

- NEDERLANDSE SAMENVATTING -

KETAMINE: EEN NIEUWE DIMENSIE VAN EEN BEKENDE STOF?

Ketamine is een anestheticum dat in de humane en veterinaire anesthesie voornamelijk wordt gebruikt voor het induceren van hypnose, pijnstilling en immobilisatie. In tegenstelling tot andere anesthetica, zoals hypnotica en inhalatie-anesthetica, geeft ketamine somatische en viscerale pijnstilling zelfs na toediening van heel lage doseringen. Daar ketamine als sympaticomimeticum het cardiovasculaire systeem stabiliseert, wordt het gebruik van ketamine wel aanbevolen voor patiënten met een verhoogd risico op cardiovasculair falen.

In het kader van de algehele anesthesie van paarden wordt ketamine veelvuldig toegepast in diverse anesthesie protocollen. Behalve voor de inductie van een algehele anesthesie, wordt ketamine ook gebruikt in combinatie met inhalatie-anesthesie, bij intraveneuze anesthesie en voor epidurale pijnstilling. De laatste jaren wordt m.n. veel onderzoek verricht naar de pijnstillende effecten van laag gedoseerde ketamine infusen toegediend aan paarden, die bij bewustzijn zijn.

Sinds halverwege de jaren '90, hebben onderzoeken bij muizen, ratten en mensen aangetoond dat ketamine niet alleen anesthetische en pijnstillende effecten heeft, maar ook ontstekingsremmende eigenschappen bevat, zoals het remmen van de productie van ontstekingmediatoren, bijvoorbeeld cytokinen en zuurstofradicalen. Het feit dat bij het paard deze ontstekingsremmende effecten van ketamine nog nooit zijn onderzocht, was voor ons aanleiding om hier onderzoek naar te verrichten. Dit proefschrift geeft een overzicht van de verschillende in vitro en in vivo experimenten die zijn uitgevoerd om de ontstekingsremmende effecten van ketamine bij het paard te onderzoeken.

HET EFFECT VAN KETAMINE OP DE PRODUCTIE VAN CYTOKINEN IN EEN PAARDEN-MACROFAGEN-CELLIJN

Om de ontstekingsremmende eigenschappen van ketamine bij het paard in vitro te kunnen bestuderen is gebruikt gemaakt van een paarden-macrofagen-cel lijn, ook wel e-CAS cel lijn genoemd. Hoewel primaire cellen, zoals monocyten, macrofagen, vaatwand- en kraakbeencellen eenvoudig uit een paard kunnen worden geïsoleerd en veelvuldig zijn gebruikt voor het bestuderen van de ontstekingsremmende effecten van diverse farmaca is, voor de in vitro onderzoeken beschreven in dit proefschrift, toch gekozen voor het gebruik van een cel lijn, omdat het reactiepatroon in een cel lijn over het algemeen veel uniformer verloopt.

Experimenten voorafgaand aan dit ketamine-onderzoek hebben de karakteristieken van de e-CAS cel lijn reeds duidelijk in kaart gebracht. Vooral de intracellulaire signaal transductie paden zijn in deze cel lijn al intensief bestudeerd.

Daar de e-CAS cellijn echter een tamelijk nieuwe cellijn is, is besloten om de meeste in vitro experimenten niet alleen in de e-CAS cellijn uit te voeren, maar ook in bekende macrofagen-cellijnen afkomstig van mensen (U937) en muizen (RAW 264.7). De resultaten van deze cellijnen versterken op deze manier de resultaten verkregen met de e-CAS cellijn.

Om een ontstekingsreactie op te wekken is in alle experimenten gebruik gemaakt van LPS (lipopolysacchariden). LPS is een gifstof afkomstig van de buitenste celwand van Gram-negatieve bacteriën en speelt een belangrijke rol in het ontstaan van ontstekingsreacties bij diverse diersoorten waaronder het paard. Stimulatie van macrofagen met LPS leidt tot de productie van ontstekingsmediatoren, zoals cytokinen, acute fase eiwitten en prostanoïden, die alle gebruikt kunnen worden voor de vroege detectie van een ontsteking. Van de cytokinen, die worden gevormd, zijn TNF- α (tumor necrosis factor alpha) en IL-6 (interleukine 6) het meest bestudeerd. TNF- α is de eerste cytokine, die wordt gevormd in met LPS gestimuleerde cellen, terwijl IL-6 voornamelijk een prognostische waarde lijkt te hebben. Op basis van deze feiten zijn voor het bestuderen van de invloed van ketamine op de cytokinenproductie bij het paard zowel TNF- α als IL-6 gekozen.

De ketamine concentraties in de in vitro experimenten variëren tussen de 0-36 μ M. Deze concentraties zijn gebaseerd op de plasma ketamine spiegel van 5 μ g/ml (18 μ M), die wordt bereikt na de intraveneuze toediening van de voor het paard gebruikelijke inductie dosis van 2,2 mg/kg lichaamsgewicht. Om de minimaal effectieve ketamine concentratie te achterhalen, waarbij nog steeds een ontstekingsremmend effect kan worden waargenomen, zijn ook concentraties lager dan 18 μ M getest. Deze lagere ketamine concentraties kunnen in klinisch opzicht vooral bij bewustzijn zijnde paarden van grote waarde zijn, omdat met behulp van deze lagere concentraties de met ketamine gepaard gaande ongewenste neveneffecten, zoals hypnose en excitatie, vrijwel niet voorkomen. Wanneer na toediening van deze relatief lage ketamineconcentraties geen enkel effect werd waargenomen, werden ketamineconcentraties tot 1000 μ M getest om te kijken of ketamine überhaupt enig effect zou hebben op de betreffende ontstekingsmediator.

In hoofdstuk 3 is het eerste in vitro experiment aangaande de ontstekingsremmende effecten van ketamine bij het paard beschreven. De resultaten van dit onderzoek tonen aan, dat ketamine op een concentratieafhankelijke manier de productie van TNF- α en IL-6 in LPS gestimuleerde e-CAS cellen remt. Deze resultaten waren voor ons aanleiding een onderzoek op te zetten naar de moleculaire mechanismen, die hieraan ten grondslag liggen.

MOLECULAIRE MECHANISMEN ACHTER DE CYTOKINEN-MODULERENDE EFFECTEN VAN KETAMINE

Na stimulatie met LPS wordt de productie van cytokinen in een cel gereguleerd door vele intracellulaire signaal transductie paden. Binding van LPS aan de, op de buitenkant van een cel gelegen, TLR4 (Toll-like receptor 4) receptor initieert de activatie van deze complexe intracellulaire cascade. In deze cascade spelen twee paden een belangrijke rol, nl. het MAPK (mitogen-activated protein kinase) pad en het NF- κ B (nuclear factor kappa B) pad. Het MAPK pad bestaat uit drie afzonderlijk paden, het JNK (c-Jun N-terminal kinase), p38 (MAPK p38) en het ERK (extracellulair signal-regulated kinase) pad. Deze MAPKs bevinden zich in het cytoplasma van een cel en verplaatsen zich na activatie naar de kern waar ze op hun beurt weer een groot aantal transcriptie factoren zoals AP-1 (activating protein 1), Elk-1, c-Fos, c-Jun en NF- κ B activeren.

NF- κ B wordt gezien als een van de hoofdtranscriptie factoren in een cel. NF- κ B bestaat uit een groep van eiwitten, die paren van diverse samenstelling vormen. Het meest bekende eiwitpaar binnen de NBF- κ B groep is het p50/p65 paar. NF- κ B speelt een prominente rol in de regulatie van diverse celfuncties. Na binding aan DNA reguleert NF- κ B de transcriptie van meer dan 200 genen, waaronder die van ontstekingsmediatoren. Onder normale omstandigheden bevindt NF- κ B zich in een inactieve vorm in het cytoplasma van de cel. NF- κ B is inactief, doordat het in het cytoplasma gebonden is aan I κ B (inhibitor of kappa B). Door stimulatie met LPS wordt in het cytoplasma het IKK (I κ B kinase) complex geactiveerd. Geactiveerd IKK zorgt voor de phosphorylatie en degradatie van I κ B waardoor NF- κ B vrij komt. De vrije vorm van NF- κ B verplaatst zich vervolgens naar de kern waar de eerder beschreven transcriptie van genen plaatsvindt.

Ketamine remt de productie van de cytokinen TNF- α en IL-6 in e-CAS cellen. De vraag is nu: via welke mechanismen remt ketamine de cytokinen productie in e-CAS cellen? Remt ketamine de productie van cytokinen door beïnvloeding van factoren buiten de cel, in de cel of in de kern? Of zelfs een combinatie daarvan? Om deze vragen te beantwoorden hebben we het effect van ketamine op de LPS gestimuleerde expressie van TLR4 (buiten de cel), MAPK, I κ B (in de cel) en NF- κ B (in de kern) in e-CAS cellen onderzocht (hoofdstuk 4). De resultaten tonen aan, dat ketamine de LPS gestimuleerde intracellulaire signaal paden alleen remt op het niveau van NF- κ B. Activatie van NF- κ B kan grofweg in 2 fasen worden verdeeld: de eerste fase bestaat uit het loskomen van I κ B, de tweede fase uit het transport

van NF- κ B naar de kern, een verdere activatie van NF- κ B in de kern en de binding aan DNA. Met behulp van Western blots hebben we aangetoond dat ketamine geen invloed heeft op de expressie van I κ B in e-CAS cellen. Dit in tegenstelling tot resultaten gevonden bij muizen en ratten waar ketamine wel de expressie van I κ B leek te beïnvloeden. Het feit dat ketamine in e-CAS cellen geen invloed heeft op de expressie van I κ B, suggereert dat ketamine de expressie van NF- κ B remt door de tweede fase van de NF- κ B activatie te beïnvloeden. Deze bevinding wordt versterkt door het feit dat ketamine ook in staat was de expressie van NF- κ B te remmen wanneer het rechtstreeks aan het nucleair extract werd toegevoegd. Tot op heden is dit het enige artikel dat de door ketamine verminderde expressie van NF- κ B wijdt aan een directe interactie tussen ketamine en NF- κ B.

HET EFFECT VAN KETAMINE OP LPS GESTIMULEERDE ENZYM EXPRESSIE

NF- κ B is betrokken bij de transcriptie en expressie van legio mediators, waaronder cytokinen. Naast cytokinen reguleert NF- κ B ook de expressie van enzymen, zoals COX-2 (cyclooxygenase 2) en iNOS (inducible nitric oxide synthase). Onder normale omstandigheden zijn COX-2 en iNOS niet of nauwelijks in een cel aanwezig, maar na stimulatie door LPS neemt in een cel de productie van deze enzymen toe. COX-2 en iNOS produceren op hun beurt, respectievelijk PGE₂ (prostaglandine E₂) en NO (nitric oxide), ontstekingsmediators, die een belangrijke rol spelen bij de klinische symptomen van een ontsteking. Het feit dat ketamine de expressie van NF- κ B kan remmen, suggereert dat ketamine ook de expressie van deze enzymen en daarmee de productie van hun bijbehorende ontstekingsmediators kan remmen.

De resultaten van hoofdstuk 6 geven echter aan dat ketamine niet in staat is de expressie van COX-2 in LPS gestimuleerde e-CAS cellen te remmen, zelfs niet na blootstelling aan hoge ketamine concentraties tot 1000 μ M. Daar NF- κ B door vele onderzoekers wordt gezien als een van de belangrijkste transcriptie factoren van een cel en ketamine heeft aangetoond de expressie van NF- κ B te verminderen, was het resultaat van dit onderzoek toch enigszins onverwacht. Om dit onverwachte resultaat te kunnen verklaren, hebben we de aanname dat de expressie van COX-2 in e-CAS cellen door NF- κ B wordt gereguleerd verlaten en de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen aan de expressie van COX-2 in e-CAS cellen verder onderzocht. Remming van zowel MAPK als NF- κ B gaf aan, dat de expressie van COX-2 en de productie van PGE₂ in LPS gestimuleerde e-CAS cellen alleen via de drie MAPK paden wordt gereguleerd en niet via het NF- κ B pad. Gezien het feit

dat ketamine niet de expressie van de MAPKs kan verminderen, maar alleen die van NF- κ B verklaart nu waarom ketamine niet in staat bleek de expressie van COX-2 en de daarbij behorende productie van PGE₂ in e-CAS cellen te remmen. Net als bij COX-2 remt ketamine ook niet de expressie van iNOS en daarbij behorende productie van NO in LPS gestimuleerde e-CAS cellen (hoofdstuk 5). Remming van zowel de MAPK paden als het NF- κ B pad gaf echter aan, dat de expressie van iNOS en de productie van NO via beide paden verloopt. Dit suggereert, dat de MAPKs een grotere rol spelen dan NF- κ B bij de regulatie van de iNOS expressie dan tot nu toe werd aangenomen. Sterker nog de remmings-experimenten geven zelfs aan, dat de MAPKs de expressie van NF- κ B onafhankelijk van NF- κ B kunnen reguleren.

ANTI-OXIDATIEVE EIGENSCHAPPEN VAN KETAMINE

Behalve door LPS kan NF- κ B ook door zuurstofradicalen worden geactiveerd. Dit suggereert, dat het remmen van de productie van zuurstofradicalen automatisch resulteert in een verminderde expressie en activatie van NF- κ B en daarmee in een verminderde productie van cytokinen. Ketamine kan zowel de productie van zuurstofradicalen (hoofdstuk 7), als de expressie van NF- κ B (hoofdstuk 4) en de productie van cytokinen (hoofdstuk 3) in LPS gestimuleerde e-CAS cellen remmen. Ondanks het feit, dat er niets bekend is over de link tussen de productie van zuurstofradicalen in e-CAS cellen enerzijds en de expressie van NF- κ B in e-CAS cellen anderzijds, lijkt het heel onwaarschijnlijk, dat de verminderde productie van zuurstofradicalen in deze cellen wordt veroorzaakt door een verminderde expressie van NF- κ B. Ten eerste hebben de resultaten uitgewezen, dat LPS alleen wel in staat is de expressie van NF- κ B te activeren, maar niet om de productie van zuurstofradicalen te stimuleren. Dit laatste was alleen mogelijk wanneer LPS in combinatie met een tweede activator, te weten PMA (phorbol myristate acetate), werd gebruikt. Ten tweede werd de expressie van NF- κ B nooit voorafgegaan door een verhoogde productie van zuurstofradicalen. Sterker nog, de expressie van NF- κ B in LPS gestimuleerde e-CAS cellen was al significant op 15 minuten na de stimulatie met LPS, terwijl de productie van zuurstofradicalen pas 2 uur na de stimulatie met LPS en PMA significant werd. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de door ketamine verminderde expressie van NF- κ B in LPS gestimuleerde e-CAS cellen onafhankelijk is van de productie van zuurstofradicalen.

LANGDURIGE KETAMINE TOEDIENING EN DE NIET-ANESTHETISCHE EFFECTEN VAN KETAMINE IN VIVO

Het gegeven dat ketamine de productie van TNF- α en IL-6 in LPS gestimuleerde e-CAS cellen remt, suggereert, dat ketamine ook de cytokinenproductie in vivo zou kunnen remmen. De concentratie-afhankelijke remming in vitro en het feit dat verhoogde plasmaspiegels van cytokinen zijn gemeten gedurende een aantal uren na het ontstaan van een ontsteking, doet vermoeden, dat ketamine gedurende lange tijd en in relatief hoge doseringen moet worden toegediend om klinisch een ontstekingsremmend effect te kunnen bereiken. Tijdens een algehele anesthesie kunnen relatief hoge doseringen worden toegediend. In de intensive care, wanneer ketamine aan bij bewustzijn zijnde paarden moet worden toegediend, is de ketamine dosering beperkt door de mogelijk optredende ongewenste effecten, zoals liggen en excitatie. De resultaten van hoofdstuk 8 geven aan dat een ketamine infuus van 1,5 mg/kg/uur gedurende tenminste 6 uur veilig aan gezonde en bij bewustzijn zijnde paarden kan worden toegediend. Het farmacokinetische profiel van dit infuus verschilde weinig van de eerder gevonden farmacokinetische waarden behorende bij een eenmalige intraveneuze injectie van ketamine. De bij patiënten aanwezige pathologische veranderingen kunnen echter leiden tot een verandering van het farmacokinetisch profiel. Dit kan betekenen, dat bij deze patiënten ketamine vertraagd wordt afgevoerd met als gevolg verhoogde plasmaspiegels en de daarbij optredende ongewenste effecten. Daarnaast zou toediening van een ketamine infuus gedurende meer dan 6 uur eveneens kunnen leiden tot het optreden van deze ongewenste effecten, omdat bij de infuus-experimenten beschreven in dit proefschrift (hoofdstuk 7 en 8) op 6 uur na infusie van ketamine nog steeds geen steady-state in plasmaspiegels was bereikt.

Ketamine wordt in de lever gemetaboliseerd door het cytochrome P₄₅₀ enzymstelsel. Demethylatie van ketamine produceert de eerste metaboliet, norketamine, dat op zijn beurt wordt gehydroxyleerd en geoxideerd tot de metabolieten hydroxynorketamine en 5,6-dehydronorketamine. In de twee in vivo experimenten van dit proefschrift zijn deze metabolieten bepaald met behulp van de combinatie vloeistofchromatografie en tandem massa spectrometrie, een relatief nieuwe techniek die veel nauwkeuriger lijkt te zijn dan de oude techniek bestaande uit de combinatie gas-vloeistof chromatografie en massa spectrometrie.

Om de ontstekingsremmende effecten van ketamine in vivo te kunnen bestuderen is gebruik gemaakt van het weefselkamermodel. Een voordeel van dit model is, dat

de door LPS geïnduceerde ontstekingsresponse beperkt blijft tot de weefselkamer en dat op deze manier niet het algeheel welbevinden van het te onderzoeken dier wordt beïnvloed. Zoals verwacht werd de door LPS geïnduceerde ontstekingsreactie in de weefselkamer gekenmerkt door een infiltratie van witte bloedcellen en een verhoogde concentratie van ontstekingsmediatoren. Onderzoek van weefselkamervloeistof wees echter uit, dat ketamine niet in staat bleek de door LPS gestimuleerde productie van TNF- α , IL-6 en PGE₂ te remmen. Dit resultaat is zeer waarschijnlijk het gevolg van het feit, dat te lage ketamine concentraties in de weefselkamervloeistof werden bereikt. Zowel na een enkelvoudige bolus injectie als na een continu infuus gedurende 6 uur kwam slechts een fractie van de in het lichaam aanwezige ketamine in de weefselkamer. Dit wordt toegeschreven aan de snelle eliminatie halfwaardetijd van ketamine uit het lichaam ($t_{1/2\beta}$ = 65-67 min) in combinatie met de beperkte diffusie van ketamine vanuit het lichaam naar de weefselkamer. Bovendien lijkt ketamine, wanneer het zich eenmaal in de weefselkamer bevindt, zeer makkelijk daaruit te diffunderen, omdat het een zwakke base met een lage eiwitbinding is. In vitro werd een significant verminderde cytokineconcentratie gemeten vanaf een ketamineconcentratie van 1,8 μ M. In de weefselkamervloeistof bedroeg de hoogste ketamine concentratie slechts 0,5 μ M. Deze beduidend lagere ketamine concentratie in vivo is daarmee mogelijk een verklaring voor het achterwege blijven van een ontstekingsremmend effect in vivo.

Tijdens de ketamine infusen is geen verschil in ketamine en/of norketamine plasmaspiegels gemeten tussen paarden (hoofdstuk 8) en ponies (hoofdstuk 9), terwijl de hydroxynorketamine en 5,6-dehydroketamine spiegels bij ponies veel hoger was dan bij paarden. Dit verschil is mogelijk toe te schrijven aan een verschil in biotransformatie tussen rassen.

KLINISCHE RELEVANTIE VAN EEN KETAMINE INFUUS AAN PAARDEN MET EEN INFECTIEUZE AANDOENING

De bevinding dat ketamine de productie van TNF- α , IL-6 en zuurstofradicalen in e-CAS cellen significant remt, suggereert dat het gebruik van ketamine van waarde zou kunnen zijn voor paarden met een infectieuze aandoening. Echter, de snelle afbraak en eliminatie van ketamine, de lage eiwitbinding en derhalve de matige ophoping van ketamine in ontstoken weefsel, geven aan dat ketamine mogelijk niet het juiste farmacokinetisch profiel heeft om een ontstekingsreactie bij dergelijk paarden te onderdrukken. Toch zijn de resultaten van de in vitro studies

zodanig, dat verder onderzoek naar de ontstekingsremmende effecten van ketamine tijdens een anesthesie procedure of in de intensive care gerechtvaardigd is.

CONCLUSIES

Op grond van de resultaten verkregen met de experimenten beschreven in dit proefschrift kan het volgende worden geconcludeerd:

- ketamine remt de door LPS geïnduceerde TNF- α en IL-6 productie in e-CAS cellen op een concentratie-afhankelijke wijze
- ketamine remt de door LPS geïnduceerde intracellulaire signaal transductie paden enkel en alleen op het niveau van NF- κ B
- ketamine remt de expressie van NF- κ B middels een directe interactie met NF- κ B
- ketamine remt niet de door MAPK en NF- κ B gemedieerde iNOS expressie en NO productie in LPS gestimuleerde e-CAS cellen
- expressie van COX-2 wordt voornamelijk gereguleerd via de drie MAPK paden.
- ketamine remt niet de door MAPK gemedieerde COX-2 expressie en PGE₂ productie, wat suggereert, dat de analgetische effecten van ketamine worden gemedieerd op een COX-2 onafhankelijk manier
- ketamine remt de productie van zuurstofradicalen in e-CAS cellen
- ketamine verhoogt de intracellulaire glutathion concentratie, maar induceert op zichzelf geen glutathion synthese
- een ketamine infuus van 1,5 mg/kg/uur kan gedurende tenminste 6 uur veilig worden toegediend aan gezonde, wakkere paarden
- ketamine wordt snel gemetaboliseerd tot zijn metaboliëten norketamine, hydroxynorketamine en 5,6-dehydronorketamine
- ketamine heeft geen ontstekingsremmende eigenschappen in met LPS geïnfecteerde weefselkamers in Shetland ponies

