

Revista Colombiana de Anestesiología

Colombian Journal of Anesthesiology

www.revcolanest.com.co



Investigación científica y tecnológica

La ketamina mejora la supervivencia en lesión por quemadura severa en ratas, a través de la expresión de la proteína de choque 70

Zhang Meng-yuan^{a,*}, Wang Gong-ming^a, Li Fang-lin^b, Dong Ling^c,
Xu Yan-bing^a y Chiang Joseph-S^d

^a Departamento de Anestesiología, Hospital de la Provincia de ShanDong, afiliado a la Universidad de ShanDong, Jinan, China

^b Departamento de Hematología, Hospital Qilu, afiliado a la Universidad de Shandong, Jinan, China

^c Departamento de Anestesiología, Qianfo Mountain Hospital, Jinan, China

^d Departamento de Anestesiología y Medicina Perioperatoria, Universidad de Texas M. D. Anderson Cancer Center, Houston, Texas, Estados Unidos

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido el 3 de junio de 2012

Aceptado el 23 de enero de 2013

On-line el 12 de abril de 2013

Palabras clave:

Ketamina

Supervivencia

Choque

Citoprotección

R E S U M E N

Se ha demostrado que la ketamina, un anestésico general, produce una respuesta de choque térmico (HSR) en algunos animales experimentales. Examinamos si la ketamina mejora la supervivencia en lesión por quemadura severa en ratas, a través de la expresión de la proteína de choque 70. Un total de 124 ratas Wistar machos se dividieron aleatoriamente en 3 grupos: un grupo de control (grupo C, n=20), un grupo quemado (grupo B, n=52) y un grupo quemado + ketamina (grupo K, n=52). Las ratas de los grupos B y K presentaban quemaduras de espesor completo en el 30% del total de su superficie corporal. Las ratas del grupo K se trataron con ketamina (40 mg/kg, i.m.) a los 15 min después de la lesión y las del grupo B se inyectaron con igual volumen de solución salina. Luego de practicar la eutanasia a las ratas, se examinó la expresión de HSP70 en muestras del miocardio y del cerebro con análisis Western blot. En las ratas que no se sacrificaron se evaluó el estado de supervivencia. Luego de 10 días, la tasa de supervivencia en las ratas del grupo K era superior a las del grupo B (70% versus 30%). Los análisis Western blot mostraron que la expresión de proteína HSP70 en el miocardio en respuesta a la administración de ketamina es más fuerte que en respuesta a la administración de solución salina a las 3 h (158% versus 65%) y a las 6 h (165% versus 68%). En comparación con el grupo B, la ketamina aumentó marcadamente el nivel de expresión de la proteína HSP70 en tejido cerebral a las 3 h y a las 6 h (79% versus 51% a las 3 h; 123% versus 98% a las 6 h). Concluimos que el tratamiento con ketamina mejora la supervivencia en lesión por quemadura severa, mediante la expresión de la proteína de choque 70 en los tejidos del miocardio y del cerebro.

© 2012 Sociedad Colombiana de Anestesiología y Reanimación. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia. Departamento de Anestesiología, Hospital de la Provincia de ShanDong, afiliado a la Universidad de ShanDong, 324 Jingwuweiqilu, Jinan, R.P. de China, 250021.

Correo electrónico: zhangmy717@163.com (Z. Meng-yuan).

0120-3347/\$ – see front matter © 2012 Sociedad Colombiana de Anestesiología y Reanimación. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.
http://dx.doi.org/10.1016/j.rca.2013.01.003

Ketamine improves survival in severe burn injury in rats via the expression of heat shock protein 70

ABSTRACT

Keywords:

Ketamine
Survivors
Shock
Cytoprotection

Ketamine, a general anesthetic, has been shown to elicit the heat-shock response (HSR) in some of the animal models. We examined whether ketamine improves survival in severe burn injury in rats via the expression of heat shock protein 70. 124 male Wistar rats were randomly divided into three groups: a control group (group C, $n=20$), burned group (group B, $n=52$), and burned + ketamine group (group K, $n=52$). The rats in groups B and K had full-thickness burns of 30% of their total body surface. The rats in group K were treated with ketamine (40 mg/kg, i.m.) 15 min after injury, and those in group B were injected with saline at the same volume. After the rats were euthanized, HSP70 expression in myocardium and brain samples was examined by Western blot analysis. Survival status was evaluated for the rats not euthanized. After 10 days, survival rate of rats in group K was higher than that of group B (70% versus 30%). Western blot analyses revealed that HSP70 protein expression in myocardium in response to ketamine administration is stronger than that in response to saline administration at 3 h (158% versus 65%) and 6 h (165% versus 68%). Compared with that in group B, ketamine strongly increased HSP70 protein expression level in cerebral tissue at 3 h and 6 h (79% versus 51%, at 3 h; 123% versus 98%, at 6 h). We concluded that ketamine therapy improves survival in severe burn injury via the expression of heat shock protein 70 in myocardial and cerebral tissues.

© 2012 Sociedad Colombiana de Anestesiología y Reanimación. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introducción

La respuesta al choque térmico (HSR) es un sistema de defensa celular altamente conservado a lo largo de la evolución^{1,2}. Se puede encontrar en un amplio espectro de organismos, desde los procariontes hasta los seres humanos. El mecanismo molecular subyacente se basa en la capacidad que tiene el factor de transcripción del factor de choque térmico (HSF)-1 de mostrar una actividad inducible de enlace al ADN al elemento de consenso del choque térmico (HSE) e implica múltiples pasos, incluyendo la translocación nuclear, la oligomerización y la fosforilación del HSF-1 inducible por serina, siendo esta última un determinante importante de la potencia transactivadora del HSF-1³. La HSR se caracteriza por la expresión de proteínas de choque térmico (hsp), que son sintetizadas por las células en respuesta al calor (de ahí su nombre), al igual que a otros varios estímulos productores de estrés^{4,5}. Se ha demostrado que la expresión de las proteínas de choque térmico, clasificadas según su función y tamaño, protege las células de una amplia gama de factores causantes de estrés celular, como la hipoxia, los radicales de oxígeno, las endotoxinas, las infecciones y la fiebre⁶. La capacidad citoprotectora de la proteína de choque térmico se puede atribuir parcialmente a su capacidad para estabilizar las estructuras de las proteínas intracelulares, lo que permite que las células y organismos que soportan agresiones y ponen su vida en peligro recuperen sus actividades celulares y fisiológicas normales⁷.

Se ha demostrado que la ketamina, un anestésico general, en algunos animales experimentales produce la respuesta al choque térmico (HSR) aumentando la concentración de proteína de choque térmico 70 (HSP70) en la mucosa olfatoria⁸ y la corteza cerebral de las ratas⁹. De acuerdo con otros autores¹⁰, los cerdos anestesiados con ketamina y pentobarbital han

mostrado mayores expresiones de HSP70 en el hígado. El potencial de protección de la HSR en quemaduras ha sido demostrado previamente; las ratas precondicionadas por calor tuvieron una menor mortalidad tras sufrir quemaduras severas, en comparación con los animales sin quemaduras¹¹. Por tanto, la hipótesis del presente estudio fue determinar si la ketamina también podría mejorar la supervivencia en ratas con quemaduras severas, al inducir la expresión de la proteína de choque térmico 70 en tejido miocárdico y cerebral.

Métodos

Preparación de los animales

El protocolo experimental utilizado para el presente estudio fue aprobado por el Centro para Experimentación Animal del Hospital de la Provincia de Shandong y se desarrolló conforme a las Normativas para la Administración de Asuntos Relativos a Animales Experimentales (el Concejo de Estado, China, 1988). Antes del estudio, las ratas se alojaron en jaulas individuales en una sala a temperatura controlada, con ciclos alternantes de 12 h de luz y oscuridad; todos los animales tuvieron acceso libre al agua.

Protocolo de lesión por quemadura

Las ratas se anestesiaron con halotano inhalado al 4%. Se afeitó el dorso de las ratas y se sumergieron en agua a 92 °C durante 20 s, lo cual les produjo una quemadura de espesor completo que comprometía el 30% de la superficie corporal total. El efecto hemodinámico de la formación de edema y la exudación sérica en el sitio de la quemadura se minimizó mediante la administración de 5 ml de solución salina

normal IP, inmediatamente después de la lesión por quemadura. En estudios preliminares, el examen histopatológico del área quemada indicó que este modelo de lesión produce una quemadura reproducible de espesor completo de piel, generalmente sin producir lesión directa a los órganos subyacentes.

Procedimiento para la toma de muestras

Ratas Wistar machos ($n=124$) con un peso de 250-350 g se asignaron aleatoriamente a 3 grupos: grupo control (grupo C) ($n=20$); grupo quemado (grupo B) ($n=52$) y el grupo quemado + ketamina (grupo K) ($n=52$). Las ratas del grupo K recibieron una inyección intramuscular de ketamina (40 mg/kg) después de 15 min de producirse la lesión por quemadura, mientras que a las del grupo B se les inyectó igual volumen de solución salina. Se sacrificaron 8 de cada uno de los grupos K y B, a las 3, 6 y 24 h después de la inyección. Se cosecharon muestras de todos los grupos para detectar HSP70 mediante análisis de Western Blot. Se evaluó la condición de supervivencia de las ratas restantes de cada grupo a las 3, 6, 12, 24, 48, 96, 192 y 240 h.

Detección de proteína de choque térmico 70 (análisis Western blot)

El tejido miocárdico y cerebral se descongeló, se desmenuzó finamente, se pesó y lavó con solución salina fría con tapón fosfato y se homogenizó sobre hielo. El producto homogenizado se centrifugó a 20.000 rpm a 4 °C durante 30 min. Las muestras de proteína se hirvieron durante 10 min a 100 °C; luego se separaron con electroforesis en gel de dodecil sulfato-policrilamida sódica (SDS-PAGE) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. Luego de bloquear con leche desgrasada en polvo al 5% en solución salina tamponada con Tris con 0,1% Tween 20 (TBS/T) durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron las membranas 3 veces durante 10 min en TBS/T y luego se incubaron de un día para otro a 4 °C, con anticuerpo monoclonal anti-HSP70 conjugado a fosfato alcalino (SPA-810AP, StressGen) a una concentración de 1:1000. Las membranas se lavaron 3 veces durante 10 min en TBS/T y luego se incubaron con los anticuerpos secundarios conjugados de peroxidasa apropiados. Luego de 3 lavados adicionales con TBS/T durante 10 min, las membranas se sometieron a reacción con el sistema de quimioluminiscencia mejorado y luego se expusieron sobre laminillas. Se cuantificaron los niveles de proteína por densimetría utilizando Quantity One V4.62 (Bio-Rad).

Análisis estadístico

Todos los valores se expresan como $\pm$ error estándar de la media (SEM). La significación estadística de las diferencias entre grupos se evaluó mediante análisis de varianza unidireccional y las diferencias dentro de grupos mediante la prueba t de Student no apareada, utilizando el software SPSS 11.0. Se aplicó la prueba exacta de Fisher a los datos de supervivencia. $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

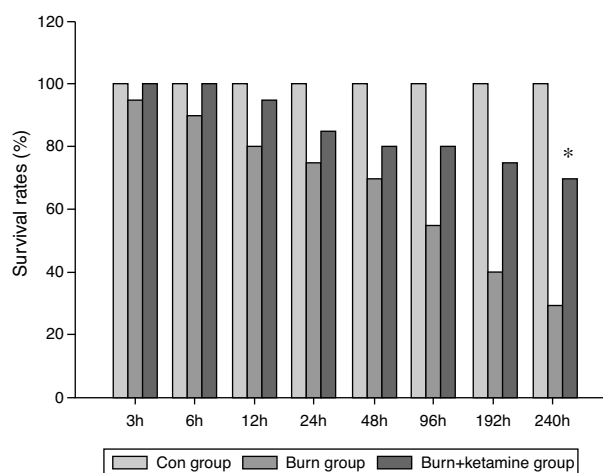


Figura 1 – Comparación de las tasas de supervivencia en el grupo control (Con), en el grupo quemado y en el grupo quemado + ketamina.

* $p < 0,05$ vs. grupo quemado.

Resultados

Estado de supervivencia

En el grupo C no murió ningún animal en las primeras 240 h. La tasa de supervivencia de las ratas con quemaduras severas en el grupo B fue del 95% (19 de 20 ratas) a las 3 h, 90% (18/20) a las 6 h, 80% (16/20) a las 12 h, 75% (15/20) a las 24 h, 70% (14/20) a las 48 h, 55% (11/20) a las 96 h, 40% (8/20) a las 192 h y 30% (6/20) a las 240 h. La supervivencia en el grupo K fue del 100% (20/20) a las 3 h, 100% (20/20 animales) a las 6 h, 95% (19/20) a las 12 h, 85% (17/20) a las 24 h, 80% (16/20) a las 48 h, 80% (16/20) a las 96 h, 75% (15/20) a las 192 h y 70% (14/20) a las 240 h. Las diferencias en las tasas de supervivencia entre el grupo K y el grupo B fueron estadísticamente significativas a las 240 h ($p < 0,05$) (fig. 1).

Detección de respuesta al choque térmico

Los análisis de Western blot revelaron que la expresión de la proteína HSP70 en el miocardio en respuesta a la administración de ketamina es más fuerte que en respuesta a la administración de solución salina a las 3 h (158% versus 65%, $p=0,008$) y 6 h (165% versus 68%, $p=0,005$). Además, la expresión de proteína HSP70 en el miocardio alcanzó su pico a las 24 h (fig. 2).

En comparación con el grupo B, la ketamina aumentó de manera marcada el nivel de expresión de la proteína HSP70 en tejido cerebral a las 3 y a las 6 h (79% versus 51%, $p=0,023$ a las 3 h; versus 98%, $p=0,015$ a las 6 h). Más aún, los análisis Western blot revelaron que la expresión de proteína HSP70 en el miocardio alcanzó su pico a las 12 h (fig. 3).

Discusión

En el presente trabajo no murió ningún animal debido a la inmovilización ni a los procedimientos de inyección. El modelo

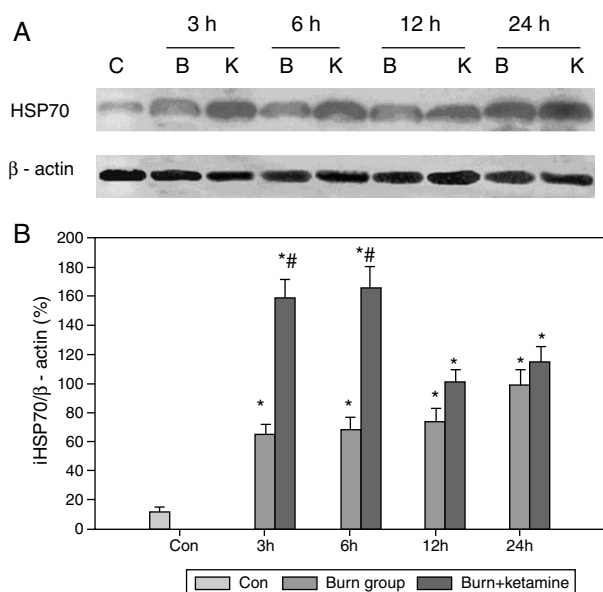


Figura 2 – Experimento Western blot representativo sobre la expresión de HSP70 en el miocardio de las ratas en el grupo control (Con), en el grupo quemado y en el grupo quemado + ketamina (A); se muestra la evaluación densimétrica de la expresión de HSP70 de 8 ratas experimentales (B). Los datos (media [SEM]) muestra la relación de iHSP70 a β-actina.

*p < 0,05 vs. grupo contrpl; #p < 0,05 vs. grupo quemado.

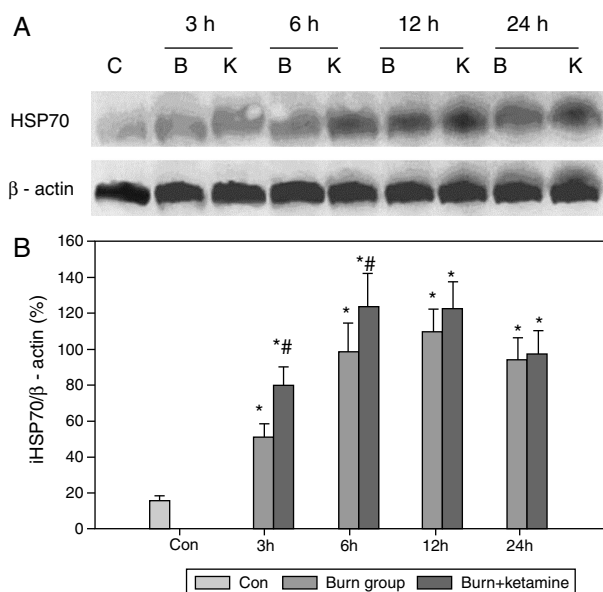


Figura 3 – Experimento Western blot representativo sobre la expresión de HSP70 en el cerebro de las ratas del grupo control (Con), del grupo quemado y del grupo quemado + ketamina (A); se muestra la evaluación densimétrica de la expresión de HSP70 de 8 ratas experimentales (B). Los datos (media [SEM]) muestran la relación de iHSP70 a β-actina.

*p < 0,05 vs. grupo control; #p < 0,05 vs. grupo quemado.

de quemadura, utilizado comúnmente¹², permitió una graduación más exacta de la extensión de la quemadura, de acuerdo con la superficie corporal, como se obtuvo con la fórmula de Meeh. Este proceso produjo quemaduras estándar de tercer grado. Se ha encontrado que las ratas Wistar son más susceptibles a las lesiones térmicas que las Sprague-Dawley¹³. La ketamina, un anestésico general, ha demostrado que produce la respuesta a choque térmico (HSR) en algunos animales experimentales: ha aumentado la concentración celular de la proteína de choque térmico (HSP70) en la mucosa olfatoria⁸ y en la corteza cerebral de las ratas⁹. Sin embargo, poco se sabe acerca de si la administración de ketamina mejora la supervivencia en lesión por quemadura severa. Los datos aquí presentados brindan evidencia de que el tratamiento con ketamina mejora la supervivencia en lesión por quemadura severa. Esto está además respaldado por los informes de Neder Meyer y Lázaro da Silva¹⁴, los cuales afirman que los animales anestesiados con ketamina acusaron una tasa de mortalidad significativamente menor a la de los animales anestesiados con la combinación de midazolam y fentanilo.

Nuestro hallazgo de que la ketamina administrada 15 min después de la lesión por quemadura mejoró la supervivencia fue inesperado, considerando un reporte de que la ketamina administrada 1h después de la lesión por quemadura no mejoró la supervivencia¹⁵. La aparente inconsistencia entre nuestros resultados y los del estudio anterior pueden relacionarse con las diferencias en la severidad de la lesión por quemadura y la dosis de ketamina. En el estudio anterior, la quemadura produjo una mortalidad de 15-20% sin tratamiento con ketamina, mientras que en nuestro estudio la quemadura produjo un 70% de mortalidad. En el estudio anterior, la dosis de ketamina fue de 10 mg/kg, considerablemente inferior a la dosis utilizada en nuestro estudio, de 40 mg/kg. Los resultados combinados de nuestro estudio y el anterior sugieren que puede demostrarse una reducción en la mortalidad inducida por quemaduras cuando se administra una alta dosis de ketamina en un modelo de lesión por quemadura severa, mas no cuando se administra una dosis menor de ketamina tras una lesión por quemadura menos severa.

Los datos aquí presentados respaldan la hipótesis de que la ketamina induce una respuesta a choque térmico y que media la citoprotección contra lesión severa por quemadura a concentraciones tisulares clínicamente relevantes según la doble evidencia: a) los análisis Western blot revelaron que la administración de ketamina indujo la expresión de proteína HSP70 en el tejido cerebral y miocárdico; b) después de 10 días, la tasa de supervivencia de las ratas del grupo K fue superior a la de las del grupo B.

Durante la respuesta al estrés causado por quemadura, el corazón es particularmente susceptible a la hipoxia porque tiene solamente una reserva limitada de fosfatos de alta energía. Tanto la severidad como la duración de la hipoxia determinan la respuesta cardíaca a un aporte de oxígeno disminuido. La hipoxia y el estrés oxidativo inducen cambios bioquímicos y funcionales, a pesar de lo cual el corazón trata de mantener sus funciones para contrarrestar los cambios en la tensión de oxígeno¹⁶. En años recientes varios estudios han sugerido que la expresión de HSP70 puede jugar un papel importante en la protección del miocardio contra isquemia,

hipoxia, endotoxina, lesión por reperfusión y daño oxidativo. Currie et al.¹⁷ mostraron que un aumento en los niveles de una determinada HSP70, inducida por estrés calórico, se asocia con protección contra lesión por isquemia-reperfusión. Wischmeyer¹⁸ encontró que la administración de glutamina podía reducir significativamente los cambios perjudiciales en el metabolismo miocárdico y preservar el gasto cardíaco después de la re-oxygenación, gracias al aumento de la expresión de HSP70 inducida por la glutamina. El trauma por quemadura produjo un incremento en la presión ventricular izquierda y puede mejorar el desempeño ventricular¹⁹.

La isquemia y la hipoxia constituyen las causas primordiales de lesión cerebral luego de una quemadura severa. Varios estudios han demostrado que HSP70 juega un papel neuro-protector en modelos animales de lesión cerebral isquémica y traumática^{20,21}.

Además del papel bien estudiado de la HSP70 como chaperona molecular que ayuda al correcto plegado de proteínas, se han descrito otros nuevos mecanismos mediante los cuales la HSP70 puede prevenir la muerte celular^{22,23}. Ahora sabemos que la HSP70 regula la muerte celular por apoptosis, tanto en forma directa al interferir con la función de varias proteínas que inducen la muerte celular por apoptosis, como en forma indirecta al aumentar los niveles de la proteína anti apoptosis bel-2. Lee et al.²³ encontraron que los ratones knockout de HSP70 presentaban significativamente más infartos de miocardio que los ratones silvestres. Otra investigación sobre mecanismos de esta protección in vitro ha demostrado que la ketamina ejerce efectos neuroprotectores al inhibir la fosforilación del factor de transcripción c-Jun, el cual juega un papel significativo en la inhibición de la apoptosis celular y la supervivencia de las células²⁴. Según las observaciones en el presente estudio, sugerimos que la ketamina juega un papel importante en la protección miocárdica y neuronal, al aumentar la expresión de la HSP70 en ratas, luego de quemaduras severas, y por ende, aumentando la supervivencia de estas. Yu et al.²⁵ reportaron que la ketamina puede suprimir la producción y la actividad de las citoquinas pro-inflamatorias TNF-alfa, interleucina-6, factor nuclear kappaB y receptor tipo Toll 2 o 4 en los pulmones. Estos efectos se correlacionaron con una mayor supervivencia en sepsis relacionada con lesiones.

Conclusiones

La terapia con ketamina mejora la supervivencia en lesión por quemadura severa. Este efecto beneficioso posiblemente se logra a través de la producción de la respuesta al choque térmico (HSR), como lo evidencia la expresión de la proteína de choque térmico 70 en tejido miocárdico y cerebral. Se necesitan experimentos más extensos y específicos para descubrir los mecanismos moleculares exactos mediante los cuales la ketamina ejerce sus efectos. Tal conocimiento pudiera conllevar a enfoques terapéuticos que finalmente pudieran utilizarse en la práctica clínica.

Financiación

Ninguna

Conflicto de intereses

No hay conflictos de intereses que deban reportarse.

REFERENCIAS

1. Welch WJ. Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev.* 1992;72:1063-81.
2. Malhotra V, Wong HR. Interactions between the heat shock response and the nuclear factor-B signalling pathway. *Crit Care Med.* 2002;30:S89-95.
3. Westerheide SD, Morimoto RI. Heat shock response modulators as therapeutic tools for diseases of protein conformation. *J Biol Chem.* 2005;280:33097-100.
4. De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock.* 1999;11:1-12.
5. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol.* 2002;92:2177-86.
6. Hightower LE. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity. *Cell.* 1991;66:191-7.
7. Hendrick JP, Hartl FU. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:349-84.
8. Carr VM, Farbman AL. Effect of ketamine on stress protein immunoreactivities in rat olfactory mucosa. *Neuroreport.* 1993;5:197-200.
9. Renis M, DiGiacomo C, Sorrenti V, Russo A, la Delfa C, Reale S, et al. Heat shock proteins following rat cerebral ischemic/reperfusion episode: effect of ketamine. *Biochem Mol Biol Int.* 1994;33:345-54.
10. Pannen BH, Maeda K, Ayuse T, Brienza N, Revelly JP, Robotham JL, et al. Hepatic heat shock and acute-phase gene expression are induced simultaneously after celiotomy in the anesthetized pig. *Anesthesiology.* 1995;83:850-9.
11. Meyer TN, Silva AL, Vieira EC, Alves ACV. Heat shock response reduces mortality after severe experimental burns. *Burns.* 2000;26:233-8.
12. Walker HL, Mason Jr AD. A standard animal burn. *J Trauma.* 1968;8:1049-51.
13. Rapaport FT, Bachvaroff RJ, Grullon J, Kunz H, Gill TJ. Genetics of natural resistance to thermal injury. *Ann Surg.* 1982;195:294-304.
14. Nader Meyer T, Lázaro da Silva A. Ketamine reduces mortality of severely burnt rats, when compared to midazolam plus fentanyl. *Burns.* 2004;30:425-30.
15. Gurfinkel R, Czeiger D, Douvdevani A, Shapira Y, Artru AA, Sufaro Y, et al. Ketamine improves survival in burn injury followed by sepsis in rats. *Anesth Analg.* 2006;103:396-402.
16. Yagmurdur H, Aksoy M, Arslan M, Baltaci B. The effects of propofol and ketamine on gut mucosal epithelial apoptosis in rats after burn injury. *Eur J Anaesthesiol.* 2007;24:46-52.
17. Currie RW, Karmazyn M, Kloc M, Mailer K. Heat-shock response is associated with enhanced postischemic ventricular recovery. *Circ Res.* 1988;63:543-9.
18. Wischmeyer PE. Glutamine and heat shock protein expression. *Nutrition.* 2002;18:225-8.
19. White DJ, Carlson D, Ordway GA, Horton JW. Protective role of heat stress in burn trauma. *Crit Care Med.* 2004;32:1338-45.
20. Gaspary H, Graham SH, Sagar SM, Sharp FR. HSP70 heat shock protein induction following global ischemia in the rat. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995;34:327-32.
21. Tsuchiya D, Hong S, Matsumori Y, Kayama T, Swanson RA, Dillman WH, et al. Overexpression of rat heat shock protein

-
- 70 reduces neuronal injury after transient focal ischemia, transient global ischemia, or kainic acid-induced seizures. *Neurosurgery*. 2003;53:1179-87.
22. Krueger-Naug AM, Plumier JC, Hopkins DA, Currie RW. Hsp27 in the nervous system: expression in pathophysiology and in the aging brain. *Prog Mol Subcell Biol*. 2002;28:235-51.
23. Lee SH, Kwon HM, Kim YJ, Lee KM, Kim M, Yoon BW. Effects of HSP70 gene knockout on the mitochondrial apoptotic pathway after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2004;35:2195-9.
24. Wang L, Jing W, Hang YN. Glutamate-induced c-Jun expression in neuronal PC12 cells: The effects of ketamine and propofol. *J Neurosurg Anesthesiol*. 2008;20:124-30.
25. Yu M, Shao D, Yang R, Feng X, Zhu S, Xu J. Effects of ketamine on pulmonary inflammatory responses and survival in rats exposed to polymicrobial sepsis. *J Pharm Pharm Sci*. 2007;10:434-42.