

백서 피질 신경원 혼합배양 모델에서 허혈-재관류 뇌손상에 대한 Propofol, Ketamine 혹은 두약제 혼합투여의 효과

아주대학교 의과대학 마취통증의학교실, *약리학교실

박성용 · 서명신 · 김희영* · 박미현 · 최정웅 · 이숙영

The individual and combined neuroprotective effects of propofol and ketamine on rat mixed cortical cultures exposed to oxygen-glucose deprivation-reperfusion injury

Sung-Yong Park, M.D., Myoung-Sin Seo, M.D., Hie-Young Kim, M.D.*, Mie-Hyun Park, M.D., Jeong Woong Choi, M.D., and Sook Young Lee, M.D.

Departments of Anesthesiology and Pain Medicine, and *Pharmacology, College of Medicine, Ajou University, Suwon, Korea

Background: Propofol and ketamine are have been known to have neuroprotective effects. However, the effect of combined therapy with these 2 drugs is not well known with in vitro model. This study was conducted to determine whether combined administration of propofol and ketamine could have additive effects in protecting cortical neurons from the oxygen-glucose deprivation (ischemia) - reoxygenation (reperfusion) injury.

Methods: Thirteen-day-old primary mixed cortical cultures were exposed to a 5-min combined oxygen-glucose deprivation (OGD, in vitro ischemia model), followed by 2 hr of reperfusion. Propofol (1, 10, 25, 50, 100 μ M) and ketamine (1, 2.5, 5, 10, 50 μ M) were added as alone or combination from the initiation of the OGD injury to the end of the reperfusion periods. The survived cells were counted using trypan-blue staining. The data were converted to the cell death rate. Statistical analysis was done by oneway-ANOVA tests and Bonferroni's test. $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Results: OGD-reperfusion demonstrated about a 70% cell death rate. 5-50 μ M of ketamine decreased the cell death rate compared with the no drug treated group ($P < 0.05$). 10-100 μ M of propofol decreased the cell death rate compared with the no drug treated group ($P < 0.05$). Combined administration of ketamine 2.5 μ M + propofol 50, 100 μ M, ketamine 10 μ M + propofol 100 μ M and propofol 1, 10 μ M + ketamine 5, 10 μ M decreased cell death rate compared with the same dosage of propofol or ketamine alone treated group ($P < 0.05$).

Conclusions: Propofol or ketamine demonstrated neuroprotective effects. And, combined administration of propofol and ketamine demonstrated additive neuroprotective effects against OGD-reperfusion injury. (Korean J Anesthesiol 2008; 55: 72~7)

Key Words: ischemia-reperfusion injury, ketamine, propofol.

서 론

뇌허혈과 재관류 초기에는 세포의 glutamate와 같은 흥분성 아미노산의 급격한 증가와 glutamate 수용체 중 주로는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 과도한 흥분에 의한 신경흥분독성 연속단계(excitotoxic cascade)의 활성화가 세포

손상의 주요 기전으로 제시되고 있다.¹⁻⁴⁾

2,3-diisopropylphenol (propofol)의 뇌보호작용의 기전은 두개내압의 감소, 뇌대사율의 감소, 뇌의 산소요구량 감소,⁵⁾ 항산화효과,⁶⁾ NMDA 수용체 길항제로써의 효과 등으로 알려져 있으나,^{7,8)} 뇌보호 효과를 나타내지 않는다는 보고도 있다.^{9,10)}

Ketamine (2-(2-chlorophenyl)-2-methylaminocyclohexanone hydrochloride)은 해리성 정맥마취제로 NMDA 수용체에 비경쟁적 길항제로 작용하여 Na^+ 와 Ca^{2+} 채널을 통한 이온의 유입을 억제하며,^{11,12)} in vivo와 in vitro 실험에서 뇌보호 효과가 있는 것으로 알려져 있으나,¹³⁻¹⁵⁾ 효과가 없다는 보고도 있으며,¹⁶⁾ 뇌혈류량과 뇌대사율의 증가, 뇌압 상승 등의 작용들로 인해 심한 뇌외상 환자에서는 추천되지 않

논문접수일 : 2008년 2월 1일

책임저자 : 이숙영, 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5

아주대학교 의과대학 마취통증의학교실, 우편번호: 442-721

Tel: 031-219-4658, Fax: 031-219-5579

E-mail: anesylee@ajou.ac.kr

본 연구는 아주대학교 의과대학 대학원 연구비(3-2005-026-0)로 이루어졌습니다.

는다.¹⁷⁾

저자들은 백서의 피질 신경원 혼합배양 모델에서 OGD에 의한 뇌허혈과 재산소화에 의한 재관류 손상시 다양한 농도의 propofol, ketamine을 단독 혹은 혼합 투여하여 뇌보호 효과가 있는지, 두 약제 혼합 투여시 부가적인 뇌보호 효과가 있는지 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

이 실험은 본 병원 실험실 동물 관리 및 윤리 규정에 따라 행하였다. 몸무게 250–300 g의 임신한지 16일 되는 백서(Sprague-Dawley)를 물과 먹이가 충분히 공급되는 사육실에서 주위 환경에 적응시키며 하루동안 사육한 후 임신 17일째 제왕절개를 통해 태아를 꺼내어 세포배양 실험을 진행하였다. 실험에 필요한 시료들 중 Eagle's minimum essential medium (MEM), 포도당(glucose), 5% horse serum (HS), 5% fetal bovine serum (FBS), trypan-blue stain은 Gibco BRL (Carlsbad, CA, USA)로 부터 glutamine, poly-D-lysine, cytosine β -D-arabino-furanoside hydrochloride (Ara C)은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로 부터 laminin은 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로 부터 구입하였다.

세포배양

실험전 20 mM 포도당, 5% HS, 5% FBS, 2 mM glutamine을 섞은 MEM과 혼합하여 만든 100 μ g/ml의 poly-D-lysine과 4 μ g/ml의 laminin으로 24-well 배양 플레이트와 35 mm 배양 접시를 코팅 처리하였다. 백서를 ether 마취상자에 넣어 마취제를 흡입시켰으며, 호흡이 없어진 것을 확인한 후 꺼내어 경추탈골을 시켰다. 태아를 제왕절개를 통해 꺼낸 후, 20 mM 포도당을 섞은 MEM 용액에 담그고 태아의 뇌피질 부분을 분리하였다. 분리된 뇌 피질을 pasteur pipette으로 가볍게 분쇄한 뒤 미리 코팅된 24-well 배양 플레이트에 400 μ l, 35 mm 배양 접시에 2 ml 씩 분주하고, 37°C, 5% CO₂ 유산소배양기(aerobic chamber)에서 배양하였다. 배양한 세포는 1주후 glia가 자라나면 20 mM 포도당, 5% HS, 2 mM glutamine을 섞은 MEM 용액과 혼합하여 만든 10 μ M Ara C로처리하였고, Ara C 처리 후부터 실험 전까지 이를 간격으로 Ara C를 뺀 같은 배양액으로 1/3씩 바꾸어 주었다.

OGD (허혈) 재산소화(재관류) 손상과 약물처리

산소-포도당 결핍(oxygen-glucose deprivation, OGD)과 재산소화 모델은 뇌허혈과 재관류에 의한 신경세포 손상을 in vitro로 재현하는 모델이다.

13일째 혼합 배양된 세포를 사용하였으며, 35 mm 배양 접시의 세포는 대조군 실험에, 24-well 배양 플레이트는 나

머지군 실험에 사용되었다.

배양된 세포들은 약제를 처치하지 않고 유산소배양기에서 계속 배양시킨 대조군, 약제를 처치하지 않고 OGD-재관류 자극을 준 Blank 대조군, NMDA 500 μ M을 넣고 OGD-재관류 자극을 주어 세포사를 유도시킨 Full kill군, propofol 1, 10, 25, 50, 100 μ M 혹은 ketamine 1, 2.5, 5, 10, 50 μ M 단독처리군, ketamine 2.5, 5, 10 μ M + propofol 1, 10, 25, 50, 100 μ M 혼합 처리군으로 나뉘었으며, 각 약제는 OGD 자극 1시간 전부터 재관류 2시간 동안 계속적으로 처리하였다.

OGD (허혈) 손상은 포도당이 없고, 95% 질소 가스로 30분 동안 기포를 발생시켜 배지(media) 내의 잔여 산소를 제거해준 DMEM (산소제거 DMEM, Gibco, USA) 용액으로 배지를 바꾼후 5분간 무산소배양기에 넣어주는 방법으로 주었으며, 20 mM 포도당, 5% HS, 2 mM glutamine을 섞은 MEM 으로 배지를 바꾸어준 후 산소배양기에서 2시간 동안 배양하는 방법으로 재관류시켰다. OGD 손상과 재관류시의 약물 처리는 위의 각각의 배지에 혼합하였다.

살아있는 세포수 측정

재관류 후 10% trypan-blue stain을 15 μ l/well 씩 첨가하여 유산소배양기에서 15분간 배양하여 염색하였다. 이후 eyepiece micrometer square 10 \times 10 grid (Olympus, Japan)를 사용하여 염색되지 않은 살아있는 세포 수를 세었다. 모든군은 최소한 3마리의 쥐에서 결과를 얻었으며, 각 well 당 세 구역씩 선정하였고 군당 27구역을 선택하여 well의 중심 부위로부터 겹치지 않게 세포수를 세었다. 세포 수를 수식[100 \times (대조군값-실험군값/대조군값-Full-kill군값)]을 사용하여 유산소 대조군의 값을 0으로, NMDA 500 μ M 처리군(Full kill군)의 값을 100으로 하고, 이에 대한 각 실험군의 죽은 세포 백분율을 구하였으며, SPSS 12.0 (SPSS INC., USA)을 이용하여 One-way ANOVA test 실시하였고 사후 검증은 Bonferroni test로 실시하였다. 평균과 표준편차를 비교하여 P < 0.05 시 유의있는 것으로 간주하였다.

결 과

5분간의 OGD (허혈), 2시간의 재관류 자극은 70.51% 정도의 세포 사망률을 나타내었다(Fig. 1).

Propofol 10, 25, 50 100 μ M 처치군에서의 세포 사망율은 각각 57.74%, 52.88%, 46.64%, 43.51%으로 대조군(70.51%)에 비해 세포사망율이 유의있게 감소하였다(Fig. 1, Table 1).

Ketamine 5, 10, 50 μ M 처치군에서의 세포사망율은 각각 48.24%, 45.42%, 39.86%으로 대조군(70.51%)에 비해 세포사망율이 유의있게 감소하였다(Fig. 2, Table 1).

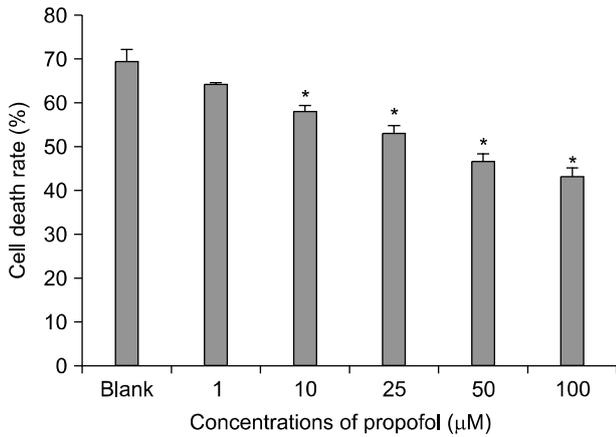


Fig. 1. Figure shows the cell death rate in each concentration of propofol treated group during oxygen-glucose deprivation (OGD)-reoxygenation injury. Values are expressed as mean ± SD. 10, 25, 50 and 100 μM propofol treated group decreased the cell death rate compared with Blank group (P < 0.05). Blank: cell group without drug treatment during OGD-reoxygenation injury. *: P < 0.05 indicates significant differences compared with Blank group value.

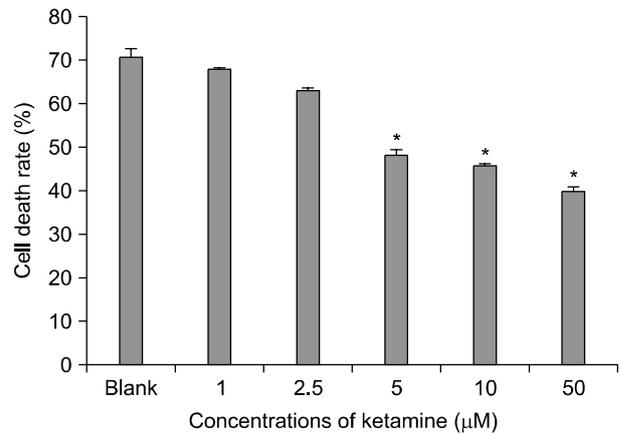


Fig. 2. Figure shows the cell death rate in each concentration of ketamine treated group during oxygen-glucose deprivation (OGD)-reoxygenation injury. Values are expressed as mean ± SD. 5, 10 and 50 μM of ketamine treated group decreased the cell death rate compared with Blank group (P < 0.05). Blank: cell group without drug treatment during OGD-reoxygenation injury. *: P < 0.05 indicates significant differences compared with Blank group value.

Table 1. The Effects of Ketamine-Propofol Combination Therapy on Cell Death Rate (%) during Oxygen-Glucose Deprivation (OGD)-Reoxygenation Injury

	P Only	K 2.5	K 5	K 10
K only		62.37 ± 5.57	48.24 ± 9.47	45.42 ± 10.96
P 1	64.41 ± 6.69	59.62 ± 6.47	52.34 ± 6.76 [†]	49.12 ± 6.15 [†]
P 10	57.74 ± 9.85	54.66 ± 6.17	47.13 ± 7.68 [†]	44.49 ± 9.41 [†]
P 25	52.88 ± 7.02	51.07 ± 7.30	45.39 ± 8.75 [†]	41.55 ± 10.01 [†]
P 50	46.64 ± 9.04	47.80 ± 6.52*	47.13 ± 7.68	38.50 ± 9.16
P 100	43.51 ± 7.95	42.97 ± 7.76*	40.29 ± 6.56	34.93 ± 6.47*

Values are mean ± SD. Number of each group are 27. P only: propofol only treated group, P 1, P 10, P 25, P 50 and P 100: propofol 1, 10, 25, 50 and 100 μM treated group. K only: ketamine only treated group, K 2.5, K 5, K 10: ketamine 2.5, 5 and 10 μM treated group. *: P < 0.05 compared with the same dosage ketamine only treated group. [†]: P < 0.05 compared with the same dosage propofol only treated group.

Ketamine 2.5, 5, 10 μM과 각 농도의 propofol을 혼합 투여한 결과 세포사망율을 ketamine 2.5 μM 단독투여시 62.37%에서 propofol 50, 100 μM 혼합투여시 47.80%, 42.97%로 의의있게 감소시켰으며(Table 1), ketamine 10 μM 단독투여시 세포사망율 45.42%에서 propofol 100 μM 혼합투여시 34.93%로 의의있게 감소시켰다(Table 1). 또한 propofol 1, 10, 25 μM과 ketamine 10, 50 μM 혼합 투여시 세포사망율을 의의있게 감소시켰다(Table 1).

고 찰

본 연구에서 사용한 산소-포도당 결핍(oxygen-glucose deprivation, OGD)과 재산소화 모델은 뇌허혈과 재판류에 의한 신경세포 손상을 in vitro로 재현하는 모델이며,^{4,18,19} propofol과 ketamine을 단독 혹은 혼합 투여하여 부가적인 뇌보호 효과가 있는지 살펴보았는데, 혼합투여시 일부 농도에서 부가적 뇌보호 효과가 있었다.

뇌허혈과 재판류에 의한 뇌손상의 기전으로 신경흥분 독성(Excitotoxicity)이 주요한 기전 중 하나로 알려져 있는데 이는 과다 분비된 glutamate 등 흥분성 아미노산에 의한 수

용체들의 과도한 자극으로 인한 신경세포 세포사멸(neuronal cell death)이 일어나는 것을 의미한다.^{1-3,20-22)} 세포외 glutamate의 농도는 접합 분절로의 분비와 glutamate transporter의 흡수에 의해 유지되고 있는데, 뇌허혈시에는 ATP 소실에 의해 탈분극화된 접합전 신경에서의 흥분성 아미노산들(glutamate, aspartate 등)의 다량 분비와^{3,20,21)} 허혈에 의한 astrocyte에 있는 glutamate transporter 작용의 억제 혹은 역작용에 의해 허혈 수분 내에 glutamate의 농도가 급격히 증가한다.²³⁻²⁵⁾ 증가된 glutamate는 흥분성 아미노산 수용체 중 하나인 NMDA 수용체를 주로 활성화시켜 세포 내로의 Ca^{2+} 유입을 증가시키게 된다. 증가된 Ca^{2+} 에 의해 일련의 뇌손상 작용이 일어나게 되는데,¹⁾ 첫째로 Ca^{2+} 과 함께 Na^+ , Cl^- 등이 세포내로 같이 유입되어 세포의 삼투성 팽창을 가져오며,²⁶⁾ 두번째로는 Ca^{2+} 이 공통의 2차 매개체로 작용하기 때문에 여러가지 해로운 효소들을 활성화시킬 수 있는데,²⁷⁾ phospholipase A_2 와 cyclooxygenase에 의한 유리의 생성, endonucleases에 의한 DNA 분해, neuronal nitric oxide synthase (nNOS)에 의한 NO의 생성과 NO와 superoxide의 반응에 의한 peroxynitrite의 형성 등이 이에 속하며,^{27,28)} 허혈에 의한 사립체의 손상도 뇌손상 기전에 관여한다.²⁹⁾ 이와 같은 일련의 손상 과정은 세포 분해를 가져오며, 주로 괴사(necrosis) 형태의 세포사멸(cell death)을 일으킨다.

재관류시에도 세포가 손상을 받는데, 활성산소(reactive oxygen species)와 활성질소(nitrogen species)의 과도한 생성에 의한 단백질이나 세포막의 손상이 주요 기전이라 하였으며,³⁰⁾ Li 등의¹⁹⁾ in vitro 실험에 의하면 허혈시에는 세포 팽창과 neurite 손상 등 약한 정도의 손상과 신경학적 손상의 시작 단계만 나타나지만, 비가역적 심한 정도의 손상은 재관류에 의해 나타난다 하였다. 또한 이들은 본 연구에서와 같은 허혈과 2시간 정도의 짧은 재관류에서는 세포막 손상을 동반하는 괴사 형태의 세포사멸이 주로 일어나고, 재관류가 수일 정도 지속되면 세포자멸사(apoptosis) 형태의 세포 손상이 나타난다 하였다.¹⁹⁾ Engelhard 등도³¹⁾ 재관류 후의 세포 손상은 괴사와 세포자멸사의 요소를 다 가지고 있으며, 세포자멸사는 재관류 4시간 후에 나타나기 시작한다고 보고하였다. 본 논문에서는 5분간의 in vitro 허혈과 2시간의 재관류를 시행했으므로 신경 손상이 세포자멸사보다는 괴사에 의한 가능성이 많다고 생각되어지지만, 신경세포 손상의 형태가 괴사인지 세포자멸사인지를 확인하기 위한 효소 측정과 염색 등을 실시하지는 않았다.

Propofol의 뇌보호 효과에 대해서는 in vivo와 in vitro 상에서 많은 연구들이 진행되었다.^{5-10,32-36)} 본 연구에서는 propofol을 허혈자극 전부터 투여하기 시작하여 2시간의 재산화기간 동안 계속 투여하였고, 10-100 μ M의 농도에서 살아있는 세포수를 유의있게 증가시켰다. Young 등은³²⁾ rat

를 이용한 in vivo 뇌허혈-재관류 실험에서 propofol을 뇌허혈 중간부터 재관류시까지 투여하였을 때 뇌경색 용적을 21% 감소시킬 수 있었다고 보고하였으며, Yamakura 등은³³⁾ 20 μ M의(임상농도: -35 μ M) propofol이 NMDA 채널을 24% 억제한다 보고하였는데, 이는 대조군에 비해 propofol 25 μ M 투여군에서사망세포율을 70.51%에서 52.88%로 감소시킨 저자들의 보고와 비슷하며(Fig. 1, Table 1), 임상적으로 사용 가능한 propofol의 용량에 해당한다(-35 μ M).³³⁾

Propofol의 뇌보호 기전으로는 두개내압의 감소, 뇌대사율의 감소, 뇌의 산소요구량 감소,⁵⁾ glutamate 수용체에 길항제로서의 작용,^{7,8,33)} Na^+ 이온채널 의존적 glutamate 분비 감소,³⁴⁾ glutamate 흡수의 증가,^{6,35)} 세포외 glutamate 농도의 감소, 항산화제로 작용하여 유리기 제거자(free radical scavenger)로 작용하는 기전³⁶⁾ 등이 보고되고 있다. 본 연구는 in vitro 실험이므로 뇌보호 주요 기전인 뇌대사율의 감소 등이 관여하지는 않겠지만 정확한 기전을 알려면 추가 연구가 필요하다.

Ketamine은 여러가지 in vivo 와 in vitro 실험에서 주로 NMDA수용체 길항제로 작용하여 뇌보호 효과를 나타낸다고 보고하고 있다.¹³⁻⁵⁾ 본 연구에서는 5-50 μ M의 농도에서 뇌보호 효과가 있었으며, 이는 마취시 최대 혈장 농도가 8.5-9.5 μ M이며, 실제 NMDA 수용체 도달 농도는 몇 배 더 높을 것이라는 보고로 미루어 보아¹²⁾ 임상적으로 사용 가능한 용량이다. Shibuta 등은¹⁵⁾ in vitro에서 NMDA 자극시 5 μ M 이상의 ketamine은 살아있는 신경세포 수를 유의있게 증가시킨다고 보고하여 우리의 결과와 일치하였으며, Rothman 등은¹⁴⁾ in vitro에서 10 μ M 이상의 ketamine은 허혈시 ATP 손실을 유의있게 감소시킨다고 보고하였는데, 이는 Rothman 등이 이 이하의 농도에서는 실험하지 않았기 때문이라고 생각되어진다. Jensen 등은¹⁶⁾ in vivo상에서 허혈 전과 이후 7일간 ketamine을 투여하며 실험한 결과 ketamine이 뇌보호 효과가 없다 보고하였는데, 이는 본 연구의 결과와 일치하지 않으며, in vivo 상에서는 뇌혈류량, 두개내압의 증가, 뇌대사율의 증가, 뇌의 산소요구량 증가 등의 영향이 있기 때문이 아닌가 생각되어진다. 두 약제를 혼합 사용하여 부가적 뇌보호 효과를 기대할 수 있다면 이상적인데, 본 연구 결과 저용량의 ketamine 2.5 μ M 단독 투여시 뇌보호 효과가 없었으나, propofol 50, 100 μ M과 혼합투여시 세포사망율을 62.37%에서 47.80%, 42.97%로 감소시켜 부가적 뇌보호 효과가 있었으며, 이중 propofol 50 μ M은 임상적으로도 사용 가능한 용량이다(-35 μ M).³³⁾ 또한 propofol 1 μ M 단독 투여시는 뇌보호 효과가 없었으나 ketamine 5, 10 μ M 혼합투여시 세포사망율을 64.41%에서 52.34%, 49.12%로 감소시켜 부가적 뇌보호 효과가 있었다.

Kwon 등은³⁷⁾ 전뇌허혈시(in vivo model) 허혈전 10분동안

ketamine과 propofol 혼합 투여시 뇌경색 면적을 줄이지 못하였다고 하였는데, 이는 본 논문의 결과와 일치하지 않으며, 본 연구가 in vitro 상에서 행하여 졌으므로 단순 비교는 어렵다고 생각되어진다.

Shibuta 등은¹⁵⁾ in vitro에서 NMDA 자극과 동시에 ketamine 과 thiopental sodium (TPS)을 단독 혹은 혼합 투여하여 실험하여 본 결과, ketamine 5 μ M 이상시 뇌보호 효과가 있었으며, ketamine 5 혹은 10 μ M과 TPS 50 μ M 혼합투여시 뇌보호 효과가 상승 되었다고 보고하였는데, TPS는 NMDA 길항제, 유리기 제거자 등으로 작용하여 뇌보호 효과가 있다고 알려진 약이어서 propofol과 비슷한 기전 뇌보호 기전을 가지고 있으며,^{10,38)} 이는 본 연구의 결과와 비슷하였다.

백서 피질 신경원 혼합배양 모델에서 OGD-재산소화에 의한 허혈과 재판류 손상시 10 μ M 이상의 propofol, 5 μ M 이상의 ketamine이 뇌보호 효과가 있었으며, ketamine 2.5 μ M + propofol 50, 100 μ M과 혼합투여시 혹은 propofol 1 μ M + ketamine 5, 10 μ M 혼합투여시 부가적 뇌보호 효과가 있었다. 기전 등에 대해서는 추가 연구가 필요하리라 생각되어진다.

참 고 문 헌

1. Choi DW: Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992; 23: 1261-76.
2. Koh J, Choi DW: Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* 1987; 20: 83-90.
3. Rothman SM, Olney JW: Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann Neurol* 1986; 19: 105-11.
4. Goldberg MP, Weiss JH, Pham PC, Choi DW: N-methyl-D-aspartate receptors mediate hypoxic neuronal injury in cortical culture. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 243: 784-91.
5. Kochs E, Hoffmann WE, Werner C, Thomas C, Albrecht RF, Schult am Esch J: The effects of propofol on brain electrical activity: neurological outcome and neuronal damage following incomplete ischemia in rats. *Anesthesiology* 1992; 76: 245-52.
6. Peters CE, Korcok J, Gelb AW, Wilson JX: Anesthetic concentrations of propofol protect against oxidative stress in primary astrocyte cultures. *Anesthesiology* 2001; 94: 313-21.
7. Han P, Bonhomme V, Collette J, Albert A, Moonen G: Propofol protects cultured rat hippocampal neurons against N-methyl-D-aspartate receptor-mediated glutamate toxicity. *J Neurosurg Anesthesiol* 1994; 6: 249-53.
8. Orser BA, Bertlik M, Wang LY, MacDonald JF: Inhibition by propofol (2,6 di-isopropylphenol) of the N-methyl-D-aspartate subtype of glutamate receptor in cultured hippocampal neurons. *Br J Pharmacol* 1995; 116: 1761-8.
9. Shibuta S, Varathan S, Inoue T, Shimizu T, Varathan V, Tomi K, et al: The effects of propofol on NMDA or nitric oxide mediated neurotoxicity in vitro. *Neuroreport* 2001; 12: 295-8.
10. Zhu H, Cottrell JE, Kass IS: The effect of thiopental and propofol on NMDA- and AMPA-mediated glutamate excitotoxicity. *Anesthesiology* 1997; 87: 944-51.
11. Anis NA, Berry SC, Burton NR, Lodge D: The dissociative anesthetics ketamine and phencyclidine selectively reduce excitation of central mammalian neurones by N-methylaspartate. *Br J Pharmacol* 1983; 79: 565-75.
12. Orser BA, Pennefather PS, MacDonald JF: Multiple mechanisms of ketamine blockade of N-methyl-D-aspartate receptors. *Anesthesiology* 1997; 86: 903-17.
13. Church J, Zeman S, Lodge D: The neuroprotective action of ketamine and MK-801 after transient cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology* 1988; 69: 702-9.
14. Rothman SM, Thurston JH, Hauhart RE, Clark GD, Solomon JS: Ketamine protects hippocampal neurons from anoxia in vitro. *Neuroscience* 1987; 21: 673-8.
15. Shibuta S, Varathan S, Mashimo T: Ketamine and thiopental sodium: individual and combined neuroprotective effects on cortical cultures exposed to NMDA or nitric oxide. *Br J Anaesth* 2006; 97: 517-24.
16. Jensen ML, Auer RN: Ketamine fails to protect against ischaemic neuronal necrosis in the rat. *Br J Anaesth* 1988; 61: 206-10.
17. Langsjo JW, Kaisti KK, Aalto S, Hinkka S, Aantaa R, Oikonen V, et al: Effects of subanesthetic doses of ketamine on regional cerebral blood flow, oxygen consumption, and blood volume in humans. *Anesthesiology* 2003; 99: 614-23.
18. Tabor MP, Van der Worp HB, Sooda P, Veldman H, Joosten EA, Strous G, et al: An advanced in vitro model to study hypoxia/low glucose-induced neuronal cell damage and death. *Ann NY Acad Sci* 1997; 825: 267-78.
19. Li D, Shao Z, Vanden Hoek TL, Brorson JR: Reperfusion accelerates acute neuronal death induced by simulated ischemia. *Exp Neurol* 2007; 206: 280-7.
20. Benveniste H, Drejer J, Schousboe A, Diemer NH: Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* 1984; 43: 1369-74.
21. Rothman SM: Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitters mediates anoxic neuronal death. *J Neurosci* 1984; 4: 1884-91.
22. Calò G, Sbrenna S, Bianchi C, Beani L: Immediate and delayed effects of in vitro ischemia on glutamate efflux from guinea-pig cerebral cortex slices. *Brain Res* 1997; 751: 300-6.
23. Rossi DJ, Oshima T, Attwell D: Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000; 403: 316-21.
24. Jabaudon D, Scanziani M, Gähwiler BH, Gerber U: Acute decrease in net glutamate uptake during energy deprivation. *PNAS* 2000; 97: 5610-5.
25. Bonde C, Norberg J, Noer H, Zimmer J: Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 2005; 136: 779-94.
26. Rothman SM, Thurston JH, Hauhart RE: The neurotoxicity of

- excitatory amino acids is produced by passive chloride influx. *J Neurosci* 1985; 5: 1483-9.
27. Gunasekar PG, Kanthasamy AG, Borowitz JL, Isom GE: NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implications for cell death. *J Neurochem* 1995; 65: 2016-21.
 28. Lancelot E, Lecanu L, Revaud ML, Boulu RG, Plotkine M, Callebert J: Glutamate induces hydroxyl radical formation in vivo via activation of nitric oxide synthase in Sprague-Dawley rats. *Neurosci Lett* 1998; 242: 131-4.
 29. Chan PH: Mitochondrial dysfunction and oxidative stress as determinants of cell death/survival in stroke. *Ann NY Acad Sci* 2005; 1042: 203-9.
 30. Li C, Jackson RM: Reactive species mechanisms of cellular hypoxia- reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 282: C 227-41.
 31. Engelhard K, Werner C, Eberspächer E, Bachl M, Blobner M, Hildt E, et al: The effect of the α_2 -agonist dexmedetomidine and the N-methyl-D-aspartate antagonist S(+)-ketamine on the expression of apoptosis-regulating proteins after incomplete cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Anesth Analg* 2003; 96: 524-31.
 32. Young Y, Menon DK, Tisavipat N, Matta BF, Jones JG: Propofol neuroprotection in arat model of ischemia reperfusion injury. *Eur J Anesthesiol* 1997; 14: 320-6.
 33. Yamakura T, Sakimura K, Shimoji K, Mishina M: Effects of propofol on various AMPA-, kainate- and NMDA-selective glutamate receptor channels expressed in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 1995; 188: 187-90.
 34. Ligamaneni R, Birch ML, Hemmings Jr HC: Widespread inhibition of sodium channel-dependent glutamate release from isolated nerve terminals by isoflurane and propofol. *Anesthesiology* 2001; 95: 1460-6.
 35. Velly LJ, Guillet BA, Masmajan FM, Nieoullon AL, Bauder NJ, Gouin FM, et al: Neuroprotective effects of propofol in a model of ischemic cortical cell cultures: role of glutamate and its transporters. *Anesthesiology* 2003; 99: 368-75.
 36. Sagara Y, Hendler S, Khoh-Reiter S, Gillenwater G, Carlo D, Schubert D, et al: Propofol hemisuccinate protects neuronal cells from oxidative injury. *J Neurochem* 1999; 73: 2524-30.
 37. Kwon JY, Jeon JH, Chung KS, Kim IS, Baik SW, Kim HK: Neuroprotective effects of propofol, ketamine and propofol-ketamine after transient forebrain ischemia in the rat. *Korean J Anesthesiol* 2001; 40: 238-43.
 38. Zahn RZ, Fujiwara N, Endoh H: Thiopental inhibits increases in $[Ca^{2+}]$ induced by membrane depolarization, NMDA receptor activation, and ischemia in rat hippocampal and cortical slices. *Anesthesiology* 1998; 89: 456-66.