**EKSPRESI P53 OTAK TIKUS MODEL ISKEMIA tBCCAO PASCA PEMBERIAN OBAT ANESTESI KETAMIN DAN KETAMIN-XYLAZIN**

 **Untung Widodo1, Muhammad Yusuf Hisyam 1, Nurul Hidayah2, Sahdella2, Zainuri Sabta Nugraha3, Kuswati3, Ety Sari Handayani\*3**

*1Departemen Anestesi, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta*

*2Mahasiswa, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta*

*3Departemen Anatomi, Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta*

***Submitted :........................ Reviewed :.......................... Accepted:.....................***

**ABSTRACT**

Ketamine or ketamine Xylazine is often used as an anesthetic drug in animal studies of ischemic models. The neuroprotectant and neurotoxic effects of ketamine and ketamine xylazin in tBCCAO ischemia animal models are still debated. The p53 protein is a pro apoptotic factor involved in the cellular mechanism of ischemia. The interaction of protein kinase 1 (DAPK 1) - p53 is an important point to determine whether cells will be necrosis or apoptosis in ischemic stroke. The purpose of this study was to determine whether there were differences in p53 protein expression in the rat brains of tBCCAO ischemic models after administration of ketamine and ketamine-xylazin. The design of this study was post test control group design. The subjects of the adult male wistar rats were divided into 3 groups: Group 1 sham operated 1 with ketamine, group 2 sham operated 2 with ketamine-xylazin, group 3 models of tBCCAO ischemia with ketamine, and group 4 models of tBCCAO ischemia with ketamine-xylazin. Ketamine dose 75mg / kgBW and xylazin dose 8 mg / kgBB. Expression of p53 in rat brain was assessed semi-quantification with IHC staining using anti-p53 antibodies. P53 expression will appear brownish in the forebrain pyramidal neuron cytoplasm. The method of measuring p53 expression uses the ALLRED score. Data analysis using one way ANOVA test. The conclusion of this study was that there was no difference in p53 expression in the brain of tBCCAO ischemic model after administration of Ketamine and Ketamine-Xylazin (p> 0.05).

**Keywords**: Ketamine Xylazin, p53, tBCCAO

.

***Corresponding author:***

Ety Sari Handayani

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

Jl. Kaliurang Km 14,5 Sleman DIY

eshyasser@yahoo.co.id

085878192619

**INTRODUCTION**

Penggunaan hewan coba model iskemia otak telah berkembang selama beberapa dekade. Salah satu model iskemia global adalah *transient bilateral common carotid artery occlusion* (tBCCAO). Model tBCCAO memiliki kelebihan dibandingkan model iskemia lainnya, yaitu angka mortalitas hewan coba yang lebih kecil jika dibandingkan dengan model iskemia otak *focal* (MCAO) (Kaya *et al*., 2016). Selain itu, model tBCCAO dapat digunakan untuk menggambarkan beberapa kondisi iskemia yang sering terjadi pada manusia, seperti iskemia akibat serangan jantung (Sanderson & Wider, 2013), stroke iskemia dengan atau tanpa kondisi penyerta diabetes, dan demensia vaskular (van der Spuy *et al.*, 2015; Traystman, 2003; Kim *et al.*, 2008; Wang *et al*., 2016; Barbhuiya *et al*., 2015). Mekanisme iskemia mencakup peristiwa nekrotik dan apoptosis. Ketidakseimbangan ion akibat iskemia akan menyebabkan depolarisasi neuron dan glia sehingga terjadi hipereksitabilitas reseptor NMDA (Fann *et al*., 2013; Mehta *et al*., 2007; Majid, 2014).

Beberapa obat anestesi digunakan dalam teknik tBCCAO. Ketamin adalah obat anestesi yang sering digunakan dalam operasi. Ketamin merupakan *a selective NMDA receptor inhibitor*. Ketamin berfungsi menekan proses *up-regulated NMDA receptor*. Mekanisme ini akan menurunkan *calcium influx* dan mengurangi cedera otak *(Zhang et al*., 2007). Selain ketamin, beberapa penelitian juga menggunakan kombinasi ketamin dengan *alpha-2 agonist* yaitu *xylazine* (Damiani *et al*., 2015). *Xylazine hydrochloride* dapat berfungsi sebagai analgesik, sedatif, dan *muscle relaxant* (Gonca, 2015). Berdasarkan beberapa hasil penelitian sebelumnya diketahui bahwa fungsi neuroprotektan atau neurotoksik dari ketamine maupun ketamine xylazin masih diperdebatkan.

Mekanisme seluler apoptosis sel pasca iskemik serebral melibatkan faktor pro apoptosis yaitu P53. Pemberian pifithrin-alpha (PFTα), suatu inhibitor p53 memperlemah transport p53 nuclear dan DNA binding, terbukti memperkuat neuron dan meningkatkan kesembuhan pasca stroke. Interaksi protein kinase 1(DAPK1) - p53 merupakan titik penting untuk menentukan apakah sel akan mengalami nekrosis atau apoptosis pada kejadian stroke iskemik. DAPK1 berikatan dengan p53DM dan mengkatalisis pS23, dimana akan masuk ke dalam inti dan mengaktifkan ekspresi gen pro apoptosis. Sebaliknya, jika pS23 masuk ke mitokondrial dan berinteraksi dengan cyclophilin D maka sel akan menjadi nekrosis. Interaksi DAPK1 - p53 merupakan target intervensi untuk terapi stroke (Pei *et al*., 2014).

Sampai saat ini diketahui apakah penggunaan ketamin dan kombinasi ketamin xylazin dapat mempengaruhi ekspresi protein p53 otak tikus model iskemia tBCCAO. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan ekspresi protein p53 otak tikus model iskemia tBCCAO pasca pemberian ketamin dan ketamin xylazin.

**MATERIALS AND METHOD**

**Materials**

 Subyek yaitu tikus jantan dewasa (*Rattus norvegicus*) galur Wistar yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi. Kriteria inklusi yaitu tikus jantan yang sehat dan tidak cacat, berumur 3 bulan dengan berat badan 200-250 gram. Penentuan tikus sehat berdasarkan keadaan fisik tikus yaitu kondisi bulu yang bersih, tidak basah atau lengket, tikus aktif bergerak, makan, minum dan tidur sesuai siklus hidupnya. Kriteria eksklusi yaitu tikus yang sakit dan mati selama perjalanan penelitian. Jumlah subyek yang digunakan berdasarkan prinsip 3R yaitu 18 ekor tikus. Subjek dibagi menjadi 4 kelompok yaitu kelompok 1 merupakan kelompok *sham operated* 1 (tanpa tBCCAO) dengan anestesi ketamin, kelompok 2 merupakan kelompok *sham operated* 2 (tanpa tBCCAO) dengan anestesi ketamin – xylazin, kelompok 3 adalah kelompok perlakuan 1 (*tBCCAO*) dengan anestesi ketamin dan kelompok 4 adalah kelompok perlakuan 2 (*tBCCAO*) dengan anestesi ketamin-xylazin. Dosis ketamin 75 mg/kg (Alfamine 10%, Alfasan Int., Woerden, Netherlands), dan dosis xylazin 8 mg/kg (Alfazyne 2%, Alfasan Int., Woerden, Netherlands) i.m.

**Methods**

1. **Adaptasi.** Pada hari ke-1 sampai hari ke-7, hewan coba adapatasi di kandang. Satu kandang diisi oleh 2 tikus. Suhu dalam kandang diatur pada suhu kamar. Pencahayaan dalam kandang diatur dengan siklus terang gelap selama 12 jam. Siklus terang dimulai pukul 06.00 WIB dan siklus gelap dimulai pukul 18.00 WIB. Pelet diberikan setiap hari pada pagi hari pukul 06.00 WIB. Air minum diberikan secara *ad libitum*.
2. **Induksi tBCCAO**. Prosedur melakukan tindakan tBCCAO berdasarkan prosedur yang telah dilakukan sebelumnya (Handayani *et al*., 2018; Handayani *et al*., 2016). Tikus dianestesi dengan ketamin. Dosis ketamin atau ketamin xylazin. Tikus diletakkan di *platform* steril *Digital Jumbo Hotplat*e (LHT-2030D). Suhu rektal tikus dipertahankan pada temperatur 37 ± 1°C. Desinfeksi bagian leher depan tikus dengan menggunakan larutan betadin. Insisi dilakukan secara vertikal pada bagian median leher anterior tikus. Arteri carotis comunis bilateral dieksplorasi dengan teknik diseksi tumpul tanpa memotong glandula submandibularis dan nervus phrenicus. Jika arteri karotis komunis telah tampak maka dilakukan ligasi arteri karotis komunis dengan menggunakan *micro vascular clamp* (Serrefine Small Curved. Q1Y:01No) selama 5, 10 dan 20 menit. Jika ligasi telah selesai maka diberikan terapi analgetik yaitu *bupivacain* 0,25% dosis 0,1 mL lokal. Frekuensi pemberian satu kali/hari. Bekas insisi dijahit kembali dengan menggunakan benang silk. Daerah disekitar insisi didisinfeksi menggunakan betadin. Pada hari ke- 8, Kelompok shame mendapatkan perlakuan operasi yang sama dengan kelompok kontrol dan perlakuan tanpa dilakukan ligasi arteri karotis komunis bilateral.
3. **Eutanasia dan Pengumpulan Jaringan Otak**. Eutanasia dilakukan pasca reperfusi 24 jam, dengan teknik perfusi transkardial. Tikus dianestesi menggunakan ketamin dosis 80-100 mg/kgBB im. Insisi linea mediana pada dinding abdomen dilakukan setelah tikus masuk dalam fase anestesi dalam, dilanjutkan insisi sepanjang linea axilaris sampai dinding thoraks terbuka dan jantung terlihat. Ventrikel kiri jantung diinsisi kemudian kanula dimasukkan sampai mencapai aorta ascenden. Kanula difiksasi dengan penjepit arteri. Insisi atrium kanan untuk mengeluarkan darah. Cairan perfusi NaCl dialirkan melalui kanula. Agar otak mendapatkan perfusi sepenuhnya maka dilakukan jepitan pada aorta decendens. Perfusi dilanjutkan sampai darah yang keluar melalui atrium kanan tampak jernih dan arteri mamaria interna di sekitar sternum tampak putih karena terisi cairan jernih. Dekapitasi dilakukan setelah perfusi transkardial sempurna, kemudian jaringan otak diambil (Handayani *et al*., 2018).
4. **Pembuatan Preparat Histologis**. Blok parafin jaringan otak bagian depan disayat setebal 5 μm dengan menggunakan *rotary microtome*. Diambil satu sayatan, kemudian dilakukan pewarnaan IHC (imunohistokimia) dengan *antibody anti-p53* (*Catalog No*.: FNab06083). Pewarnaan IHC dimulai dengan deparafinisasi menggunakan *xylol* dan alkohol dengan konsentrasi menurun. Jaringan selanjutnya diinkubasi dengan H2O2 3% dalam 10% methanol selama 20 menit, kemudian dicuci dengan menggunakan akuades tiga kali dan PBS tiga kali. Selanjutnya dilakukan *antigen retrieval* dengan *buffer* sitrat pH 6 di dalam *microwave*. Irisan dipanaskan dalam temperatur tinggi (100⁰C) selama 10 menit kemudian dilanjutkan dengan temperatur sedang-rendah selama 20 menit. Setelah itu irisan didinginkan dan dicuci kembali sebanyak tiga kali menggunakan PBS. Irisan kemudian di*blocking* dengan protein *background snipper* dalam waktu 10 menit lalu ditetesi antibodi (Ab) primer dan diinkubasi selama satu malam dengan suhu 4oC sebelum dicuci kembali sebanyak tiga kali dengan PBS. Setelah itu irisan diinkubasi dengan Trekki Universal Link selama 10 menit dan dicuci kembali dengan PBS sebanyak tiga kali. Kemudian dilakukan inkubasi dengan *horseradish peroxidase conjugated Streptavidin* (kompleks SA-HRP) selama 10 menit dan dicuci kembali dalam PBS sebanyak tiga kali. Pengenalan sel yang terlabel p53 dilakukan dengan 3,3’-diaminobenzidin (1:100) selama lima menit. Jaringan selanjutnya dicuci sebanyak lima kali menggunakan akuades dan dilanjutkan *counterstained* dengan *hematoxylin meyers* selama satu menit, kemudian cuci dengan air mengalir selama dua menit. Selanjutnya dilakukan dehidrasi menggunakan etanol bertingkat yaitu 70%, 80%, 90%, 95%, dan 100% masing-masing selama satu menit. Kemudian dibersihkan dengan *xylene* dan di*coverslip* dengan canada balsam.
5. **Pengamatan preparat histologis**. Pengamatan preparat histologis menggunakan perbesaran 1000x pada mikroskop cahaya *Olympus CX21* dengan kamera *optilab* yang terhubung pada komputer. Komputer yang terhubung dengan mikroskop memiliki *software optilab viewer* untuk merekam gambar. Ekspresi protein p53 adalah semi kuantifikasi p53 yang terekspresikan pada neuron pyramidal *Forebrain* dengan pewarnaan IHC menggunakan antibody anti p53. Ekspresi p53 akan tampak pada sitoplasma neuron. Sitoplasma neuron akan berwarna kecoklatan. Ekspresi p53 dinilai menggunakan *Allred scoring* yang mempertimbangkan proporsi sel positif dalam skala 0-5 dan intensitas warna dalam skala 0-3. Hasil penilaian dari kedua parameter itu akan dijumlah untuk menginterpretasikan ekspresi p53. Jika didapatkan hasil penjumlahan 0-2 maka ekspresi p53 dianggap negatif, sedangkan hasil penjumlahan 3-8 maka ekspresi p53 dianggap positif. Penelitian ini menerapkan *system blinding* dimana masing masing subyek ditandai dengan kode khusus oleh peneliti ketujuh. Pengerjaan induksi iskemia, proses dekapitasi, proses pembuatan blok sampai pewarnaan IHC dilakukan oleh peneliti ketujuh. Pengambilan foto dan analisis Skor ALLRED dilakukan oleh peneliti ketiga dan keempat dimana para peneliti tersebut tidak mengetahui kode tikus. Analisis statistika dilakukan bersama oleh para peneliti dimana kode subyek sudah diketahui jenis kelompoknya. Prinsip *blinding* ini dilakukan untuk meminimalisir bias penelitian.
6. **Uji kelayakan etik**. Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komite Etik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dengan nomor surat 08/Ka.Kom.Et/70/KE/XI/2017.
7. **Data Analysis**. Uji normalitas data menggunakan uji *shapiro-*wilk. Perbedaan ekspresi p53 antar kelompok diuji dengan uji statistik *Analyze of Varian* atau ANOVA. Jika hasil analisis data yang didapatkan signifikan (p<0,05) maka dilanjutkan dengan *post-hoc test*.

**RESULT AND DISCUSSION**

Hasil pengamatan ekspresi protein p53 dapat diamati pada gambar 1 dan tabel 1 berikut.

 



**Gambar 1. Hasil pengamatan sel neuron dengan perbesaran 1000x (A) Kelompok 1 (B) Kelompok 2 (C) Kelompok 3 (D) Kelompok 4.**

**Tabel 1. Rerata skor ALLRED**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| Kelompok | Rerata | SD | Nilai p |
| 1 | 4.735 | 0.13 |  0,269 |
| 2 | 4.750 | 0.20 |
| 3 | 4.922 | 0.08 |
| 4 | 4.945 | 0.33 |

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa obat anestesi ketamin maupun kombinasi ketamin xylazin tidak memiliki perbedaan ekspresi p53 pada otak tikus model iskemia tBCCAO (p>0,05). Hasil penelitian ini juga menunjukkan bahwa penggunaan ketamin dosis 75 mg/kgBB maupun kombinasi ketamin dengan xylazine dosis 8 mg/kgBB tersebut dapat menginduksi ekspresi protein p53 otak tikus normal.

Pada kelompok tikus yang diinduksi iskemia tBCCAO tidak terdapat perbedaan ekspresi p53 antara kelompok yang mendapatkan anestesi ketamin dengan kelompok ketamin xylazin. Hasil penelitian ini mendukung penelitian yang dilakukan oleh Linou *et al*. (2015) dimana membandingkan anestesi isofluran dan ketamin-xylazin (dosis ketamin 100 mg/kgBB ip dan xylazin 10 mg/kgBB ip) pada mencit model iskemia pMCAO.Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan jumlah neuron yang mengalami apoptosis pasca pemberian isofluran dan ketamin xylazin pada mencit yang mengalami iskemia otak. Isofluran dan ketamin memiliki sifat yang sama yaitu sebagai antagonis reseptor glutamat NMDA (Linou *et al.*, 2015).

Beberapa penelitian menunjukkan bahwa ketamin bisa bersifat sebagai neuroprotektan. Pada dosis tertentu maka ketamin dapat berfungsi sebagai pelindung saraf pada hewan coba model iskemia. Zang *et al*. (2007) menyebutkan bahwa pemberian ketamin dosis 50 mg/kgBB pada tikus model iskemia BCCAO akan melindungi korteks cerebri (Zhang *et al*., 2007). Pemberian ketamin dosis 3 mg/kgBB pada fetus hewan coba yang diinduksi hipoksia dapat melindungi cortex frontalis fetus tersebut (Rabaglino *et al*., 2016). Hal ini sesuai dengan hasil penelitian ini dimana tidak terdapat perbedaan ekspresi p53 antara kelompok tikus tBCCAO dengan kelompok *sham operated* yang hanya mendapatkan anestesi ketamin.

Sebaliknya, selain menimbulkan efek neuroprotektan maka ketamin dapat menginduksi apoptosis neuron. Menurut Yan *et al*. (2014), ketamin dapat menyebabkan apoptosis neuron hippocampus neonatus apabila proses pemberian dilakukan secara berulang selama tiga hari. Ketamin meningkatkan produksi ROS, HIF-1α (*Hypoxia in ducible factor-1* subunit α), bax dan ekspresi p53 neuron hippocampus neonatal.

Ketamin dapat meningkatkan kadar bax, menginduksi *up regulation* reseptor NMDA, meningkatkan pembentukan ROS dan senyawa *8-oxoguanine* sehingga terjadi kerusakan neuron (Liu *et al*., 2013; Engelhard *et al,* 2003).

Damiani *et al*. (2015) menyebutkan bahwa dosis tinggi ketamin 140 mg/kg BB dapat menyebabkan genotoksisitas di sel darah dan cortex otak mencit. Kerusakan DNA tersebut terus berlangsung selama 24 jam pasca pemberian anestesi ketamin (Damiani *et al*., 2015).

Ekspresi p53 pada kelompok *sham* ketamin xylazin menunjukkan bahwa obat tersebut dapat menginduksi apoptosis. Hal ini dimungkinkan adanya penurunan aliran darah otak pada pemberian ketamin xylazin sehingga terjadi iskemia pada kelompok sham. Prando *et al*. (2019) menyebutkan bahwa ketamin xylazin dapat menurunkan metabolisme glukosa otak.

Sebaliknya, pada kelompok tikus model iskemia tBCCAO, pemberian anestesi ketamin Xylazin dapat menimbulkan respon protektif karena tidak terdapat perbedaan ekspresi p53 antara kelompok *sham* ketamin xylazin dan kelompok model iskemia tBCCAO ketamin xylazin. Hasil penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa anestesi ketamin-xylazin dosis 70 mg/kgBB (ketamin) dan 6 mg/kgBB (xylazin) menunjukkan adanya efek inhibisi pada senyama inflamatorik iNOS (*inducible nitric oxide synthase)* sehingga memiliki respon protektif terhadap sel-sel yang mengalami hipoksia (Helmer *et al*., 2003). Hasil yang berbeda ditunjukkan oleh penelitian Lei *et al*. (2001), pemberian anestesi ketamin-xylazin pada tikus menyebabkan penurunan aliran darah korteks serebri*.* Sebaliknya, pemberian ketamin 50 mg/kgBB tanpa kombinasi xylazin tidak menunjukkan ada perubahan yang signifikan pada aliran darah otak (Lei *et al*., 2001).

Berdasarkan hasil penelitian ini dan beberapa penelitian sebelumnya maka efek ketamin maupun ketamin xylazin dipengaruhi oleh beberapa kondisi, salah satunya adalah dosis pemberian, frekuensi pemberian, serta kondisi khusus hewan coba seperti janin dan hipoksia.

**CONCLUSION**

 Tidak ada perbedaan ekspresi protein p53 otak tikus model iskemia tBCCAO pasca pemberian obat anestesi Ketamin dan Ketamin-Xylazin

**ACKNOWLEDGEMENT**

Ucapan terimakasih ditujukan kepada Unit Penelitian dan Pengabdian Masyarakat (UPPM) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.

**REFERENCES**

Barbhuiya, A.M., Rahman, H. & Bardalai, D., 2015. Comparative Evaluation of Various Models of Ischemic Stroke in Rats. *Scholars Bulletin*, 2, pp.38–47.

Damiani, A.P., Borges, G.D. & Zambon, G.M., 2015. Anesthetic Ketamine-Induced DNA Damage in Different Cell Types In Vivo. *Molecular Neurobiology ·*, (October).

Engelhard, K. et al., 2003. The Effect of the ␣ 2 -Agonist Dexmedetomidine and the N-Methyl-. Neurological Anesthesia, 96, pp.524–531.

Fann, D.Y. et al., 2013. Pathogenesis of acute stroke and the role of inflammasomes. *Ageing Research Reviews*, 12(4), pp.941–966. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2013.09.004.

Gonca, E., 2015. Comparison of thiopental and ketamine+xylazine anesthesia in ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in rats. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 45(6), pp.1413–1420.

Handayani, E.S. et al., 2016. Black sugarcane decoction reduces rat brain ischemia. *Universa Medicina*, 35(1), pp.40–45.

Handayani, E.S. et al., 2018. Effect of BCCAO Duration and Animal Models Sex on Brain Ischemic Volume After 24 Hours Reperfusion. *Bangladesh Journal of Medical Science*, 17(01), pp.129–137.

Kaya, A.H., Erdogan, H. & Tasdemiroglu, E., 2016. Searching Evidences of Stroke in Animal Models : A Review of Discrepancies. *Turkish Neurosurgery*, pp.1–7.

Kim, S., Cho, K. & Kim, S.Y., 2008. White Matter Damage and Hippocampal Neurodegeneration In- duced by Permanent Bilateral Occlusion of Common Carotid Artery in the Rat : Comparison between Wistar and Sprague-Dawley Strain. *Korean J Physiol Pharmacol*, 12(80), pp.89–94.

Linou, M. et al., 2015. Isoflurane and Ketamine / Xylazine Anesthesia do not Influence the Neuroprotective Effects of Simvastatin in a Model ... Isoflurane and Ketamine / Xylazine Anesthesia do not Influence the Neuroprotective Effects of Simvastatin in a Model of Permanent Cere. *British Journal of Medicine & Medical Research*, 10(12).

Lei H., Casmier I., Nwaigwe., D.J.F., 2001. Effects of Ketamine and KetamineXylazine Anesthesia on Cerebral Blood Flow in Rat Observed Using. Proc. Intl. Soc. Med, 9, p.7786.

Liu, F. et al., 2013. Ketamine-induced neuronal damage and altered N-methyl-daspartate receptor function in rat primary forebrain culture. Toxicological Sciences, 131(2), pp.548–557.

Majid, A., 2014. Neuroprotection in Stroke : Past , Present , and Future. *ISRN Neurology*, 2014.

Mehta, S.L., Manhas, N. & Raghubir, R., 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Research Reviews*, 4.

Prando, S; Carneiro, C.G., Otsuki, D.A., Sapienza, M.T. 2019. Effect o ketamine/xylazine and isoflurane on rat brain glucose metabolism measured by 18 F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography. Eur J Neurosci, 49(1):51-61

Pei, L. et al., 2014. DAPK1-p53 Interaction Converges Necrotic and Apoptotic Pathways of Ischemic Neuronal Death. *Journal of Neuroscience*, 34(19), pp.6546–6556. Available at: http://www.jneurosci.org/cgi/doi/10.1523/JNEUROSCI.5119-13.2014.

Rabaglino, M.B. et al., 2016. Ketamine decreases inflammatory and immune pathways after transient hypoxia in late gestation fetal cerebral cortex. *Physiological Reports*, 4, pp.1–15.

Sanderson, T.H. & Wider, J.M., 2013. 2-Vessel Occlusion / Hypotension : A Rat Model of Global Brain Ischemia. *Journal of Visualized Experiments*, 76(June), pp.1–8.

van der Spuy, W.J., Goosen, D.J. & Bosman, M.C., 2015. Hyperglycemic Modification to Classical Two-Vessel Occlusion for Inducing Transient Cerebral Ischemia in Sprague-Dawley Rats. *Journal of Neurophysiology and Neurological Disorders*, 2(1), pp.1–5. Available at: http://www.jscholaronline.org/full-text/JNND/301/Hyperglycemic-Modification-to-Classical-Two-Vessel-Occlusion.php.

Traystman, R., 2003. Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. *ilarjournal*, 44(2), pp.85–95.

Wang, Y. et al., 2016. White matter injury in ischemic stroke. *Progress in Neurobiology*, 141, pp.45–60. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.pneurobio.2016.04.005.

Yan, J. et al., 2014. Repeated Administration of Ketamine can Induce Hippocampal Neurodegeneration and Long-Term Cognitive Impairment via the ROS / HIF-1 D Pathway in Developing Rats. *Cell Physiol Biochem*, 33, pp.1715–1732.

Zhang, J.Z. et al., 2007. Inhibitory effect of ketamine on phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase1/2 following brain ischemia and reperfusion in rats with hyperglycemia. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(3-4), pp.227–235.