Anesthetics and glutamate co-transporters in the central nervous system

Daisy T. Joo MD, Beverley A. Orser MD PhD FRCPC

FEW treatments exist that alter the outcome of patients suffering from ischemic-hypoxic brain injury. Despite intense efforts to develop drugs that combat the cascade of events leading to neuronal death, an effective drug therapy is not yet available for clinical use. General anesthetics have a time proven record of safety and a variety of *in vivo* and *in vitro* experiments suggest that anesthetics have a potential role as neuroprotectants.¹⁻⁴ However, the mechanisms by which anesthetics reduce the susceptibility of neurons to hypoxic-ischemic insult and conditions that optimize their protective properties are not well understood. The influence of anesthetics on inflammatory mediators, glia and the vasculature following brain injury also remains to be determined.

Classically, the neuroprotective properties of anesthetics were attributed to a reduction in global oxygen consumption (CMRO₂), and cerebral blood flow (CBF).⁵ More recent evidence indicates that neuronal death results primarily from toxic concentrations of glutamate present in the extracellular space, as well as metabolic imbalances leading to apoptosis (or delayed cell death). Consequently, factors that regulate glutamate homeostasis are the subject of intense investigation. Anesthetics are known to modulate the release⁶ and re-uptake of neurotransmitters including glutamate, and it has been proposed that these actions contribute to their ability to reduce neuronal loss following hypoxic injury. In this issue of the Journal, Sakai and Amaha present new evidence indicating that midazolam and ketamine, but not propofol or barbiturates, alter the function of a glutamate co-transporter present in glial cells. The authors are to be commended for questioning the role of glutamate carriers in mediating anesthetic neuroprotection. However, for the reasons discussed below their interesting findings cannot readily be extrapolated to the

clinical scenario. Nevertheless, their data suggest a novel mechanism by which anesthetics protect the brain that is worthy of further study.

Glutamate, the major excitatory amino acid in the central nervous system, activates excitatory neurotransmission by acting on *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors. Normally, the concentration of glutamate in the synaptic cleft is highly regulated. However, under ischemic conditions, the concentration of glutamate increases to toxic levels.⁷ The main cause of the high extracellular glutamate is dysfunction of glutamate transporters rather than an enhanced release of glutamate from the synaptic terminals.⁸ During an ischemic event, the transporters are thought to operate in reverse depositing glutamate into the extracellular space rather than removing it. Glutamate activates ligand-gated ion channels that permit the influx of Ca²⁺ ions and the resulting increase in intracellular Ca²⁺ stimulates a cascade of biochemical events that ultimately lead to cell death.⁹ Also, the rise in intracellular Ca²⁺ causes the further release of glutamate from neurons through Ca²⁺-dependent exocytosis.¹⁰

A total of five mammalian isoforms of glutamate transporters, EAAC1, (EAAT3), GLT1 (EAAT2), GLAST (EAAT1), EAAT4, and EAAT5 have been identified.¹¹ These Na⁺-dependent, electrogenic, transporters couple the movement of one glutamate, one proton, and two or three Na⁺ ions into the cell with the movement of one K⁺ ion out of the cell.¹² Glutamate transport is driven by the pH and electrochemical gradient. Hence, membrane depolarization and lowering the intracellular concentration of K⁺ or the extracellular concentration of Na⁺ reduces glutamate uptake. When the electrochemical gradient is severely disrupted during ischemia and hypoxia, the transporter operates in reverse, depositing glutamate

Address correspondence to: Dr. Beverley A. Orser, Department of Anesthesia, Sunnybrook and Women's College Health Sciences Centre, Toronto, Ontario, M4N 3M5. Phone: 416-978-0574 or -1518; Fax: 416-978-4940; E-mail: beverley.orser@utoronto.ca

into the extracellular space. The release of glutamate is thought to be due, primarily, to the reverse operation of glutamate transporters found in neurons, particularly of the EAAC1/EAAT3 subtype.⁸

The glutamate transporter type 1 (GLT-1/EAAT2) is also of interest as it is most abundant and is found in glia.¹¹ Glial cells are the major non-neuronal component of the brain that serve a variety of functions. They surround glutamatergic synapses and contain highly efficient transporters that are responsible for the majority of glutamate reuptake.¹² In support of the importance of normal GLT-1 function in preventing neuronal injury, mice lacking GLT-1 seize spontaneously and are more susceptible to cortical injury.¹³ Moreover, antisense knockdown of GLAST/EAAT1, another glial glutamate transporter and GLT-1, increased extracellular glutamate and enhanced excitotoxicity. Important to this discussion, the function of GLT-1 transporters under ischemic conditions is controversial as it is not known if this transporter operates in reverse to increase the extracellular concentration of glutamate. Immunocytochemistry studies suggest that glutamate is released from *neurons rather than glia*, possibly because the higher concentration of glutamate in neurons facilitates reverse operation of the transporter.^{8,14}

In this issue of the Journal, Sakai and Amaha investigate the effects of intravenous anesthetics on the function of a subtype of glutamate transporter present in human glia (hGLT-1). Electrophysiological techniques were used to study the effects of midazolam, ketamine, thiopental, and propofol on recombinant hGLT-1 protein expressed in hamster ovary cells. Recording conditions were designed to mimic hypoxic and ischemic events. Increasing the extracellular concentration of K⁺ activated an outward current, which was presumed to result from reverse operation of the transporter. This K⁺-evoked current was used to assess transporter function, in the absence and presence of the drugs. It was shown that ketamine and midazolam (at high concentrations of 100 μ M and > 3 μ M, respectively) but not propofol or thiopental inhibited the function of the hGLT-1 glutamate transporter. Unfortunately antagonists specific for glutamate transporters¹⁵ were not used to confirm that the K⁺-evoked current, recorded in the presence of ketamine and midazolam, resulted from the activity of hGLT-1 alone. Also, the effects of benzodiazepines on the EAAC1/EAAT3 glutamate transporter depend on the drug concentration;¹⁶ lower concentrations (μ M range) enhanced, whereas, higher concentrations (mM range) inhibited transporter function and a wide range of drug concentrations was not investigated.

How do we interpret these results from a clinical perspective? Most importantly, the therapeutic potential of glutamate transporter antagonists critically depends on the direction of operation of the transporter under ischemic-hypoxic conditions. Accordingly, if the hGLT-1 transporter fails to reverse function and continues to remove glutamate from the extracellular space, then inhibition of the transporter by ketamine and midazolam could be deleterious. This possibility has not been examined in the context of laboratory or clinical models of neurologic/histologic outcome from cerebral ischemic insults. Thus, an extrapolation of the *in vitro* data to *in vivo* scenarios is premature. Based on a literature review, each of the anesthetics examined by Sakai and Amaha has been shown to provide potent protection against ischemic insults, *in vitro*. However, there is insufficient information that would allow one to speculate that the neuroprotective efficacy was associated with changes in hGLT-1 transporter function. Nevertheless, the focus of this mechanistic question may lead to future studies which are relevant to the anesthetized patient because excitotoxic initiation of cell death cascades is thought to predominantly occur during the first few minutes of ischemia/reperfusion (such as might occur in the operating room).

In conclusion, the study by Sakai and Amaha demonstrate that hGLT-1 is inhibited by midazolam and ketamine. Such *in vitro* investigations are absolutely essential to exploring the potential protective properties of anesthetic agents. However, the findings must be correlated with *in vivo* studies that best replicate the clinical scenario. The findings of Sakai and Amaha provide one more piece in the puzzle that continues to perplex anesthesiologists, that being the clinical utility of anesthetics as perioperative neuroprotectants.

Acknowledgements

The Heart and Stroke Foundation of Canada support BAO's research and Canadian Institute of Health Research. The authors express thanks to Drs. Rona Giffard and David Warner for reviewing the manuscript.

Anesthésiques et co-transporteurs de glutamate dans le système nerveux central

Il existe peu de traitements pour améliorer l'état des patients atteints de lésions cérébrales ischémiques-hypoxiques. Malgré des essais intensifs pour mettre au point des médicaments pouvant briser la chaîne de réactions qui conduisent à la mort neuronale, aucune thérapie médicamenteuse n'est encore disponible en clinique. La preuve par le temps a été faite de la sécurité des anesthésiques généraux et une diversité d'expériences *in vivo* et *in vitro* laissent croire à un rôle neuroprotecteur potentiel des anesthésiques.¹⁻⁴ Cependant, on ne connaît pas très bien les mécanismes par lesquels les anesthésiques réduisent la susceptibilité des neurones aux lésions hypoxiques-ischémiques ni les conditions optimales de leurs propriétés protectrices. On ne connaît pas non plus l'influence des anesthésiques sur les médiateurs de l'inflammation, la névrologie et le système vasculaire à la suite d'une lésion cérébrale.

On attribue habituellement aux propriétés neuroprotectrices des anesthésiques une réduction de la consommation globale d'oxygène ($CMRO_2$) et une baisse du débit sanguin cérébral (DSC).⁵ Des données récentes indiquent que la mort neuronale serait principalement le résultat de concentrations toxiques de glutamate présentes dans l'espace extracellulaire, aussi bien que de troubles métaboliques qui conduisent à l'apoptose, ou mort cellulaire différée. En conséquence, les facteurs de régulation de l'homéostasie glutamique font l'objet d'intenses recherches. On sait que les anesthésiques peuvent moduler la libération⁶ et la réabsorption des neurotransmetteurs, y compris le glutamate. On a suggéré que ces actions faisaient partie de leur capacité à réduire la perte neuronale qui suit la lésion hypoxique. Dans le présent numéro du Journal, Sakai et Amaha présentent des nouvelles données qui indiquent que le midazolam et la kétamine, mais non le propofol ou les barbituriques, modifient la fonction d'un co-transporteur de glutamate présent dans les cellules gliales. On peut féliciter les auteurs d'avoir remis en question le rôle des porteurs de glutamate dans la neuroprotection à médiation anesthésique. Toutefois, pour des raisons présentées plus loin, leurs intéressantes

découvertes ne peuvent être facilement extrapolées à une situation clinique. Néanmoins, leurs données proposent un mécanisme par lequel les anesthésiques protègent le cerveau, ce qui mériterait des recherches supplémentaires.

Le glutamate, principal aminoacide excitant du système nerveux central, active la neurotransmission excitatrice en agissant sur les récepteurs N-méthyl-D-aspartate (NMDA) et non-NMDA. Normalement, la concentration de glutamate est fortement réglée dans la fente synaptique. Mais, pendant l'ischémie, elle augmente jusqu'à des niveaux toxiques.⁷ La principale cause de la concentration de glutamate extracellulaire élevée relève du dérèglement des transporteurs de glutamate plutôt que d'une libération accrue de glutamate à partir des terminaisons synaptiques.⁸ Pendant un incident ischémique, on suppose que les transporteurs ont une action inverse et déposent le glutamate dans l'espace extracellulaire au lieu de l'en retirer. Le glutamate active les canaux ioniques contrôlés par interaction ligand-récepteur qui permettent le flux calcique entrant d'ions de Ca^{2+} et l'augmentation résultante de Ca^{2+} intracellulaire stimule une cascade de réactions biochimiques qui mènent finalement à la mort cellulaire.⁹ De plus, l'élévation du Ca^{2+} intracellulaire provoque la libération ultérieure de glutamate provenant des neurones et passant par l'exocytose Ca^{2+} dépendante.¹⁰

On a identifié cinq isoformes mammaliens de transporteurs de glutamate, EAAC1, (EAAT3), TGL1 (TEAA2), TGLAS (TEAA1), TEAA4 et TEAA5.¹¹ Ces transporteurs électrogéniques Na^+ dépendants associent le mouvement d'un glutamate, d'un proton et de deux ou trois ions Na^+ dans la cellule au mouvement d'un ion K^+ extérieur à la cellule.¹² Le transport du glutamate dépend du pH et du gradient électrochimique. De là, la dépolarisation de la membrane et la baisse de la concentration intracellulaire de K^+ , ou de la concentration extracellulaire de Na^+ , réduisent l'absorption de glutamate. Quand le gradient électrochimique est sévèrement perturbé pendant l'ischémie et l'hypoxie, le transporteur agit à l'inverse et dépose le glutamate dans l'espace extracellulaire. On croit que la libération de glutamate est causée surtout par l'action inversée des transporteurs de glutamate des neurones, en particulier le sous-type EAAC1/TEAA3.⁸

Le transporteur de glutamate de type 1 (TGL1/TEAA2) est également intéressant, puisqu'il est plus abondant et qu'on le trouve dans le tissu glial.¹¹ Les cellules gliales représentent la composante non neuronale majeure du cerveau et remplissent des fonc-

tions variées. Elles entourent les synapses glutamatergiques et contiennent des transporteurs hautement efficaces qui sont responsables de la majorité de l'absorption du glutamate.¹² L'importance de la fonction normale du TGL-1 dans la prévention des lésions neuronales est confirmée par la présence, chez les souris atteinte d'une carence de TGL-1, de crises d'épilepsie spontanées et d'une plus grande susceptibilité aux lésions corticales.¹³ De plus, le renversement choc du TGLAS/TEAA1, un autre glutamate glial et du TGL-1, augmente le glutamate extracellulaire et renforce l'excitotoxicité. Il faut souligner que la fonction des transporteurs de TGL-1 est controversée en cas d'ischémie, car on ne sait pas si le transporteur agit à l'inverse en augmentant la concentration de glutamate extracellulaire. Les études d'immunocytochimie suggèrent que le glutamate est libéré à partir des neurones plutôt que de la névroglie, probablement parce que la forte concentration de glutamate dans les neurones facilite l'action inversée du transporteur.^{8,14}

Sakai et Amaha ont examiné les effets des anesthésiques intraveineux sur la fonction du sous-type de transporteur de glutamate présent dans la névroglie humaine (TGLh-1). Des techniques électrophysiologiques ont été utilisées pour étudier les effets du midazolam, de la kétamine, du thiopental et du propofol sur la protéine recombinante TGLh-1 exprimée dans des cellules ovariennes de hamster. Les conditions de l'expérience simulaient des incidents hypoxiques et ischémiques. L'augmentation de la concentration extracellulaire de K^+ a activé un courant sortant, lequel a été attribué à l'action inversée du transporteur. Ce courant suscité par le K^+ a été utilisé pour évaluer la fonction du transporteur, avec ou sans médicaments. On a démontré que la kétamine et le midazolam (selon de fortes concentrations de 100 μM et $> 3 \mu M$, respectivement) mais non le propofol ou le thiopental ont inhibé la fonction du transporteur de glutamate TGLh-1. Malheureusement, des antagonistes spécifiques aux transporteurs de glutamate¹⁵ n'ont pas été utilisés pour confirmer que le courant suscité par le K^+ , enregistré en présence de kétamine et de midazolam, résultait de l'activité unique du TGLh-1. De plus, les effets des benzodiazépines sur le transporteur de glutamate EAAC1/TEAA3 dépendent de la concentration médicamenteuse;¹⁶ de basses concentrations ont accru la fonction du transporteur tandis que de fortes concentrations l'ont inhibée, mais on n'a pas fait d'essais avec un large éventail de concentrations médicamenteuses.

Comment peut-on interpréter ces résultats d'un point de vue clinique ? En priorité, c'est que le potentiel thérapeutique des antagonistes du transporteur de

glutamate dépend de façon significative de la direction de l'action du transporteur dans des conditions d'ischémie-hypoxie. Par conséquent, si le transporteur TGLh-1 ne peut agir à l'inverse et continue de retirer du glutamate de l'espace extracellulaire, alors l'inhibition du transporteur par la kétamine et le midazolam peut être néfaste. Cette possibilité n'a pas été examinée en laboratoire ou en clinique avec des modèles d'évolution neurologique/histologique de lésions ischémiques cérébrales. Ainsi, une extrapolation de données in vitro à des scénarios in vivo est impossible. Sakai et Amaha ont montré, en s'appuyant sur une revue de la documentation, que chacun des anesthésiques examinés assurait une protection efficace contre les lésions ischémiques. Cependant, les informations incomplètes ne permettent pas de supposer que l'efficacité neuroprotectrice était associée aux changements de fonction du transporteur TGLh-1. Néanmoins, l'accent mis sur cette question mécaniste peut mener à d'autres études applicables au patient anesthésié parce que la cascade d'événements qui conduisent à la mort cellulaire débute surtout pendant les premières minutes de l'ischémie/reperfusion (comme cela peut se produire dans la salle d'opération).

En conclusion, l'étude de Sakai et Amaha démontre que le TGLh-1 est inhibé par le midazolam et la kétamine. Des recherches semblables in vitro sont absolument essentielles pour explorer les propriétés protectrices possibles des anesthésiques. Les résultats doivent toutefois être mis en corrélation avec des études in vivo qui reproduisent au mieux le scénario clinique. Les constatations de Sakai et Amaha fournissent une pièce de plus au casse-tête qui laisse les anesthésiologistes dans le doute au sujet de l'utilité clinique des anesthésiques comme neuroprotecteurs périopératoires.

References

- 1 Arcadi FA, Rapisarda A, De Luca R, Trimarchi GR, Costa G. Effect of 2,6-diisopropylphenol on the delayed hippocampal cell loss following transient forebrain ischemia in the gerbil. *Life Sci* 1996; 58: 961-70.
- 2 Cervantes M, Ruelas R, Chavez-Carrillo I, Contreras-Gomez A, Antonio-Ocampo A. Effects of propofol on alterations of multineuronal activity of limbic and mesencephalic structures and neurological deficit elicited by acute global cerebral ischemia. *Arch Med Res* 1995; 26: 385-95.
- 3 Nakashima K, Todd MM. Effects of hypothermia, pentobarbital, and isoflurane on postdepolarization amino acid release during complete global cerebral ischemia. *Anesthesiology* 1996; 85: 161-8.
- 4 Ito H, Watanabe Y, Isshiki A, Uchino H. Neuroprotective properties of propofol and midazo-

- lam, but not pentobarbital, on neuronal damage induced by forebrain ischemia, based on the GABAA receptors. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43: 153–62.
- 5 *Artru AA, Steen PA, Michenfelder JD*. Gamma-Hydroxybutyrate: cerebral metabolic, vascular, and protective effects. *J Neurochem* 1980; 35: 1114–9.
 - 6 *Ratnakumari L, Vysotskaya TN, Duch DS, Hemmings HC Jr*. Differential effects of anesthetic and nonanesthetic cyclobutanes on neuronal voltage-gated sodium channels. *Anesthesiology* 2000; 92: 529–41.
 - 7 *Choi DW*. Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci* 1988; 11: 465–9.
 - 8 *Rossi DJ, Oshima T, Attwell D*. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000; 403: 316–21.
 - 9 *Choi DW*. Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 1995; 18: 58–60.
 - 10 *Szatkowski M, Attwell D*. Triggering and execution of neuronal death in brain ischaemia: two phases of glutamate release by different mechanisms. *Trends Neurosci* 1994; 17: 359–65.
 - 11 *Hediger MA*. Glutamate transporters in kidney and brain. *Am J Physiol* 1999; 277: F487–92.
 - 12 *Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR*. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J Neurosci Res* 1999; 57: 417–28.
 - 13 *Tanaka K, Watase K, Manabe T, et al*. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 1997; 276: 1699–702.
 - 14 *Storm-Mathisen J, Danbolt NC, Rothe F, et al*. Ultrastructural immunocytochemical observations on the localization, metabolism and transport of glutamate in normal and ischemic brain tissue. *Prog Brain Res* 1992; 94: 225–41.
 - 15 *Katsumori H, Baldwin RA, Wasterlain CG*. Reverse transport of glutamate during depolarization in immature hippocampal slices. *Brain Res* 1999; 819: 160–4.
 - 16 *Palmada M, Bohmer C, Centelles JJ, Kinne RK*. Effect of benzodiazepines on the epithelial and neuronal high-affinity glutamate transporter EAAC1. *J Neurochem* 1999; 73: 2389–96.
 - 17 *Newman MF, Murkin JM, Roach G, et al*. Cerebral physiologic effects of burst suppression doses of propofol during nonpulsatile cardiopulmonary bypass. *CNS Subgroup of McSPI. Anesth Analg* 1995; 81: 452–7.
 - 18 *Jantzen JP*. Cerebral neuroprotection and ketamine. (German) *Anaesthesist* 1994; 43: S41–7.
 - 19 *Nugent M, Artru AA, Michenfelder JD*. Cerebral metabolic, vascular and protective effects of midazolam maleate: comparison to diazepam. *Anesthesiology* 1982; 56: 172–6.