kokaina powodowała uczynnienie kaspazy -2, -3 i -9 (ale nie -6 i -8) a także obniżała poziom mitochondrialnego cytochromu c i upośledzała czynność łańcucha transportu elektronów [26]. Wykazano też proapoptotyczne działanie kokainy w odniesieniu do noradrenergicznych neuronów miejsca sinawego płodu szczura (uczestniczących przypuszczalnie w procesach uwagi). Częściowo efekt ten wynikał z indukcji pozapalnej cytokiny TNF α . Obserwowano uczynnienie kaspazy -3 oraz -9, kinaz białkowych c-Jun oraz białek Bax [28,29]. Niezależnie od wpływu indukującego TNF α kokaina aktywuje też szlak przewodnictwa związany z p38 MAPK [28]. Nie wykazano wpływu proapoptotycznego kokainy na płodowe neurony substancji czarnej [29].

▪ Układ krążenia

► Serce

Lidokaina przyspiesza procesy apoptozy miocytów mięśnia sercowego (zwiększenie odsetka komórek wykazujących zwiększenie ekspresji kapazy-3) *in vitro* w stężeniach $\geq 75 \mu\text{M}$ [30]. Proapoptotyczne działanie kokainy na komórki mięśnia sercowego u dorosłych osobników oraz w życiu płodowym jest związane ze stresem oksydacyjnym, indukcją kinazy p38 MAPK i przebiega szlakiem mitochondrialnym; obserwowano też obniżenie poziomu białek Bcl-2 [31,32].

► Naczynia

Proapoptotyczny wpływ na komórki naczyń udokumentowano w odniesieniu do kokainy. Obserwowano

nasilenie procesów apoptozy w komórkach mięśniówki gładkiej aorty w warunkach *in vitro* proporcjonalnie do stężenia, co, jak się przypuszcza, może stanowić podłoże patofizjologiczne zmian naczyniowych obserwowanych u osób uzależnionych od kokainy – miażdżycy, rozwarstwień aorty i nadciśnienia [33]. Podobne zmiany obserwowano w odniesieniu do komórek mięśniówki gładkiej naczyń mózgu [34]. Indukcję apoptozy pod wpływem kokainy wykazano też w hodowli komórek śródbłonna naczyń wieńcowych. Uczynnieniu ulegał szlak mitochondrialny, obserwowano też spadek stężenia białek Bcl-2 oraz udział receptorów opioidowych i kanałów wapniowych [35].

▪ Nerki

Lidokaina, bupiwakaina i tetrakaina powodowały apoptozę komórek kanalikula proksymalnego nerki HK-2 po 48 godzinach inkubacji w efekcie zależnym od stężenia środka, a także potencjalizowały proces programowanej śmierci tych komórek pod wpływem TNF α . Obserwowano uczynnienie kaspazy -3, -6, -7, -8 i -9 oraz upośledzenie aktywności anty-apoptotycznej kinazy B Akt oraz MAPK [36].

▪ Wątroba

Ekspozycja na dibukainę wiązała się ze zmniejszeniem odsetka żywych komórek hepatoma H4-II-E w hodowli, przy czym zjawiska tego nie obserwowano w komórkach wykazujących podwyższoną ekspresję regulacyjną, co sugeruje udział mechanizmów związanych z homeostazą wapnia w tym procesie [37]. Proapoptotyczny wpływ kokainy na komórki wątroby wiąże się z nasileniem stresu oksydacyjnego [38].

▪ Jądro

Nasilenie procesów apoptozy szlakiem mitochondrialnym obserwowano w komórkach jądra szczura pod wpływem kokainy [39].

▪ Komórki nabłonkowe

Kokaina indukuje procesy apoptozy w komórkach nabłonka jamy nosowej, co może prowadzić do zespołu uszkodzenia przegrody nosa u osób nałogowo zażywających kokainę donosowo. U tych chorych obserwowano uczynnienie kaspazy -3 i -9 w biopatach błony śluzowej jamy nosowej. W hodowli tkankowej komórek nabłonkowych (HaCat) potwierdzono nasilenie procesów apoptozy pod wpływem kokainy proporcjonalnie do stężenia i czasu ekspozycji [40].

▪ Chondrocyty

Mimo hamowania proliferacji chondrocytów izolowanych z tkanki chrzęstnej stawu kolanowego w hodowli, przy dłuższej ekspozycji na lidokainę środek ten nie ma wpływu na procesy apoptozy w tych komórkach [41].

▪ Leukocyty

➤ Komórki linii białaczkowej HL-60

Badania *in vitro* z użyciem komórek linii białaczkowej HL-60 prowadzone przez Unami i współpracowników wskazują na uczynnienie procesów apoptozy przez bupiwakainę proporcjonalnie do jej stężenia i czasu ekspozycji. W komórkach dochodziło do aktywacji kaspaz -3, -8 i -9, sugerując udział mechanizmów pozamitochondrialnych i mitochondrialnych. Co ciekawe, nie obserwowano jednak zwiększenia przepuszczalności błony mitochondrialnej i przechodzenia cytochromu c do cytoplazmy. Analiza mikromacierzy wykazała wzrost ekspresji genów kodujących HSP70, c-jun i c-fos, natomiast geny c-myc i PARP wykazywały pod wpływem bupiwakainy zmniejszoną ekspresję [42]. Podobnie Arita i współpracownicy stwierdzili zahamowanie wzrostu komórek linii białaczkowej HL-60 w mechanizmie apoptozy pod wpływem dibukainy zależnie od stężenia środka i czasu inkubacji. Obserwowano uczynnienie kaspaz -3, -6, -8 oraz -9, depolaryzację błony mitochondrialnej i uwalnianie cytochromu c z mitochondriów do cytozolu [43].

➤ Granulocyty kwasochłonne

Wykazano stymulację apoptozy w eozynofilach poddanych działaniu interleukiny 5 (IL-5, która indukuje przeżycie tych komórek), a także, w mniejszym stopniu, IL-3 i czynnika wzrostu kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF). Efekt ten mógłby zostać wykorzystany w przypadkach alergii [44].

➤ Limfocyty T - komórki linii białaczkowej typu limfoidalnego Jurkat

Werdehausen i współpracownicy wykazali w linii komórek Jurkat, że lidokaina w stężeniach obserwowanych w warunkach klinicznych może indukować programowaną śmierć komórki wewnątrzpochođnym szlakiem mitochondrialnym. Zjawisku temu można było zapobiec przez zwiększenie ekspresji białka antyapoptotycznego Bcl-2 lub niedobór kaspazy-9. Szlak związany z receptorem

śmierci (FADD, kaspaza-8) okazał się pierwotnie nie uczestniczyć w tym procesie. W wyższych stężeniach lidokaina powoduje martwicę komórek [45]. Z kolei Boselli i współpracownicy obserwowali istotny efekt proapoptotyczny lidokainy w przeciwieństwie do ropiwakainy [46].

Jednak w opinii Lahata lidokaina okazuje się nie wpływać istotnie na procesy apoptozy w komórkach Jurkat, podczas, gdy jednak hamuje ich proliferację (a także aktywność prozapalną związaną z przekazaniem sygnału za pośrednictwem czynnika jądrowego NFκB) [47].

▪ Komórki płytkowe

Ekspozycja na lipofilne anestetyki lokalne, dibukainę i tetrakainę, wiąże się z ekspozycją reszt fosfatydylolerynowych w komórkach płytkowych; zjawisku temu towarzyszy depolaryzacja błony mitochondrialnej, uwalnianie cytochromu c, uczynnienie kaspaz -9 i -3 oraz wzrost stężenia jonów wapnia w cytoplazmie i mitochondriach [48].

▪ Komórki grasicy

W tymocytach szczura obserwowano cytotoksyczny wpływ lidokainy, która modulowała stan błon komórkowych szczególnie w komórkach, które znajdowały się w stanie apoptozy, prowadząc do ich martwicy [49].

Wpływ środków znieczulenia miejscowego na procesy apoptozy w wybranych sytuacjach patologicznych

▪ Procesy zapalenia

Zapalenie stanowi serię zjawisk zmierzających w kierunku przywrócenia zaburzonej homeostazy. Obejmuje ono eliminację uszkodzonych fragmentów tkanek i ewentualnych czynników infekcyjnych oraz uruchomienie procesów reparacyjnych. Prawidłowe wygaszenie odpowiedzi zapalnej, tzw. rezolucja zapalenia, jest procesem kluczowym dla przywrócenia homeostazy. Ostatnio wiele uwagi poświęca się roli apoptozy komórek zapalenia, w tym granulocytów, i ich usuwania w procesie fagocytozy [7]. Apoptoza granulocytów obojętnochłonnych może być jednym z wykładników ciężkości sepsy - odsetek apoptotycznych granulocytów obojętnochłonnych krwi obwodowej okazuje się być do niej odwrotnie proporcjonalny [50].

Poglądy na wpływ anestetyków lokalnych na procesy programowanej śmierci komórek uczestniczących w procesach zapalenia są niejednoznaczne. Wydaje się, że efekt ten może zależeć od rodzaju i stanu czynnościowego komórek, a także etapu zapalenia. Ostatnie badania Chianga i współpracowników sugerują, że anestetyki lokalne mogą upośledzać proces wygasania reakcji zapalnej. Wykazali oni, że lidokaina upośledza procesy apoptozy granulocytów obojętnochłonnych wysięku otrzewnowego i hamuje ich fagocytozę przez makrofagi, opóźniając tym samym rezolucję zapalenia. Zjawiskom tym towarzyszy zwiększenie ekspresji niektórych białek prozapalnych (S100A8/9 oraz CRAMP/LL-37) z jednoczesnym hamowaniem ekspresji peptydów przeciwzapalnych i przyspieszających wygasanie zapalenia (IL-4, IL-13, TGF- α i galektyny-1). Lidokaina nie wpływa na stężenie innych mediatorów zapalenia w płynie wysiękowym (działających prozapalnie - leukotrienu B4, prostaglandyny E2 i przeciwzapalnie - lipoksyny A4) [7].

Pojawiły się też informacje, że w warunkach zapalenia anestetyki lokalne mogą hamować procesy programowanej śmierci komórki w obrębie narządów. Sugerowano, że lidokaina przypuszczalnie hamuje wywołane lipopolisacharydem procesy apoptozy i nekrozy w pneumocytach typu II [51]. W modelu wstrząsu septycznego u myszy lidokaina oraz bupiwakaina podawana układowo za pomocą minipomp osmotycznych powodowały zmniejszenie apoptozy komórek kory nerek; zjawisku temu towarzyszyło obniżenie wykładników zapalenia układowego i zmniejszenie śmiertelności [6].

▪ **Hipertermia**

Hipertermia ma zdolność potencjalizacji procesów apoptozy; w procesie tym pośredniczy uwalnianie wapnia z magazynów wewnątrzkomórkowych z następowym wzrostem jego stężenia w cytoplazmie i spadek stężenia ATP.

Anestetyki lokalne, prilokaina, lidokaina i bupiwakaina w warunkach podwyższonej temperatury okazują się nasilać te procesy; efekt koresponduje z rozpuszczalnością w tłuszczach. Dochodzi do potencjalizacji uczynnienia kaspaz szlakiem mitochondrialnym [52].

▪ **Niedokrwienie - reperfuzja**

Patofizjologia niedokrwienia-reperfuzji obejmuje szereg skomplikowanych procesów, w których

mechanizmy zapalenia oraz programowanej śmierci komórki odgrywają kluczową rolę. Spośród licznych mediatorów pośredniczących w tych zjawiskach należy wymienić cytokiny, reaktywne formy tlenu i azotu, wapń i czynniki transkrypcyjne [53,54]. W początkowym okresie wyczerpania zasobów energetycznych komórek sugeruje się zasadniczy udział mechanizmów mitochondrialnych i RFT, dłużej trwające uszkodzenie uczynnia receptorowe zewnątrzpo pochodne mechanizmy apoptozy [54].

Opinie na temat wpływu anestetyków lokalnych na procesy apoptozy w warunkach niedokrwienia reperfuzy są zróżnicowane. Kluczowe znaczenie może mieć rodzaj tkanki. W patofizjologii niedokrwienia mózgu istotną rolę odgrywa uczynnienie kanałów sodowych i nadmierna produkcja RFT, które prowadzą do apoptozy komórek nerwowych w strefie sąsiadującej z uszkodzeniem. W warunkach *in vitro* dibukaina częściowo zapobiegała apoptozie komórek nerwowych wywołanej przez neurotoksyczny alkaloid weratrydynę, natomiast zastosowanie środka jednocześnie blokującego kanały sodowe i działającego antyoksydacyjnie powodowało całkowite odwrócenie procesów programowanej śmierci komórki [5]. W modelu doświadczalnym przejściowego ogniskowego niedokrwienia mózgu u szczura obserwowano zahamowanie apoptozy (obniżenie uwalniania cytochromu c i aktywacji kaspazy-3) w obszarze sąsiadującym ze strefą niedokrwienia pod wpływem lidokainy podawanej układowo. Jak się przypuszcza, mechanizm ten może być przynajmniej po części odpowiedzialny za neuroprotektoryjny efekt lidokainy i zmniejszenie obszaru zawału mózgu [55]. W niedokrwieniu-reperfuzji innych narządów obserwowano wprawdzie protekcyjny efekt anestetyków lokalnych (lidokainy), natomiast udział mechanizmów apoptozy pozostaje w większości sprawą otwartą. Układowe zastosowanie lidokainy i bupiwakainy w niedokrwieniu - reperfuzy nerki u szczura wiązało się z większym nasileniem procesów apoptozy i nekrozy i procesów zapalenia oraz wydłużeniem upośledzenia funkcji nerek; u zwierząt kontrolnych środki te pozostawały bez wpływu na czynność nerek i procesy apoptozy w obrębie narządu [56]. Ekspozycja na kokainę w okresie prenatalnym okazuje się też przypuszczalnie zwiększać wrażliwość mięśnia sercowego na niedokrwienie - reperfuzy u osobników dorosłych i nasilać procesy apoptozy w tych warunkach; co ciekawe efekt ten zależy od płci - występuje u osobników męskich [57]. Nasilenie procesów apoptozy w mięśniu sercowym

Piśmiennictwo

1. Delogu G, Moretti S, Antonucci A i wsp.: Apoptogenic effect of fentanyl on freshly isolated peripheral blood lymphocytes. *J Trauma* 2004; 57(1): 75-81.
2. Jevtovic-Todorovic V, Olney JW: Pro: Anesthesia-induced developmental neuroapoptosis: status of evidence. *Anesth Analg* 2008; 106(6): 1659-63.
3. Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB i wsp.: Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 2005; 135: 815-27.
4. Stevens MF, Braun S, Fazeli S i wsp.: Apoptotic and neurotoxic potency of commonly used local anesthetics. *Reg Anesth Pain Med* 2007; 32(5): 25.
5. Callaway JK, Beart PM, Jarrott B i wsp.: Incorporation of sodium channel blocking and free radical scavenging activities into a single drug, AM-36, results in profound inhibition of neuronal apoptosis. *Br J Pharmacol* 2001; 132(8): 1691-8.
6. Gallos G, Jones DR, Nasr SH i wsp.: Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology* 2004; 101(4): 902-11.
7. Chiang N, Schwab JM, Fredman G i wsp.: Anesthetics impact the resolution of inflammation. *PLoS-ONE* 2008; 3(4): e1879.
8. Helewski KJ, Kowalczyk-Ziomek GL, Konecki J: Apoptoza i martwica – dwie drogi do jednego celu. *Wiad Lek* 2006; 59 (9-10): 679-84.
9. Bongaerts GP: What of apoptosis is important: the decay process or the causative origin? *Med Hypoth* 2008; 70: 482-7.
10. Korzeniewska-Dyl I: Kaspazy – struktura i funkcja. *Pol Merk Lek* 2007; 23(138): 403-7.
11. Rupinder S K, Gurpreet A K, Manjeet S: Cell suicide and caspases. *Vasc Pharmacol* 2007; 46: 383-93.
12. Łabędzka K, Grzanka A, Izdebska M, Mitochondrium a śmierć komórki. *Postępy Hig Med Dosw* 2006; 60: 439-46.
13. Lao Y, Chang DC: Study of the functional role of Bcl-2 family proteins in regulating Ca(2+) signals in apoptotic cells. *Biochem Soc Trans* 2007; 35(5): 1038-9.
14. Hail JN, Carter BZ, Konopleva M i wsp.: Apoptosis effector's mechanism: A requiem performer in different keys. *Apoptosis* 2006; 11: 889-904.
15. Xu F, Gaeavito-Aguilar Z, Recio-Pinto E i wsp.: Local anesthetics modulate neuronal calcium signaling through multiple sites of action. *Anesthesiology* 2003; 98: 1139-46.
16. Ueta K, Sugimoto M, Suzuki T i wsp.: In vitro antagonism of recombinant ligand-gated ion-channel-receptors by stereospecific enantiomers of bupivacaine. *Reg Anesth Pain Med* 2006; 31: 19-25.
17. Kang S, Kim CH, Lee H i wsp.: Antinociceptive synergy between the cannabinoid receptor agonist WIN 55,212-2 and bupivacaine in the rat formalin test. *Anesth Analg* 2007; 104: 719-25.
18. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M: Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. *Acta Anaesthesiol Scand* 2006; 50: 265-82.
19. Hollmann MW, McIntire WE, Garrison JC i wsp.: Inhibition of mammalian Gq protein function by local anesthetics. *Anesthesiology* 2002; 97: 1451-7.
20. Sakura S, Bollen AW, Ciriales R i wsp.: Local anesthetic neurotoxicity does not result from blockade of voltage-gated sodium channels. *Anesth Analg* 1995; 81: 338-46.
21. Johnson ME, Uhl CB, Spittler KH i wsp.: Mitochondrial injury and caspase activation by the local anesthetic lidocaine. *Anesthesiology* 2004; 101(5): 1184-94.
22. Lirk P, Haller I, Myers RR, Klimaschewski L i wsp.: Mitigation of direct neurotoxic effects of lidocaine and amitriptyline by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *Anesthesiology* 2006; 104(6): 1266-73.
23. Kim M, Lee YS, Mathews HL i wsp.: Induction of apoptotic cell death in a neuroblastoma cell line by dibucaine. *Exp Cell Res* 1997; 231(2): 235-41.
24. Friederich P, Schmitz TP: Lidocaine-induced cell death in a human model of neuronal apoptosis. *Eur J Anaesthesiol* 2002; 19(8): 564-70.
25. Park CJ, Park SA, Yoon TG i wsp.: Bupivacaine induces apoptosis via ROS in the Schwann cell line. *J Dent Res* 2005; 84(9): 852-7.
26. Cunha-Oliveira T, Rego AC, Cardoso SM i wsp.: Mitochondrial dysfunction and caspase activation in rat cortical neurons treated with cocaine or amphetamine. *Brain Res* 2006; 1089(1): 44-54.
27. Novikova SI, He F, Bai J i wsp.: Cocaine-induced changes in the expression of apoptosis-related genes in the fetal mouse cerebral wall. *Neurotoxicol Teratol* 2005; 27(1): 3-14.
28. Dey S, Snow DM: Cocaine exposure in vitro induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons through TNF-alpha-mediated induction of Bax and phosphorylated c-Jun NH(2)-terminal kinase. *J Neurochem* 2007; 103(2): 542-56.
29. Dey S, Mactutus CF, Booze RM: Cocaine exposure in vitro induces apoptosis in fetal locus coeruleus neurons by altering the Bax/Bcl-2 ratio and through caspase-3 apoptotic signaling. *Neuroscience* 2007; 144(2): 509-21.
30. Franchini JL, Propst JT, Comer GR i wsp.: Novel tissue engineered tubular heart tissue for in vitro pharmaceutical toxicity testing. *Microsc Microanal* 2007; 13(4): 267-271.

31. Zhang L, Xiao Y, He J: Cocaine and apoptosis in myocardial cells. *Anat Rec* 1999; 257(6): 208-16.
32. Li G, Xiao Y, Zhang L: Cocaine induces apoptosis in fetal rat myocardial cells through the p38 mitogen-activated protein kinase and mitochondrial/cytochrome c pathways. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 312(1): 112-9.
33. Su J, Li J, Li W i wsp.: Cocaine induces apoptosis in primary cultured rat aortic vascular smooth muscle cells: possible relationship to aortic dissection, atherosclerosis, and hypertension. *Int J Toxicol* 2004; 23(4): 233-7.
34. Su J, Li J, Li W i wsp.: Cocaine induces apoptosis in cerebral vascular muscle cells: potential roles in strokes and brain damage. *Eur J Pharmacol* 2003; 482(1-3): 61-6.
35. He J, Xiao Y, Casiano CA i wsp.: Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in coronary artery endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 295(3): 896-903.
36. Lee HT, Xu H, Siegel CD i wsp.: Local anesthetics induce human renal cell apoptosis. *Am J Nephrol* 2003; 23(3): 129-39.
37. Izumi T, Yamaguchi M: Overexpression of regucalcin suppresses cell death and apoptosis in cloned rat hepatoma H4-II-E cells induced by lipopolysaccharide, PD 98059, dibucaine, or Bay K 8644. *J Cell Biochem* 2004; 93(3): 598-608.
38. Diez-Fernandez C, Zaragoza A, Alvarez AM i wsp.: Cocaine cytotoxicity in hepatocyte cultures from phenobarbital-induced rats: involvement of reactive oxygen species and expression of antioxidant defense systems. *Biochem Pharmacol* 1999; 58(5): 797-805.
39. Li H, Xu L, Dunbar JC, Dhabuwala CB: Role of mitochondrial cytochrome c in cocaine-induced apoptosis in rat testes. *Urology* 2003; 61(3): 646-50.
40. Trimarchi M, Miluzio A, Nicolai P i wsp.: Massive apoptosis erodes nasal mucosa of cocaine abusers. *Am J Rhinol* 2006; 20(2): 160-4.
41. Wohlrab D, Vocke M, Klapperstuck T i wsp.: The influence of lidocaine and verapamil on the proliferation, CD44 expression and apoptosis behavior of human chondrocytes. *Int J Mol Med* 2005; 16(1): 149-57.
42. Unami A, Shinohara Y, Ichikawa T i wsp.: Biochemical and microarray analyses of bupivacaine-induced apoptosis. *J Toxicol Sci* 2003; 28(2): 77-94.
43. Arita K, Utsumi T, Kato A i wsp.: Mechanism of dibucaine-induced apoptosis in promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Biochem Pharmacol* 2000; 60(7): 905-15.
44. Okada S, Hagan JB, Kato M i wsp.: Lidocaine and its analogues inhibit IL-5-mediated survival and activation of human eosinophils. *J Immunol* 1998; 160(8): 4010-7.
45. Werdehausen R, Braun S, Essmann F i wsp.: Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology* 2007; 107(1): 136-43.
46. Boselli E, Duflo F, Debon R i wsp.: The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg* 2003; 96(3): 755-6.
47. Lahat A, Horin SB, Lang A i wsp.: Lidocaine down-regulates nuclear factor-kappaB signalling and inhibits cytokine production and T cell proliferation. *Clin Exp Immunol* 2008; 152(2): 320-7.
48. Augereau O, Rossignol R, DeGiorgi F i wsp.: Apoptotic-like mitochondrial events associated to phosphatidylserine exposure in blood platelets induced by local anaesthetics. *Thromb Haemost* 2004; 92(1): 104-13.
49. Nishimura Y, Kanada A, Yamaguchi JY i wsp.: Cytometric analysis of lidocaine-induced cytotoxicity: a model experiment using rat thymocytes. *Toxicology* 2006; 218(1): 48-57.
50. Fialkow L, Fochesatto-Filho L, Bozetti MC i wsp.: Neutrophil apoptosis: a marker of disease severity in sepsis and sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. *Crit Care* 2006; 10(6): R155.
51. Xu DM, Ming GF, Wu XY i wsp.: [Protective effect of lidocaine on injury alveolar Type II cells induced by LPS in adult rats]—abstract. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2006; 31(2): 241-4.
52. Arai Y, Kondo T, Tanabe K i wsp.: Enhancement of hyperthermia-induced apoptosis by local anesthetics on human histiocytic lymphoma U937 cells. *J Biol Chem* 2002; 277(21): 18986-93.
53. Montalvo-Jave EE, Escalante-Tattersfield T, Ortega-Salgado JA i wsp.: Factors in the pathophysiology of the liver ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 2008; 147(1): 153-9.
54. Maenpaa CJ, Shames BD, Van-Why SK i wsp.: Oxidant-mediated apoptosis in proximal tubular epithelial cells following ATP depletion and recovery. *Free Radic Biol Med* 2008; 44(4): 518-26.
55. Lei B, Popp S, Capuano-Waters C i wsp.: Lidocaine attenuates apoptosis in the ischemic penumbra and reduces infarct size after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 2004; 125(3): 691-701.
56. Lee HT, Krichevsky IE, Xu H i wsp.: Local anesthetics worsen renal function after ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004; 286(1): F111-F119.
57. Bae S, Gilbert RD, Ducsay CA i wsp.: Prenatal cocaine exposure increases heart susceptibility to ischaemia-reperfusion injury in adult male but not female rats. *J Physiol* 2005; 565(1): 149-58.
58. Bae S, Zhang L: Prenatal cocaine exposure increases apoptosis of neonatal rat heart and heart susceptibility to ischemia-reperfusion injury in 1-month-old rat. *Br J Pharmacol* 2005; 144(7): 900-97.