

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin,  
Campus Charité Mitte und Campus Virchow-Klinikum, CharitéCentrum 7  
für Anästhesiologie, OP-Management und Intensivmedizin, Medizinische  
Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

in Zusammenarbeit mit dem

Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Fachbereich Veterinärmedizin,  
Freie Universität Berlin

DISSERTATION

Tierexperimentelle Verhaltensuntersuchungen nach neonataler  
Anästhetika-Behandlung

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Antonia Marie Kammerl  
aus München

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. T. Kerner  
2. Prof. Dr. med. Chr. Bühner  
3. Priv.-Doz. Dr. med. P. Bittigau

Datum der Promotion: 15. Dezember 2008

---

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
1.1.	Schmerzempfindung und Narkose bei Früh- und Neugeborenen	3
1.2.	Verwendete Medikamente zur Anästhesie von Früh- und Neugeborenen	5
1.2.1.	Propofol	6
1.2.2.	Sevofluran	7
1.2.3.	Midazolam	8
1.3.	Wirkmechanismen und Neurotoxizität von Anästhetika	8
1.4.	Verhaltenstests zur Neurotoxizität	10
1.5.	Fragestellung	12
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>13</b>
2.1.	Versuchstiere	13
2.2.	Verwendete Substanzen	14
2.3.	Behandlung der Tiere	15
2.3.1.	Anästhesie mit Propofol	16
2.3.2.	Anästhesie mit Sevofluran	17
2.3.3.	Kombinationsnarkose mit Midazolam, Propofol und Sevofluran	18
2.4.	Verhaltenstests	20
2.4.1.	Der <i>Open-Field</i> -Test	20
2.4.2.	Der <i>Home-Cage-Activity</i> -Test	22
2.4.3.	Der <i>Morris-Water-Maze</i> -Test	23
2.4.4.	Der <i>Hole-Board</i> -Test	26
2.5.	Statistik	27
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>28</b>
3.1.	Überwachung der Tiere während der Behandlung	28
3.2.	Körpergewichtsentwicklung	30
3.3.	Verhaltenstests	31
3.3.1.	<i>Open-Field</i> -Test	31
3.3.1.1.	Tiere mit Propofol-Anästhesie	31
3.3.1.2.	Tiere mit Sevofluran-Anästhesie	32
3.3.1.3.	Tiere mit Kombinationsnarkose	34
3.3.2.	<i>Home-Cage-Activity</i> -Test	34
3.3.3.	<i>Morris-Water-Maze</i> -Test	36

3.3.3.1.	Tiere mit Propofol-Narkose	37
3.3.3.2.	Tiere mit Sevofluran-Narkose	38
3.3.3.3.	Tiere mit Kombinationsnarkose	39
3.3.4.	<i>Hole-Board-Test</i>	40
3.3.4.1.	Tiere mit Propofol-Narkose	41
3.3.4.2.	Tiere mit Sevofluran-Narkose	42
3.3.4.3.	Tiere mit Kombinationsnarkose	43
3.3.5.	Geschlechtsspezifisches Verhalten der Kontrolltiere	44
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>47</b>
4.1.	Ergebnisse der Verhaltenstests	47
4.2.	Neuronale Apoptosevorgänge im neonatalen Gehirn	49
4.3	Bedeutung von Glutamat und GABA in der Gehirnentwicklung	52
4.4.	Einfluss von Anästhetika auf die ZNS-Entwicklung	53
4.5.	Methodenkritik	56
4.5.1.	Dauer der Exposition gegenüber Anästhetika	56
4.5.2.	Folgen von intra-/postoperativer Mangelernährung	57
4.5.3.	„ <i>Monitoring</i> “ der Tiere während der Behandlung	57
4.5.4.	Dosis-abhängige Wirkung von Anästhetika	58
4.5.5.	Die Rolle von Schmerzstimuli und „Erleben“ der Narkose	59
4.6.	Schlussfolgerungen	60
4.7.	Ausblick	61
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>63</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>65</b>
	Abkürzungsverzeichnis	80
	Lebenslauf	82
	Danksagung	83
	Erklärung an Eides statt	85

# 1. EINLEITUNG

## 1.1. Schmerzempfindung und Narkose bei Früh- und Neugeborenen

Über die Frage, ob und in welcher Weise der neugeborene Mensch Schmerz erlebt und spürt, ist im Laufe der Jahrhunderte viel diskutiert worden.

1563 erklärt der schweizerische Chirurg und Pädiater Felix Würtz, dass der zu spürende Schmerzgrad umso größer werde, je kleiner und unreifer das Kind sei.<sup>1</sup>

Der Glaube, dass der gefühlte Schmerz eines Säuglings stärker sei als der des Erwachsenen bestand etwa bis Mitte des 19. Jahrhunderts. Zu dieser Zeit glaubte man auch, den Ursprung und die Intensität mit geübtem Auge aus der Schmerzreaktion im Gesicht des Kindes ablesen zu können.<sup>2</sup>

Dies wurde 1872 von Charles Darwin in seinem Werk *The Expression of Emotions in Man and Animal* bestritten. Er behauptete, dass das Schreien und Grimassieren von Neugeborenen nicht Ausdruck von Schmerz, sondern viel mehr gewöhnliche Reflexe seien und dass der vermeintliche Ausdruck von Schmerz bei „Tieren, Neugeborenen, Wilden und Geisteskranken“ unter keinen Umständen ein echtes Schmerzerlebnis implizieren könne.<sup>3</sup>

Der Psychiater und Neurologe Paul Emil Flechsig beobachtete im selben Jahr, dass die Myelinisierung der Nervenfasern nicht kontinuierlich, sondern mit wechselnder Geschwindigkeit geschieht. Daraus schloss er, dass die noch nicht myelinisierten Fasern beim neugeborenen Kind nicht funktionstüchtig seien, und dass deswegen die Sensorik beim neugeborenen Kind nur unvollständig ausgebildet sein könne.<sup>4</sup>

Aufgrund dieser Entdeckung und fortschreitender Erkenntnisse der experimentellen Embryologie über die Entwicklung des zentralen Nervensystems, war man schließlich bis in die 1980er Jahre der Meinung, das Neugeborene könne keinen oder nur in geringem Maße Schmerz verspüren.<sup>5</sup> Zusätzliche Hinweise für die Richtigkeit dieser Theorie sah die Wissenschaft darin, dass a) Kinder sich generell nicht an Ereignisse in der frühen Kindheit erinnern könnten, dass b) die Schmerzbahn zwischen Thalamus und Kortex bei Neugeborenen nicht vollständig und funktionstüchtig ausgeprägt sei und dass c) im Tiermodell nur reflexartige Reaktionen auf Schmerzstimuli beobachtet werden könnten.<sup>5</sup>

In der Praxis führte dies zu mangelnder bis fehlender Schmerztherapie bei Früh- und Neugeborenen.<sup>6,7</sup>

1952 hatte der französische Neurologe André-Thomas die bisherigen Erkenntnisse über die Funktionalität der Myelinscheide beim Neugeborenen in Frage gestellt, nachdem er in Studien mit neugeborenen Versuchstieren beobachtet hatte, dass auch nicht-myelinisierte Nervenfasern erregt werden können.<sup>8</sup>

Trotz dieser Beobachtung war es jedoch bis in die frühen 80er Jahre üblich, kleine chirurgische Eingriffe (z. B. Zirkumzisionen) und bis in die 70er Jahre sogar Laparotomien (z. B. zur Versorgung angeborener Zwerchfellhernien) bei Früh- und Neugeborenen mit ungenügender bis fehlender Analgesie durchzuführen.<sup>6,9-12</sup>

Die medizinische Praxis änderte sich erst, als durch fortgeschrittene Labortechnik und Monitorüberwachung während einer Operation die Vitalparameter kontinuierlich gemessen und Laborwerte im Verlauf kontrolliert werden konnten. Ohne Analgesie konnte hierbei ein Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck sowie u. a. erhöhte Werte von Kortikosteroiden<sup>13-15</sup>, Glukagon<sup>16</sup> oder Katecholaminen<sup>16</sup> im Plasma nachgewiesen werden. So wurde erstmals 1983 eine Regionalanästhesie zur Beschneidung von reifgeborenen männlichen Neonaten empfohlen.<sup>17,18</sup>

Die Erkenntnis, dass Säuglinge und Kleinkinder ebenso Schmerz empfinden wie Erwachsene und folglich einer suffizienten Narkose und Analgesie bedürfen, ist heute allgemein anerkannt und hat nicht zuletzt zur Etablierung der Kinderanästhesie als eigene Subspezialisierung in der Anästhesie geführt.

## 1.2. Verwendete Medikamente zur Anästhesie von Früh- und Neugeborenen

Die Frage nach der Verträglichkeit und den Auswirkungen einer neonatalen Anästhesie auf den Organismus eines Früh- bzw. Neugeborenen konnte bisher nicht endgültig geklärt werden, da keine umfangreichen wissenschaftlichen Daten zur Anwendung von Anästhetika bei Kindern existieren. Aus diesem Grund besaßen bis vor einigen Jahren die meisten der zur anästhesiologischen Versorgung von Früh- und Neugeborenen verwendeten Medikamente in Deutschland keine Zulassung für diese Altersgruppe.<sup>19</sup> Die Verwendung von Medikamenten ohne Zulassung oder außerhalb der vom Hersteller angegebenen Anwendungsgebiete (sog. *Off-label use*) ist in der Pädiatrie allgemein ein aktuelles, länderübergreifendes Problem.<sup>20-24</sup>

Mittlerweile sind einige Anästhetika, die heute häufig zur Narkose von Neonaten verwendet werden, in Deutschland hierfür zugelassen (s. u.), doch es existieren keine entsprechenden Leitlinien der AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.). Auch die FEAPA (*Federation of the European Associations of Paediatric Anaesthesia*) und die DGAI (Deutsche Gesellschaft für Anästhesiologie und Intensivmedizin) beschränken sich in ihren aktuellen „Empfehlungen für die anästhesiologische Versorgung von Kindern in Europa“<sup>25</sup> auf grundsätzliche Vorgehensweisen und klinikstrukturelle Voraussetzungen für die Anästhesie von Kindern und geben dabei keine speziellen Empfehlungen zur Medikation bei Allgemeinanästhesien.

Man darf deshalb davon ausgehen, dass die angewendeten Konzepte bzw. Medikamente zur Narkoseeinleitung und –aufrechterhaltung bei Früh- und Neugeborenen in deutschen Kliniken sowie international erheblich variieren.

Medikamente, die heute zur Narkoseeinleitung und –aufrechterhaltung bei Früh- und Neugeborenen sowie Säuglingen Verwendung finden, sind vor allem Opiate, Barbiturate (z. B. Thiopental und Methohexital), Propofol und (S-)Ketamin; als Inhalationsnarkotika werden Sevofluran, Isofluran und Lachgas verwendet.<sup>26</sup> Das bis vor wenigen Jahren regelhaft eingesetzte Halothan ist in den meisten Kliniken aus der klinischen Praxis verschwunden. Bei Säuglingen ab einem Alter von sechs Monaten wird häufig Midazolam als Prämedikation verabreicht.<sup>26,27</sup> Während beispielsweise für Barbiturate<sup>28</sup> und zentral wirksame Analgetika<sup>29</sup> eine Zulassung für Kinder ab einem

und für Propofol für Kinder ab einem Monat besteht<sup>30</sup>, existieren für die Verwendung von volatilen Anästhetika<sup>28</sup> keine derartigen Altersbegrenzungen.

Derzeit werden in deutschen Kliniken zur anästhesiologischen Versorgung von Neu- und Frühgeborenen bzw. von Säuglingen unter anderem Propofol und Sevofluran verwendet.<sup>27</sup> In der hier vorliegenden Studie wurden diese deshalb Substanzen ausgewählt, um deren neuropsychologischen Auswirkungen bei neonataler Anwendung tierexperimentell zu untersuchen. Hierbei wurden die Auswirkungen einer Mononarkose mit Propofol bzw. Sevofluran sowie die Kombination beider Substanzen mit Midazolam getestet. Die Eigenschaften der drei Medikamente werden in den Abschnitten 1.2.1. bis 1.2.3. näher beschrieben.

### **1.2.1. Propofol**

Propofol (2,6-Diisopropylphenol) ist ein kurzwirksames Injektionsnarkotikum, das als 1%- oder 2%ige Emulsion angeboten wird und seit der Erstbeschreibung in den 80er Jahren auf Grund seiner günstigen pharmakokinetischen Eigenschaften zunehmend häufiger Verwendung findet. Aufgrund der hohen Lipophilie und schnellen Biotransformation führt die parenterale Applikation zu raschem Bewusstseinsverlust, der bei üblicher Dosierung etwa vier bis acht Minuten anhält. Propofol verstärkt die inhibitorische Funktion der Neurotransmitter  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin am GABA<sub>A</sub>- bzw. Glycin-Rezeptor und ist gleichzeitig am exzitatorischen glutamatergen N-methyl-d-aspartat-(NMDA-)Rezeptor als Antagonist wirksam.<sup>31,32</sup>

Wegen seiner rasch einsetzenden Wirkung und guten Verträglichkeit ist Propofol ein geschätztes und häufig angewendetes Anästhetikum und Sedativum.

1%iges Propofol ist gemäß der Fachinformation in Deutschland zur Narkoseeinleitung und -aufrechterhaltung bei Kindern ab einem Alter von 1 Monat zugelassen, die 2%ige Emulsion ab 3 Jahren.<sup>30</sup>

Zu den unerwünschten klinischen Nebenwirkungen gehören neben Blutdruckabfall und Atemdepression<sup>31</sup> lebhaftere, selten auch unangenehme Träume mit teils sexuellen Phantasien<sup>33</sup> beim Abklingen der Wirkung, Krampfanfälle<sup>34</sup> und das sog. Propofol-Infusionssyndrom. Dieses wurde häufiger bei Kindern als bei Erwachsenen beschrieben, insbesondere wenn sie über einen längeren Zeitraum mit Propofol sediert

wurden<sup>35</sup>. Häufig wurde das Propofol-Infusionssyndrom in Verbindung mit Atemwegsinfektionen beobachtet,<sup>36</sup> das durch eine schwere metabolische Azidose, Rhabdomyolyse<sup>33</sup>, Nierenversagen und Herzversagen<sup>35</sup> charakterisiert ist. Todesfälle traten insbesondere dann auf, wenn ein schweres Krankheitsbild vorlag und Dosen über 5 mg/kg/h über eine längere Dauer (> 48 h) verabreicht wurden.<sup>35</sup> Katecholamine und Kortikosteroide können als Trigger-Faktoren wirken.<sup>35</sup>

### 1.2.2. Sevofluran

Sevofluran (Fluormethyl-2,2,2-trifluoro-1-(trifluoromethyl)ethylether) gehört zu den neueren volatilen Anästhetika. Es verstärkt die hemmende Wirkung von GABA am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und wirkt zudem über Glycin- sowie neuronale nikotinische Azetylcholin-Rezeptoren.<sup>32,37</sup> Eine Hemmung der glutamatergen Erregung am NMDA-Rezeptor und am  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionsäure-(AMPA-)Rezeptor wurde 2005 einmalig bei Untersuchungen am Atemzentrum dezerebrierter Hunde beschrieben.<sup>38</sup> Flurane (Isofluran, Desfluran, Sevofluran und Enfluran) zeichnen sich allgemein durch Niedermolekularität, einen hohen Dampfdruck und einen niedrigen Siedepunkt aus.<sup>39</sup> Sevofluran ist im Vergleich zu herkömmlichen Inhalationsanästhetika (wie z. B. Isofluran) besser steuerbar (Blut-Gas-Verteilungskoeffizient für Sevofluran: 0,65; für Isofluran: 1,40) und hat einen vergleichsweise angenehmen Geruch.<sup>39</sup> Die fehlende Atemwegsreizung macht Sevofluran zum bevorzugten Inhalationsnarkotikum bei der Narkoseeinleitung von Kindern. Zudem zeigte es in tierexperimentellen und klinischen Studien kardioprotektive Eigenschaften,<sup>40-43</sup> weshalb Sevofluran auch gerne bei älteren Patienten eingesetzt wird. Eine unerwünschte Nebenwirkung ist das häufige Auftreten postoperativer Agitationszustände bei Kindern unter sechs Jahren.<sup>44</sup> Bei gegebener Disposition kann Sevofluran, wie auch die anderen halogenierten Kohlenwasserstoffe, die zur Inhalationsnarkose verwendet werden, eine maligne Hyperthermie auslösen.<sup>39</sup>

Die Fachinformationen der Sevofluran-Präparate indizieren Sevofluran zur Einleitung und –aufrechterhaltung einer Inhalationsnarkose bei Erwachsenen und Kindern, ohne dabei auf Altersbeschränkungen hinzuweisen.<sup>28</sup>

### 1.2.3. Midazolam

Midazolam (8-Chlor-6-(2-fluorphenyl)-1-methyl-4H-imidazo[1,5-a][1,4]benzo-diazepin) ist ein wasserlösliches Benzodiazepin und bewirkt im ZNS vor allem eine Verstärkung der inhibitorischen Wirkung des Neurotransmitters GABA am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor.<sup>45</sup> Midazolam wird in der Kinderanästhesie ab einem Alter von ca. sechs Monaten, wenn das Kind zu „fremdeln“ beginnt, rektal, nasal oder oral verabreicht, um bei den jungen Patienten Anxiolyse und Sedierung sowie eine anterograde Amnesie für den Zeitraum der Narkoseeinleitung zu erreichen.

Für die intravenöse Anwendung von Midazolam besteht eine Zulassung zur Sedierung auf der Intensivstation für Früh- und Reifgeborene, für die rektale Prämedikation ab einem Alter von sechs Monaten.<sup>46</sup>

Schwerwiegende kardiorespiatorische Depression bis hin zu Apnoe und Herzstillstand treten gehäuft bei kombinierter Anwendung mit Opiaten und Barbituraten auf.<sup>47-49</sup> Insbesondere bei Früh- und Neugeborenen wird ein Auftreten von Myokloni durch Midazolam beschrieben.<sup>50,51</sup> Vor allem bei älteren Patienten und Kindern kann es eine sog. paradoxe Reaktion hervorrufen, die mit Erregungszuständen, Aggressivität und Schlaflosigkeit einhergeht.<sup>52</sup>

Bei abruptem Absetzen von Midazolam nach längerer Anwendung (> 48 h) auf der Intensivstation können ähnliche Symptome als Entzugserscheinungen beobachtet werden.<sup>53</sup> Nebenwirkungen wie gastrointestinale Beschwerden, Hautirritationen und anaphylaktischer Schock sind insgesamt sehr selten (Indizienz: < 0,01 %).<sup>46</sup>

### 1.3. Wirkmechanismen und Neurotoxizität von Anästhetika

Anästhetika wirken durch selektive Modulation der neuronalen Aktivität verschiedener ZNS-Areale, wobei nach neueren Erkenntnissen der Thalamus für die kortikale Inhibition mit konsekutivem Bewusstseinsverlust eine entscheidende Rolle zu spielen scheint.<sup>54</sup> Als Angriffsorte für Anästhetika auf molekularer Ebene dienen verschiedene Rezeptoren,<sup>32,55,56</sup> wobei neben GABA<sub>A</sub>- und NMDA-Rezeptoren bisher eine ganze Reihe Ligand-gesteuerter Ionen-Kanäle beschrieben wurde: Glycin-Rezeptoren, nikotinische Azetylcholin-Rezeptoren, 5-HT<sub>3</sub> (5-Hydroxytryptamin Typ 3)-, AMPA- und Kainat-Rezeptoren.<sup>57</sup> Volatile Anästhetika können außerdem auch an Kalium-Kanäle

binden.<sup>58</sup> Bei manchen der heterogen vorkommenden Rezeptortypen reagieren nur einzelne Subtypen sensitiv auf Anästhetika.<sup>57</sup>

Auch die üblicherweise heute in der Kinderanästhesie verwendeten Anästhetika wie auch die unter 1.2. beschriebenen Substanzen wirken vor allem über a) die Stimulation durch GABA am inhibitorisch wirkenden GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (z.B. Benzodiazepine, Barbiturate, Propofol, Etomidate, Isofluran, Enfluran, Desfluran, Sevofluran und Halothan)<sup>59</sup> und/oder b) die Hemmung der glutamatergen neuronalen Exzitation durch NMDA-Rezeptor-Antagonismus (Ketamin, Lachgas).<sup>60-63</sup>

(Eine Ausnahme bilden hierbei die Opiate, welche als Agonisten und Antagonisten an den  $\mu_{1/2}$ -,  $\kappa$ - und  $\delta$ -Opioid-Rezeptoren ihre Wirksamkeit entfalten.)

Das GABA<sub>A</sub>-Rezeptorsystem, durch welches u. a. Vigilanz, Ängstlichkeit, Gedächtnisleistung und Muskelspannung beeinflusst und reguliert werden kann, erfährt aktuell aufgrund seiner Bedeutung als einer der Hauptangriffspunkte für Anästhetika große Aufmerksamkeit in der Literatur.<sup>32,64,65</sup> Da der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor aufgrund verschiedener Kombinationen von bisher 19 verschiedenen identifizierten Untereinheiten an ein breites molekulares Spektrum binden kann,<sup>54</sup> ist beinahe für alle Anästhetika - außer für relativ niedermolekulare Narkosemittel wie Xenon<sup>66</sup> - eine starke agonistische Wirkung am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor beschrieben. In hoher Dosierung können manche Substanzen auch in Abwesenheit von GABA den Rezeptor direkt stimulieren.<sup>54</sup> Zusätzlich zu den synaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, deren Stimulation eine schnelle und kurzfristig auftretende „phasische Inhibition“ bewirkt, existieren auch extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, welche die lang anhaltende sog. „tonische Inhibition“ vermitteln.<sup>54</sup>

Rezeptoren an glutamatergen Synapsen gliedern sich in non-NMDA- und NMDA-Rezeptoren,<sup>67</sup> wobei non-NMDA-Rezeptoren die schnelle Komponente der postsynaptischen Exzitation bewirken und in relativ geringem Maße sensitiv gegenüber Anästhetika sind. Die langsame Transmission an der Synapse wird dagegen über NMDA-Rezeptoren reguliert, die sowohl prä-, intra-, und postsynaptisch lokalisiert sein können. Sie weisen – ähnlich wie beim GABA<sub>A</sub>-Rezeptorsystem – aufgrund der Vielfalt an molekularstrukturellen Untereinheiten eine hohe Variabilität des kinetischen und pharmakologischen Wirkspektrums auf<sup>67</sup> und stellen dadurch auch für viele anästhesiologisch wirksame Substanzen eine wichtige Bindungsstelle dar.<sup>68</sup>

Für viele Anästhetika ist jedoch der genaue Wirkmechanismus noch immer Gegenstand kontroverser Diskussion.<sup>32,54,69,70</sup>

Vor wenigen Jahren wurde gezeigt, dass die Verabreichung von Substanzen mit glutamatergen und/oder GABAergen Wirkmechanismen (z. B. Neuroleptika und Barbiturate) während der Synaptogenese zu einer ausgeprägten Verstärkung neuronaler Apoptosevorgänge im neonatalen Gehirn von Ratten führen kann.<sup>71-73</sup> Vergleichbare Eigenschaften besitzt auch Ethanol, eine Substanz, die über beide erwähnten Mechanismen wirkt. In diesem Fall ist das klinische Korrelat der zerebralen Schädigung durch Ethanol das Fetale Alkohol-Syndrom.<sup>72</sup>

Aufgrund dieser Beobachtungen gingen Jevtovic-Todorovic et al. 2003 der Frage nach potentieller Neurotoxizität der üblicherweise verwendeten Medikamente in der Anästhesie nach. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine klassische Narkosekombination aus Midazolam, N<sub>2</sub>O und Isofluran zu einer ausgeprägten Neurodegeneration im neonatalen Gehirn von Ratten führte. Hierbei traten Apoptosen verstärkt insbesondere im Hippokampus auf, einer Region, der eine große Bedeutung bei kognitiven Prozessen zukommt. Nach der Narkose im Neugeborenenalter konnten bei den erwachsenen Tieren Defizite im Lernverhalten nachgewiesen werden.<sup>74</sup>

Histologische Untersuchungen am Gehirn von neugeborenen Ratten haben gezeigt, dass auch 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von Propofol eine signifikant erhöhte Apoptoserate zu zählen war.<sup>75,76</sup> In einem vergleichbaren Versuchsdesign mit dem Benzodiazepin Diazepam konnten ebenfalls neurodegenerative Effekte hervorgerufen werden,<sup>77</sup> während Sevofluran keine zusätzlichen Apoptosen zu induzieren schien<sup>75</sup>.

#### **1.4. Verhaltenstests zur Neurotoxizität**

Neben der akut nachweisbaren Schädigung auf zellulärer Ebene ist die Frage nach langfristigen, funktionellen Defiziten im Verlauf nach neonataler Anästhetika-Exposition interessant. Aussagekräftige klinische Langzeitstudien zur Frage der Neurotoxizität von Anästhetika bei der Anwendung im Früh- und Neugeborenenalter gibt es nicht. Die bisher durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen zu diesem Thema lassen jedoch ein neurotoxisches Potential einzelner Anästhetika oder ihrer Kombinationen vermuten.<sup>74,76</sup>

Die vorliegende Studie soll deshalb mit Hilfe umfangreicher Verhaltenstests mit Ratten die Hypothese prüfen, ob sich nach neonataler Anwendung aktuell verwendeter anästhetischer Substanzen bleibende Verhaltensdefizite bzw. -auffälligkeiten ausbilden können. Um Auswirkungen dieser Art aufzudecken, wurden die neonatal behandelten Tiere ab einem Alter von sieben Wochen den Verhaltenstests unterzogen.

Da in den in Abschnitt 1.3. zitierten Untersuchungen insbesondere in hippokampalen Hirnarealen erhöhte Apoptoseraten detektiert wurden, waren korrelierende Verhaltensauffälligkeiten entsprechend der Funktion dieser Hirnregion in den Bereichen Lernen, Gedächtnis und Angstverhalten zu erwarten.

Lernen und Gedächtnis sind im Tierexperiment nicht leicht voneinander abzugrenzen, da sie untrennbare Teile ein und desselben Prozesses sind.<sup>78</sup> Eine Form des Lernens ist die Aufnahme von Information über die Sinnesorgane, die Speicherung dieser Information im Gehirn und die Abrufung des Gespeicherten bei Bedarf (sog. deklaratives / explizites Gedächtnis).<sup>79</sup>

Eine weitere Form des Lernens ist die Habituation, die eine Form des sog. implizierten, nicht-deklarativen (unterbewussten) Lernens darstellt. Habituation bedeutet Gewöhnung an einen sich wiederholenden Reiz, sodass die Reaktion darauf allmählich immer schwächer wird. Man spricht auch von einer erlernten Verhaltensunterdrückung.<sup>80</sup>

In den vielen entwickelten Lern- und Gedächtnistests lassen sich jedoch meist nur einzelne Aspekte kognitiver Leistungen untersuchen und beobachten.

Zusätzlich wurde die Motorik der Tiere untersucht, da sie ebenfalls das Resultat eines komplexen neuronalen Zusammenspiels darstellt, welches durch neuronale Defizite auf verschiedenen Ebenen der Reizweiterleitung und -verarbeitung maßgeblich beeinträchtigt werden kann und sich leicht in Verhaltenstests überprüfen lässt.

Anhand der Leitlinien der OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) zur Testung von Neurotoxizität<sup>78</sup> wurden Verhaltensversuche ausgewählt, die eventuell vorhandene neuropsychologische Auswirkungen einer Schädigung des Hippokampus detektieren können. Es wurde ein Versuchsprogramm durchgeführt, das mittels einfacher Tests ein breites Spektrum an Verhaltensweisen erfassen konnte. Es handelte sich hierbei um zwei Lern- und Gedächtnistests, die insbesondere die Prüfung von räumlichem Lernen (im *Morris-Water-Maze-Test*) und Habitualionslernen (im *Hole-Board-Test*) miteinbezogen, sowie um zwei motorische

Tests. In diesen konnten die motorische Aktivität der Tiere in Ruhe d. h. ohne Beeinflussung und in gewohnter Umgebung (im *Home-Cage-Activity-Test*) sowie ihr Angstverhalten und ihre motorische Aktivität in einer für sie ungewohnten Umgebung (im *Open-Field-Test*) beurteilt werden.

### **1.5. Fragestellung**

Die neonatale Anwendung von Anästhetika ist insbesondere hinsichtlich ihrer Langzeiteffekte bislang nur unzureichend untersucht. Wie in Kapitel 1.3. dargelegt, gibt die aktuelle Literatur Anlass zu der Vermutung, dass einige der aktuell verwendeten Medikamente zur Anästhesie von Früh- und Neugeborenen potentiell neurodegenerative Auswirkungen auf das Gehirn haben könnten.<sup>74,76</sup>

In der vorliegenden Studie wurde deshalb folgende Fragestellung tierexperimentell untersucht:

Gibt es neben den in der Literatur beschriebenen neurodegenerativen Effekten langfristige neuropsychologische Konsequenzen hinsichtlich Motorik, Lernverhalten, Gedächtnisleistung und Ängstlichkeit durch eine neonatale Anästhesie mit Propofol oder Sevofluran als Einzelsubstanz bzw. die Kombination beider Substanzen mit Midazolam?

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1. Versuchstiere

Für die Experimente wurden männliche und weibliche Wistar-Ratten vom BgVV (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin) und von den FEM (Forschungseinrichtungen der Experimentellen Medizin – Charité, Universitätsmedizin Berlin) verwendet. Die trächtigen Muttertiere wurden in die tierexperimentelle Einrichtung verbracht und die Geburt erfolgte dort nach Akklimatisierung. Pro Wurf wurden 10-25 Jungtiere geboren.

Am sechsten Lebenstag fand die Narkosebehandlung statt (siehe Abschnitt 2.2.). Dabei wurden Kontrolltiere und behandelte Tiere aus demselben Wurf entnommen. So entstand für jede Gruppe von behandelten Tieren eine jeweilige Kontrollgruppe aus deren Geschwistern, wodurch eventuell vorhandene genetisch bedingte Verhaltensunterschiede reduziert wurden.

Kontrolltiere und behandelte Tiere wurden dauerhaft mit Fellmarkierungen und ab dem 14. Lebenstag mit einer Ohrkerbe versehen. Mit einem Alter von 21 Tagen wurden die Tiere vom Muttertier getrennt und von nun an geschlechtergetrennt jeweils à vier bis sechs Tiere in Makrolon-Standardkäfigen Typ IV (40 cm x 60 cm x 25 cm) unter einem künstlichem Lichtregime mit der hellen Phase von 6.00 bis 18.00 Uhr gehalten. Kontrolltiere und behandelte Tiere wurden gemeinsam in einer Gruppe gehalten. Die Lichtintensität im Tierstall betrug im Mittel 200 Lux, die Raumtemperatur  $22 \pm 2$  °C und die relative Luftfeuchtigkeit  $55 \pm 5$  %.

Wasser und Standardpellets von Altromin® 1324 (Hannover, Deutschland) standen ad libitum zur Verfügung.

Die Durchführung der in dieser Arbeit vorgestellten Tierversuche wurde unter der Tierversuchsnummer G 0144/04 des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit in Berlin (LAGeTSi) genehmigt.

## 2.2. Verwendete Substanzen

Die Narkosen wurden als Mononarkose mit dem Injektionsanästhetikum Propofol oder dem inhalativen Anästhetikum Sevofluran oder in der 3-fach-Kombination zusätzlich mit dem Benzodiazepin Midazolam als Prämedikation durchgeführt. Zur Flüssigkeits- und Glucosesubstitution bzw. als Verdünnungsmittel wurde sog. „Päd-II-Lösung“ (Pädiatrische Elektrolytlösung 2) und 5%ige Glucose-Lösung eingesetzt (Tab. 1).

**Tab. 1: Verwendete Substanzen bei der neonatalen Anästhetika-Behandlung**

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Propofol</i> Propofol 1% (10mg/1ml) MCT Fresenius, Emulsion zur Injektion oder Infusion	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
<i>Sevofluran</i> Sevorane®	Abbott GmbH & Co. KG (Wiesbaden, Deutschland)
<i>Midazolam</i> Dormicum®	Hoffmann - La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
Pädiatrische Elektrolytlösung 2 (Zusammensetzung: Glucose Xylit 50 g/l, Na <sup>+</sup> 70 mmol/l, K <sup>+</sup> 18 mmol/l, Ca <sup>++</sup> 1,5 mmol/l, Mg <sup>++</sup> 2 mmol/l, Cl <sup>-</sup> 63,8 mmol/l, Acetat 26,5 mmol/l, Malat 2 mmol/l, Glycerohydrogenphosphat 5 mmol/l)	Fresenius Kabi Deutschland GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
<i>Glucose</i> Glucose-Lösung 5%	B.Braun Melsungen AG (Melsungen, Deutschland)

### 2.3. Behandlung der Tiere

Die neugeborenen Wistar-Ratten wurden am 6. Lebenstag entsprechend der nachfolgenden Schemata behandelt (vgl. Abb. 1-3). Dabei gab es drei Behandlungsgruppen und die entsprechenden Kontrolltiere:

1. Tiere mit Propofol-Narkose (n=23)
2. Tiere mit Sevofluran-Narkose (n=15)
3. Tiere mit einer Kombinationsnarkose aus Midazolam, Propofol und Sevofluran (n=13)

+ Kontrolltiere (für die Propofol-Gruppe: n=11, für die Sevofluran-Gruppe: n=14 und für die Kombinationsgruppe: n=15)

Propofol und Midazolam wurde intraperitoneal injiziert, wobei darauf geachtet wurde, dass durch Kopftieflage der Tiere während des Einstichs und durch Lokalisation der Einstichstelle im lateralen, kaudalen Bereich des Abdomens das Risiko einer Darmverletzung durch die Kanüle so weit wie möglich minimiert wurde.

Die Durchführung der inhalativen Anästhesie mit Sevofluran erfolgte in einer Inkubationskammer.

Als Vorbereitung zur Behandlung wurden die Tiere mit einem wasserfesten Marker auf dem Rücken nummeriert und gewogen.

Sowohl während der Mononarkosen mit Propofol und Sevofluran als auch während der Kombinationsnarkose wurde der Zustand eines jeden behandelten Tieres von Beginn der Narkose an bis zwei Stunden nach Beendigung der Anästhetika-Gabe bezüglich der Atemfrequenz, des Hautkolorits und der Spontanbewegungen visuell überwacht, alle 15 Minuten mit je 0-3 Punkten bewertet (vgl. Tab. 2) und dokumentiert. Das hierzu verwendete System zur Punktevergabe wurde auf der Basis empirisch gewonnener Daten aus Pilotversuchen entwickelt, um retrospektiv Aussagen über das Maß der Narkosetiefe zu den jeweiligen Zeitpunkten der Behandlung treffen zu können. Bei der Propofol-Narkose, die ohne Inkubationskammer durchgeführt wurde und somit die Versuchstiere jederzeit frei zugänglich waren, wurde zusätzlich die motorische Reaktion auf eine Überkopfstellung bzw. einen Schmerzreiz (bei fehlenden Spontanbewegungen) in die Punktevergabe miteinbezogen.

Für die Dauer der Behandlung aller Tiere wurde dabei ein durchschnittliches Maß der Narkosetiefe entsprechend einem Punktebereich zwischen 2,5 und 1 angestrebt.

**Tab. 2: Punkte-System zur Überwachung der neugeborenen Tiere während der Narkose**

<b>Punkte:</b>	<b>Atemfrequenz</b>	<b>Hautkolorit</b>	<b>motorische Reaktion</b>
<b>3</b>	> 80/min	rosig	spontan vorhanden
<b>2</b>	60 - 80/min	rosig	spontan <sup>A</sup> / bei Überkopfstellung <sup>B</sup> vorhanden
<b>1</b>	40 - 60/min	rosig	nicht <sup>A</sup> / bei Schmerzreiz <sup>B</sup> vorhanden
<b>0</b>	< 40/min	blass	bei Schmerzreiz <sup>B</sup> nicht vorhanden

A: für Sevofluran- und Kombinationsnarkose (mit Inkubationskammer) B: für Propofol-Anästhesie (ohne Inkubationskammer)

Die Kontrolltiere wurden ebenfalls für die gesamte Dauer der Narkose von der Mutter getrennt. Um eine Hypothermie der Tiere zu verhindern, befanden sich alle Tiere während der gesamten Dauer der Behandlung auf einem Wärmekissen (ca. 30 °C).

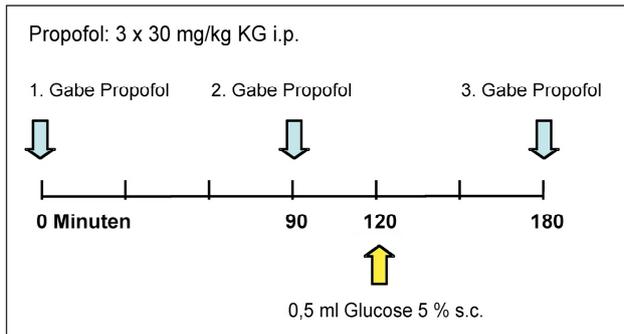
Alle Tiere (auch die Kontrolltiere) erhielten bei der Propofolnarkose zwei Stunden bzw. bei der Sevofluran- und Kombinationsnarkose drei Stunden nach Trennung vom Muttertier 0,5 ml 5%ige Glucose-Lösung als subkutane Injektion, um Hypoglykämie und Dehydratation vorzubeugen.

Nach Beendigung der Narkose wurden die Tiere zusammen mit der Kontrollgruppe zum Muttertier zurückgesetzt, sobald sie eine rege motorische Aktivität in Verbindung mit einem normalen Muskeltonus zeigten (etwa zwei Stunden nach Beendigung der Anästhetika-Gabe).

### **2.3.1. Anästhesie mit Propofol**

Den neugeborenen Tieren wurde Propofol dreimal im Abstand von 90 Minuten (blaue Pfeile in Abb. 1) mit einer Dosis von 30 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert (Kanüle 0,5 x 16mm). Um die kleinen Wirkstoffmengen applizieren zu können wurde Propofol 1% im Verhältnis 1:5 mit Päd-II-Lösung verdünnt und emulgiert.

Alle Tiere bekamen zwei Stunden nach Trennung vom Muttertier 0,5 ml 5%ige Glucose-Lösung subkutan in eine Nackenfalte injiziert (vgl. Abb. 1: gelber Pfeil). Nach Beendigung der Narkosewirkung wurden die behandelten Tiere mit den Kontrolltieren in den gemeinsamen Käfig zurück zum Muttertier gesetzt.



i.p. = intraperitoneal, KG = Körpergewicht, s.c. = subkutan

**Abb. 1: Zeitliches Behandlungsschema der Anästhesie mit Propofol.**

Es erfolgte dreimal die Gabe von Propofol (blaue Pfeile) im Abstand von je 90 min (Dosierung: siehe Abbildung). Nach 120 min erhielten alle Tiere (auch die Kontrolltiere) eine subkutane Injektion mit Glucose-Lösung (gelber Pfeil).

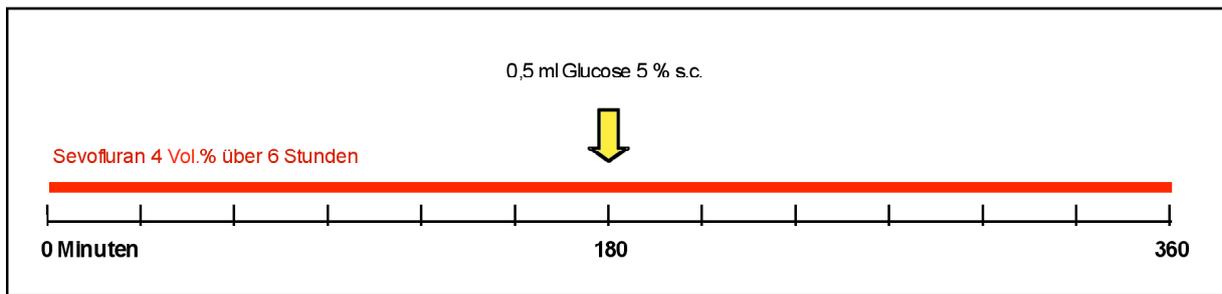
**2.3.2. Anästhesie mit Sevofluran**

Für die sechsstündige Mononarkose mit Sevofluran wurden die neugeborenen Ratten in eine luftdicht verschlossene Inkubationskammer (Billups-Rothenburg Inc., Del Mar, Kalifornien, USA) verbracht. Abbildung 2 zeigt das zeitliche Behandlungsschema.

Über ein Narkosegerät mit angeschlossenem Vapor (F. Stephan GmbH Medizintechnik, Gackenbach) mit einem Frischgaszufluss von 0,2-0,4 l/min ( $FiO_2$  0,21) wurde Sevofluran mit einer angestrebten inspiratorischen Narkosegas-Konzentration von 3-5 Vol% eingeleitet. Die Gasausleitung erfolgte passiv. Gaskonzentrationen in der Kammer (Kohlendioxid, Sauerstoff, Sevofluran) wurden kontinuierlich gemessen (Capnomac, Datex-Ohmeda, Duisburg). Eine innerhalb der Kammer gemessene Kohlendioxid-Konzentration von 0,5 Vol% wurde nicht überschritten.

Die angestrebte Sevoflurankonzentration von 3-5 Vol% wurde in Pilotversuchen dahingehend ermittelt, dass Asphyxie und Hypoventilation vermieden, gleichzeitig aber eine tiefe Narkose aufrechterhalten wurde.

Drei Stunden nach Beginn der Behandlung erhielten sowohl die behandelten Tiere als auch die Tiere der Kontrollgruppe 0,5 ml 5%ige Glucose-Lösung als subkutane Injektion in eine Nackenfalte (gelber Pfeil in Abb. 2). Hierfür wurde die Inkubationskammer kurz geöffnet und die Tiere herausgenommen.



s.c. = subkutan

**Abb. 2: Zeitliches Behandlungsschema der Anästhesie mit Sevofluran.**

Das rote Band über der Zeitleiste markiert die 6-stündige Inhalationsnarkose mit Sevofluran. Drei Stunden nach Beginn der Behandlung erhielten alle Tiere (auch die Kontrolltiere) eine subkutane Injektion einer 5%igen Glucose-Lösung (gelber Pfeil).

Die Narkosetiefe wurde über Atemfrequenz, Hautkolorit und Spontanbewegungen der Tiere kontrolliert (vgl. Abschnitt 2.3.), da eine Beurteilung der Reaktion auf Schmerzreize nur unter Unterbrechung der Gaszufuhr und damit Unterbrechung der Narkose möglich gewesen wäre.

**2.3.3. Kombinationsnarkose mit Midazolam, Propofol und Sevofluran**

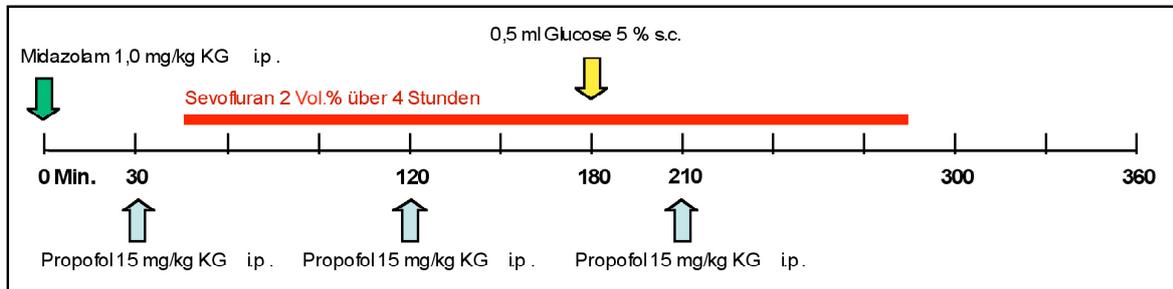
Um Asphyxie und Hypoventilation während der Kombinationsnarkose zu vermeiden, musste die Propofol-Dosis im Vergleich zur Mononarkose halbiert und die Sevofluran-Applikationsdauer und -konzentration reduziert werden.

Wie in Abbildung 3 als grüner Pfeil dargestellt, erhielten die neugeborenen Tiere zunächst eine intraperitoneale Injektion Midazolam mit einer Dosis von 1 mg/kg KG (Kanülengröße: 0,5 x 16 mm). Um die kleinen Wirkstoffmengen applizieren zu können, wurde Midazolam 0,5% (Hoffmann - La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) im Verhältnis 1:50 mit Päd-II-Lösung verdünnt.

Nach 30 Minuten erfolgte die erste intraperitoneale Gabe von Propofol (Propofol 1% im Verhältnis 1:10 mit Päd-II-Lösung verdünnt) mit einer Dosis von 15 mg/kg KG.

Nach weiteren 15 Minuten wurden die Tiere in die Inkubationskammer (Billups-Rothenburg Inc., Del Mar, Kalifornien, USA) gesetzt (Aufbau: siehe 2.3.2.), und die vierstündige Sevofluran-Narkose mit einer angestrebten expiratorischen Gaskonzentration von 2 Vol% durchgeführt (in Abb. 3 als rotes Band dargestellt). Zwei weitere Propofol-Injektionen erfolgten während der Sevofluran-Narkose im Abstand von

je 90 Minuten (blaue Pfeile in Abb. 3). Diese waren ebenso wie die subkutane Glucose-Gabe von 0,5 ml 5%iger Lösung nach 180 Minuten (Abb. 3: gelber Pfeil) mit einem Öffnen der Inkubationskammer und der Herausnahme der narkotisierten Tiere verbunden.



i.p. = intraperitoneal, KG = Körpergewicht, s.c. = subkutan

**Abb. 3: Behandlungsschema mit der Kombination: Midazolam, Propofol und Sevofluran.**

Zunächst erfolgte eine Midazolam-Gabe zu Beginn der Behandlung (grüner Pfeil). Nach 30 min wurde die erste Dosis Propofol gefolgt von zwei weiteren Propofol-Gaben im Abstand von je 90 min (blaue Pfeile) verabreicht. Das rote Band über der Zeitleiste (Minute 45 – 285) entspricht einer vierstündigen Inhalationsnarkose mit Sevofluran. Drei Stunden nach Beginn der Behandlung erhielten alle Tiere incl. der Kontrolltiere Glucose-Lösung als subkutane Injektion (gelber Pfeil).

## 2.4. Verhaltenstests

Zur Detektion von Verhaltensauffälligkeiten nach Anästhetika-Behandlung im Neugeborenenalter wurden bei den dann adulten Tieren ab der 7. Lebenswoche vier Verhaltenstests durchgeführt und folgende Eigenschaften bzw. Fähigkeiten darin beurteilt (in Klammern jeweils der Zeitpunkt der Testdurchführung):

### Motorische Tests:

*Open-Field-Test*: motorische Aktivität und Angstverhalten in einer für das Versuchstier ungewohnten Umgebung (7. Woche)

*Home-Cage-Activity-Test*: motorische Ruhe-Aktivität (12. Woche)

### Lern- und Gedächtnistests:

*Morris-Water-Maze-Test*: räumliches Lernen (8.-9. Woche)

*Hole-Board-Test*: Habituationlernen (11. Woche)

Männliche und weibliche Tiere wurden dabei getrennt untersucht, um eventuell vorhandene geschlechtsspezifische Unterschiede im Verhalten berücksichtigen zu können.

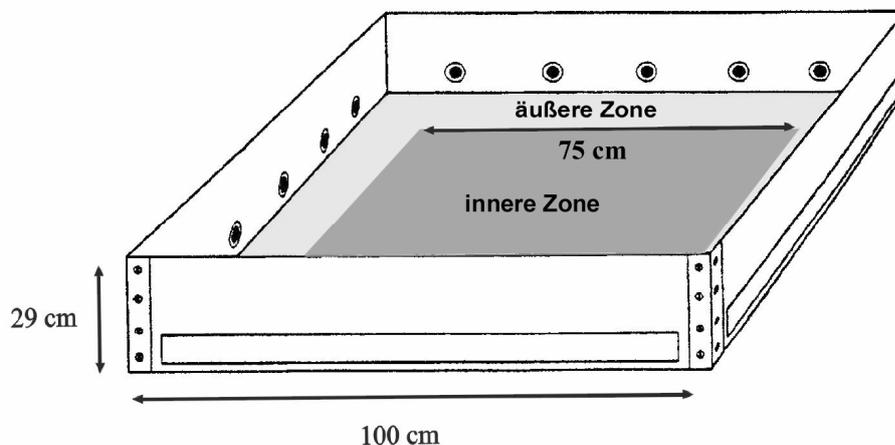
Jeweils zu Beginn der Tests wurde das Körpergewicht der Tiere mit einer digitalen Waage (MC1 Laboratory LC 2200, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) gemessen.

### 2.4.1. Der *Open-Field-Test*

Der *Open-Field-Test* dient der Beurteilung von motorischen Funktionen und Ängstlichkeit. Mit ihm kann ein breites Spektrum an Verhaltensweisen wie Lokomotion und Erkundungsverhalten untersucht werden. Er basiert auf Verhaltensstudien von Hall aus dem Jahre 1934, der die Versuchstiere in einer weiträumigen, quadratischen und nach oben offenen Box beobachtete.<sup>81</sup> Die Bewertung der Lokomotion kann durch Messung der insgesamt zurückgelegten Wegstrecke erfolgen. Um die sog. vertikale Motorik d. h. das Aufrichteverhalten der Tiere zu beurteilen, werden die sog. *Rearings*

(= Aufrichten der Tiere auf die Hinterbeine) gezählt. Ängstlichkeit scheint dabei häufig mit einer verminderten Lokomotion einherzugehen.<sup>82,83</sup> So meiden Tiere mit einem höheren Angstniveau die offene Fläche und bewegen sich hauptsächlich in der Außenzone entlang der schützenden Wände (sog. Thigmotaxis).<sup>84,85</sup> Mutigere Tiere hingegen sind generell neugieriger, betreten öfter den inneren Bereich des *Open Fields* und weisen längere Aufenthaltszeiten dort auf.<sup>86</sup> Misst man die Zeit, welche die Tiere im Inneren bzw. nahe der Umrandung des *Open Fields* verbringen, so lässt sich der *Open-Field-Test* auch angstassoziiert bewerten.<sup>87</sup>

Das *Open Field* hat eine quadratische Grundfläche von 100 cm x 100 cm, ist von vier 29 cm hohen Wänden umgeben und befindet sich in einer schallgeschützten Untersuchungskammer, damit das Tier während des Versuchs in Ruhe ist. Über dem *Open Field* ist eine Kamera angebracht, die mit dem Computer außerhalb des Raumes verbunden ist. Damit sich die weiße Ratte optisch vom Untergrund abhebt und so vom Computer detektiert werden kann, besteht die Grundfläche aus schwarzem PVC, die Wände aus weiß gestrichenem Holz.



**Abb. 4:** *Open Field*: schematische Darstellung. Die quadratische Grundfläche des *Open Fields* ist imaginär in eine äußere und eine innere Zone (dunkelgrau unterlegt) gegliedert. Diese Unterteilung existiert nur im Computer und ist nicht an der Apparatur erkennbar.

Die Apparatur wurde mit mehreren indirekten Lichtquellen ausgeleuchtet, so dass in der Mitte des *Open Fields* eine Lichtintensität von 180 Lux erreicht wurde.

Wie in Abbildung 4 dargestellt, wurde zur Auswertung des Tests bezüglich des Angstverhaltens der Tiere die Grundfläche des *Open Fields* (100 x 100 cm) am

Computer in eine imaginäre innere (75 x 75 cm) und eine äußere Zone getrennt. Ein Vermeiden der inneren Zone wurde als ängstliches Verhalten gewertet.

Zu Versuchsbeginn wurden die Tiere in die Mitte der Grundfläche gesetzt und für fünf Minuten im *Open Field* beobachtet. Es wurden folgende Parameter erfasst:

1. Der innerhalb von fünf Minuten zurückgelegte Wegstrecke [m]
2. Die Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine (*Rearings*) [n]
3. Die Anzahl der Eintritte in die innere Zone [n]
4. Die Zeit des Aufenthalts in der inneren Zone [s]

#### **2.4.2. Der *Home-Cage-Activity-Test***

Beim *Home-Cage-Activity-Test* wurden die Versuchstiere im Vergleich zu anderen Tests a) über einen sehr langen Zeitraum (72 h) und b) in Ruhe d. h. ohne Beeinflussung in gewohnter Umgebung beobachtet. Für die Durchführung des Tests wurden sie in Einzelkäfige (Makrolon-Standardkäfige Typ II) gesetzt, auf denen je ein mit dem Computer verbundener Infrarot-Sensor angebracht war.

Mit Hilfe dieser Sensoren konnte die Aktivität der einzelnen Tiere durch Erkennung eines Körperwärmebilds und dessen Bewegung gemessen werden. Auch kurze Bewegungen im Bereich von Millisekunden und *Rearings* (Aufrichten auf die Hinterbeine) wurden durch eine Weitwinkelfunktion der Sensoren hierbei erfasst.

Da diese Technik unabhängig von Licht funktioniert d. h. Messungen auch in Dunkelheit durchgeführt werden können, konnte im *Home-Cage-Activity-Test* auch der Tag-Nacht-Rhythmus untersucht werden. Ratten sind nachtaktiv, weshalb das Aktivitätsniveau üblicherweise in der Dunkelphase höher liegt als in der Hellphase (Raumbeleuchtung von 6.00 bis 18.00 Uhr). Da Infrarot-Strahlung die Kunststoff-Wände der Käfige nicht durchdringt, interferierten die Sensoren benachbarter Käfige nicht miteinander.

Die Aktivität der Tiere wurde über 72 Stunden gemessen. Die sensorisch erfassten Zählerpunkte wurden dabei als Summe in je 15-minütigen Intervallen mit Hilfe des Computer-Programms *InfraMot*, Version 1.2 (TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland) aufgezeichnet.<sup>88</sup>

Während dieser Zeit wurde darauf geachtet, dass die Tiere nicht gestört wurden.

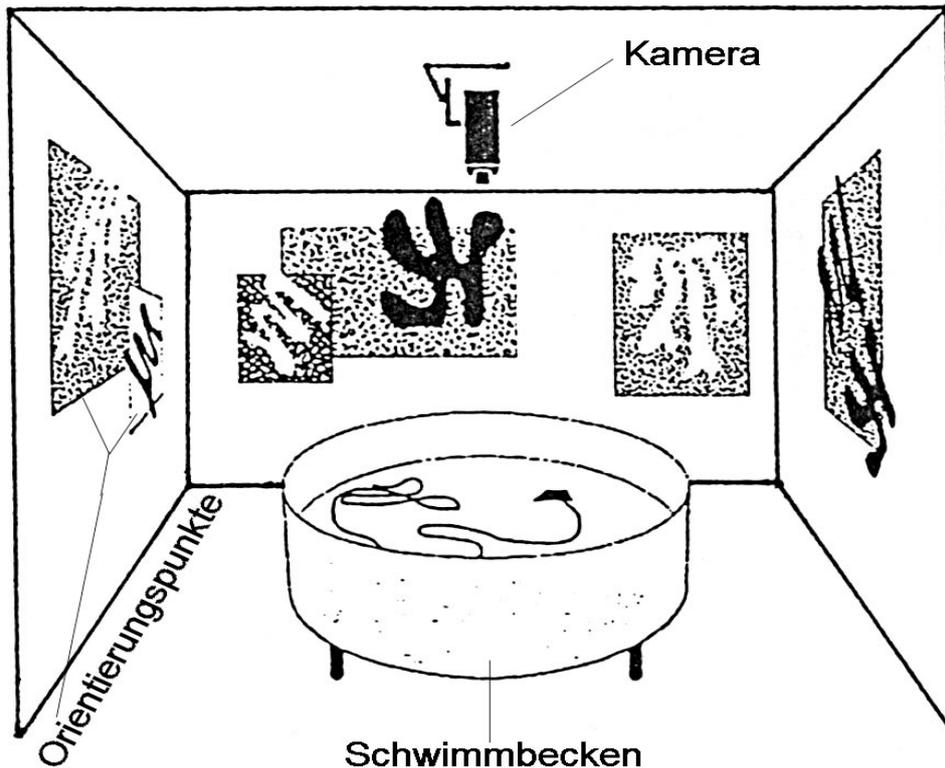
### 2.4.3. Der *Morris-Water-Maze*-Test

Der *Morris-Water-Maze*-Test ist ein Lerntest, mit dem neben Lernen und Gedächtnis auch analytisches Vermögen, Verhaltensstrategien und räumliches Vorstellungsvermögen erfasst und beurteilt werden können.<sup>89</sup> Es ist derzeit das meistgenutzte Modell, um Lern- und Gedächtnisfähigkeiten bei Mäusen und Ratten zu testen und wurde von G. M. Morris entwickelt<sup>90</sup>. Es handelt sich hierbei um einen räumlichen Navigationstest, bei dem das Tier schwimmend eine nicht sichtbare Plattform finden muss, um aus dem Wasser zu gelangen. Nagetiere sind höchst motiviert, möglichst schnell und auf direktem Wege das Wasser zu verlassen.

Das *Morris Water Maze* besteht aus einem runden, 60 cm tiefen Becken mit einem Durchmesser von 200 cm, das zu einer Höhe von 42 cm mit Wasser (Temperatur  $19 \pm 2$  °C) gefüllt ist. An der Wand sind aus der Perspektive des schwimmenden Tieres oberhalb des Beckenrandes Symbole (Quadrat, Dreieck, Kreis) angebracht, die dem Versuchstier die Orientierung im Raum erleichtern sollen. Über dem Becken befindet sich eine Videokamera (vgl. Abb. 5), die mit einem Computer verbunden ist. Mit Hilfe einer entsprechenden Software kann so die Schwimmstrecke der Ratte aufgezeichnet, gespeichert und ausgewertet werden.

Die Plattform (10 cm x 10 cm) ist höhenverstellbar und besteht aus transparentem Plexiglas, sodass sie für die schwimmenden Tiere im Wasser unsichtbar erscheint.

Der Untersuchungsraum war einheitlich mit 180 Lux mittels Leuchtstoffröhren ausgeleuchtet (gemessen über dem Becken).



**Abb. 5:** Schematischer Aufbau des *Morris Water Maze* (in Anlehnung an Wolfer et al., 1998<sup>91</sup>). Das runde Schwimmbecken befindet sich in der Mitte eines (quadratischen) Raumes, dessen Wände mit Orientierungshilfen versehen sind. Zentriert über dem Schwimmbecken ist eine Videokamera angebracht, die über eine Verbindung mit einem Computer verfügt. Mit Hilfe entsprechender Software kann so die Schwimmstrecke der Ratte aufgezeichnet, gespeichert und ausgewertet werden.

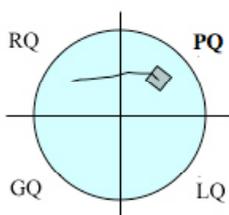
Zur Durchführung und Auswertung des Tests wird die runde Grundfläche des Beckens in vier gleichgroße, imaginäre Quadranten unterteilt (vgl. Abb. 6: PQ, LQ, GQ und RQ). Am ersten Tag wurden die Versuchstiere für 90 Sekunden schwimmen gelassen, um herauszufinden, welcher Quadrant ohne Plattform bevorzugt bzw. gemieden wird (Habituation, Tag 1). Wie in Abbildung 6 auf der linken Seite dargestellt ist, wurden die Tiere daraufhin täglich in jeweils drei Durchläufen à 90 Sekunden mit Plattform über acht Tage hinweg getestet (*Probe Trials*, Tag 2 – 9). Für jedes Tier wurde die Plattform in der Mitte eines imaginären Quadranten, der weder bevorzugt noch gemieden worden ist, 1 cm unterhalb der Wasseroberfläche aufgestellt. Die Plattform verbleibt während der gesamten acht Tage für jedes Tier im jeweiligen Quadranten stehen. Die Anzahl der Tiere, für welche die Plattform in einem bestimmten Quadranten stand, war ausgeglichen. Jeden Tag wurden die Tiere von drei Startpunkten aus ins Wasser gelassen: jeweils in der Mitte des Quadranten links, gegenüber und rechts vom

Plattformquadranten (in Abb. 6 je mit LQ, GQ und RQ gekennzeichnet). Nach Erreichen der Plattform durften die Tiere 30 Sekunden dort verweilen, wurden dann aus dem Wasser genommen und eine Minute in einen Käfig unter eine Wärmelampe gesetzt, bevor mit dem nächsten Durchlauf begonnen wurde. Erreichte ein Tier innerhalb von 90 Sekunden die Plattform nicht, so wurde es manuell auf die Plattform gesetzt, wo es 30 Sekunden sitzen durfte. Stets wurden die Zeit [s] und die geschwommene Strecke bis zum Erreichen der Plattform mit Hilfe der PC-Software *VideoMot 2* (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) gemessen bzw. aufgezeichnet. Von einem Lernerfolg wurde gesprochen, wenn die benötigte Zeit spätestens an Tag 4 signifikant kürzer als an Tag 2 war. Die in Abbildung 6 A gezeichnete Linienführung zur Plattform hin entspricht in etwa der zielgerichteten Schwimmroute eines gut lernenden Tieres nach ca. zwei bis fünf Versuchstagen.

Zur Überprüfung des Lernerfolgs wurde am zehnten Tag (*Spatial Probe*) die Plattform entfernt. Wie in Abbildung 6 auf der rechten Seite zu sehen ist, wurden die Tiere diesmal gegenüber des ursprünglichen Plattformquadranten ins Wasser gesetzt. Es wurde die Zeit gemessen, die in den jeweiligen Quadranten geschwommen bzw. gesucht wurde. Tiere, die während der Tage 2 bis 9 gut gelernt haben, suchen bei der *Spatial Probe* vornehmlich dort nach der Plattform, wo sie sich vorher befunden hat, nämlich im Quadrant PQ. Als Beispiel hierfür dient die gezeichnete Schwimmstrecke in Abbildung 6 B).

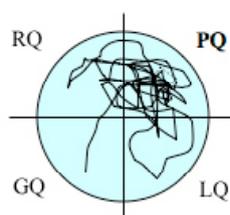
#### A. Place version

nicht sichtbare Plattform, 3 Durchläufe à 90 s  
für 8 Tage



#### B. Spatial probe

ohne Plattform, 1 Durchlauf à 90 s



**Abb. 6: Quadrantenaufteilung des Morris Water Maze.**

Für die Auswertung des Tests wurde die Grundfläche des *MWM* in vier imaginäre Quadranten (PQ = Plattformquadrant, LQ = linker Quadrant, GQ = gegenüberliegender Quadrant und RQ = rechter Quadrant) aufgeteilt. Die in A gezeichnete Linienführung zur Plattform hin entspricht in etwa der zielgerichteten Schwimmroute eines gut lernenden Tieres nach ca. 3-5 Tagen. Die gezeichnete Schwimmstrecke in B ist beispielhaft für die *Spatial Probe* (ohne Plattform), da hier das Tier vornehmlich dort nach der Plattform sucht, wo sie sich vorher befunden hatte, nämlich im Quadrant PQ.

#### 2.4.4. Der *Hole-Board*-Test

Mit diesem Test können die gerichtete Exploration, die Lokomotion (zurückgelegte Strecke pro Zeit) sowie auch das Habituationlernen beurteilt werden,<sup>92</sup> wenn das Tier an zwei aufeinander folgenden Tagen auf dem *Hole Board* beobachtet wird.

Das *Hole Board* ist eine quadratische Apparatur mit einer Grundfläche von 50 x 50 cm, in der sich das Versuchstier frei bewegen kann. Es ist von vier 38 cm hohen Wänden umgeben und besteht aus schwarzem PVC.

Auf dem Boden befinden sich in gleichmäßiger Anordnung 16 gleichgroße Löcher im Abstand von 10 cm. Die Löcher haben einen Durchmesser von 2,5 cm, sodass das Tier (aus Neugier) seinen Kopf hindurch stecken kann (= „*Nose poke*“).

Die Abnahme der Lokomotion sowie der sog. *Rearings* (Aufrichten des Tieres auf die Hinterbeine, vgl. *Open-Field*-Test) und *Nose pokes* von Tag 1 zu Tag 2 werden dann als Habituation gewertet.<sup>93,94</sup>

Wie beim *Open-Field*-Test befindet sich die Apparatur in einem separaten kleinen Raum, damit das Tier während des Versuchs von äußeren Einflüssen optischer und akustischer Art geschützt ist. Über dem *Open Field* ist eine Kamera angebracht, die mit dem Computer außerhalb des Raumes verbunden ist.

Die Tiere wurden an zwei aufeinander folgenden Tagen jeweils 10 Minuten lang auf dem *Hole Board* beobachtet. Mit Hilfe des Computer-Programms *VideoMot 2, Version 5.39* (TSE Systems, Bad Homburg, Deutschland) wurde dabei gemessen:

1. Die Anzahl der *Nose pokes* [n]
2. Die innerhalb von 10 Minuten zurückgelegte Wegstrecke [m]
3. Die Anzahl des Aufrichtens auf die Hinterbeine (*Rearings*) [n]

## 2.5. Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde das PC-Programm *SigmaStat® 3.0* (Systat Software Inc., San Jose, Kalifornien, USA) in Verbindung mit dem Graphik-Programm desselben Herstellers (*SigmaPlot® 9*) verwendet. Die durchgeführten Tests zur statistischen Auswertung sind in Tabelle 3 aufgeführt:

Tab. 3: verwendete Tests zur statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Test auf Normalverteilung:	Kolmogorov-Smirnov-Test	
	bei normalverteilten Werten	Bei nicht normalverteilten Werten
<b>Open-Field-Test:</b>	t-Test (behandelte Tiere vs. Kontrolltiere)	Mann-Whitney Summationstest (behandelte Tiere vs. Kontrolltiere)
<b>Morris-Water-Maze-Test: (Place Version)</b>	1-Weg-Varianzanalyse mit wiederholten Messungen	-
<b>Morris-Water-Maze-Test: (Spatial Probe)</b>	1-Weg-Varianzanalyse ohne wiederholte Messungen, Holm-Sidak-Test (PQ vs. übrige Quadranten des <i>Water Maze</i> )	-
<b>Hole-Board-Test:</b>	t-Test für gepaarte Stichproben (Tag 1 vs. Tag 2)	Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test (Tag 1 vs. Tag 2)
<b>Home-Cage-Activity-Test:</b>	2-Wege-Varianzanalyse mit wiederholten Messungen	-
<b>Körpergewicht:</b>	t-Test (behandelte Tiere vs. Kontrolltiere)	-

Männliche und weibliche Tiere wurden zunächst getrennt untersucht. Da bei den Kontrolltieren eventuell zu erwartende geschlechtsspezifische Verhaltensunterschiede<sup>95,96</sup> jedoch nicht auftraten (siehe Kap. 3.2.5.), wurden die Ergebnisse beider Geschlechter zusammengefasst. Sie werden im folgenden Kapitel 3 jeweils als Mittelwerte mit den entsprechenden Standardfehlern vorgestellt.

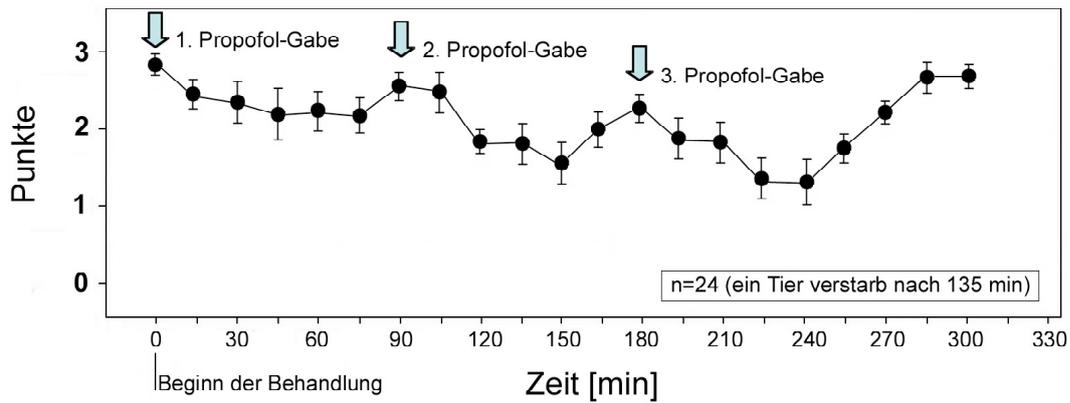
Die Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  definiert.

### **3. ERGEBNISSE**

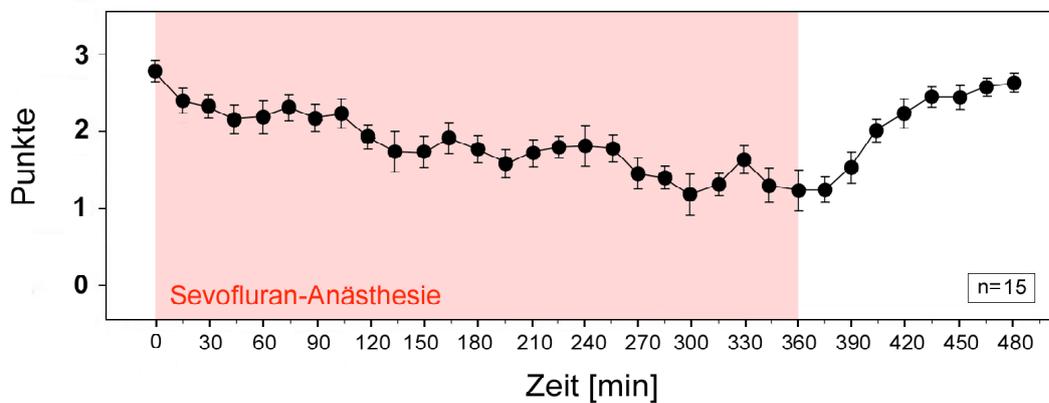
#### **3.1. Überwachung der Tiere während der Behandlung**

Mit Hilfe des in Kap. 2.3. aufgeführten Punkte-Systems (Tab. 2) wurden die neugeborenen Tiere während der Anästhetika-Behandlung überwacht. Abbildung 7 zeigt die durchschnittliche Punktevergabe als zeitliche Verlaufskurven während der jeweiligen Narkosedauer der Mononarkose mit Propofol und Sevofluran sowie der Kombinationsnarkose. Alle drei Gruppen bewegten sich bezüglich der durchschnittlich vergebenen Punkte auf der y-Achse stets in einem Bereich  $> 1$ . So sank das durchschnittliche Punkteniveau aller behandelten Tiere gegen Ende der jeweiligen Narkose auf knapp über 1 und erreichte bei den Tieren mit Mononarkose etwa zwei Stunden nach Beendigung der Anästhetika-Gabe wieder den Ausgangswert (vgl. Abb. 7 A und B). Tiere mit Kombinationsnarkose erholten sich ein wenig langsamer; der Ausgangswert wurde hier erst nach drei Stunden wieder erreicht (vgl. Abb. 7 C). Je ein Tier mit Propofol- bzw. Kombinationsnarkose verstarb während der Behandlung.

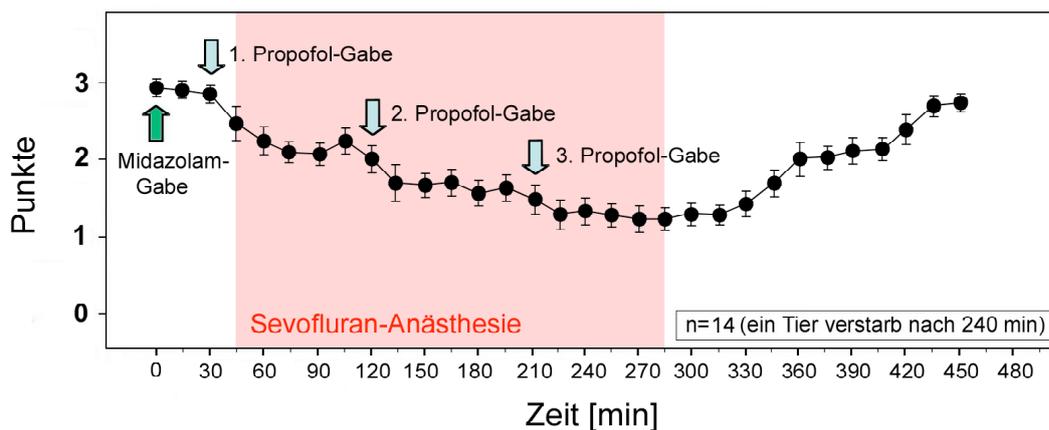
A.



B.



C.

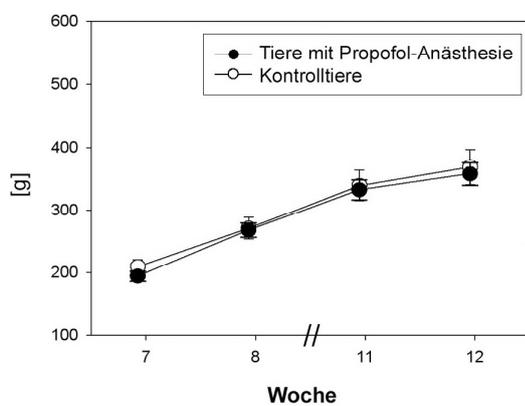


**Abb. 7 A-C: Überwachung der Tiere während der Anästhetika-Behandlung mittels Punktesystem.** Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der vergebenen Punktzahlen (schwarze Punkte) repräsentieren den Zustand der Tiere während der Narkose (vgl. Tabelle 2, Kap. 2.3.). Alle Tiere lagen im angestrebten Punktebereich zwischen 2,5 und 1. A: Anästhesie mit Propofol, B: Anästhesie mit Sevofluran, C: Kombinationsnarkose.

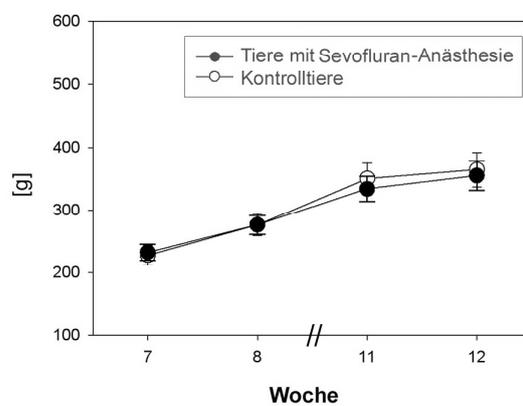
### 3.2. Körpergewichtsentwicklung

Bei der Kontrolle der Körpergewichtsentwicklung war 24 Stunden nach der Behandlung eine reduzierte Gewichtszunahme bei den behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten. Diese wurde jedoch bis zur siebten Lebenswoche ausgeglichen, sodass im Zeitraum der Tests (zwischen der 7. und der 12. Lebenswoche) keine Unterschiede mehr zwischen behandelten Tieren und Kontrolltieren zu verzeichnen waren (vgl. Abb. 8 A-C). Das Körpergewicht wurde jeweils unmittelbar vor Durchführung der Verhaltenstests in der siebten, achten, elften und zwölften Lebenswoche gemessen.

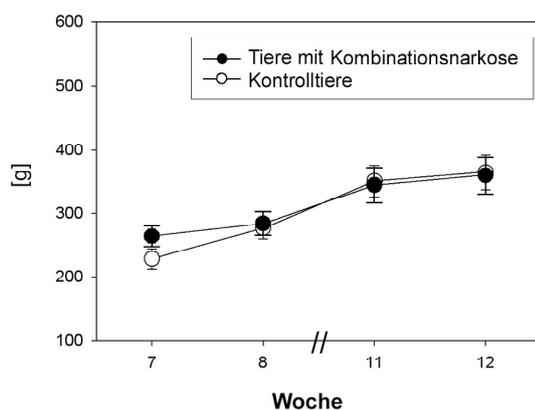
**A.**



**B.**



**C.**



**Abb. 8 A-C: Analyse der Körpergewichtsmessungen.**

Die Verlaufskurven zeigen die Körpergewichtsentwicklung der Tiere über fünf Wochen (Mittelwerte  $\pm$  SEM). Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten Tieren (schwarze Punkte) und Kontrolltieren (weiße Punkte) zu beobachten. A: Tiere mit Propofol-Anästhesie: n=23 (Kontrolltiere: n=11), B: Tiere mit Sevofluran-Anästhesie: n=15 (Kontrolltiere: n=14), C: Tiere mit Kombinationsnarkose: n=13 (Kontrolltiere: n=15).

### 3.3. Verhaltenstests

Für die Untersuchung der Auswirkung einer neonatalen Anästhesie auf das Verhalten adulter Tiere wurden die Ergebnisse der Verhaltenstests der behandelten Tiere mit denen der Kontrolltiere verglichen.

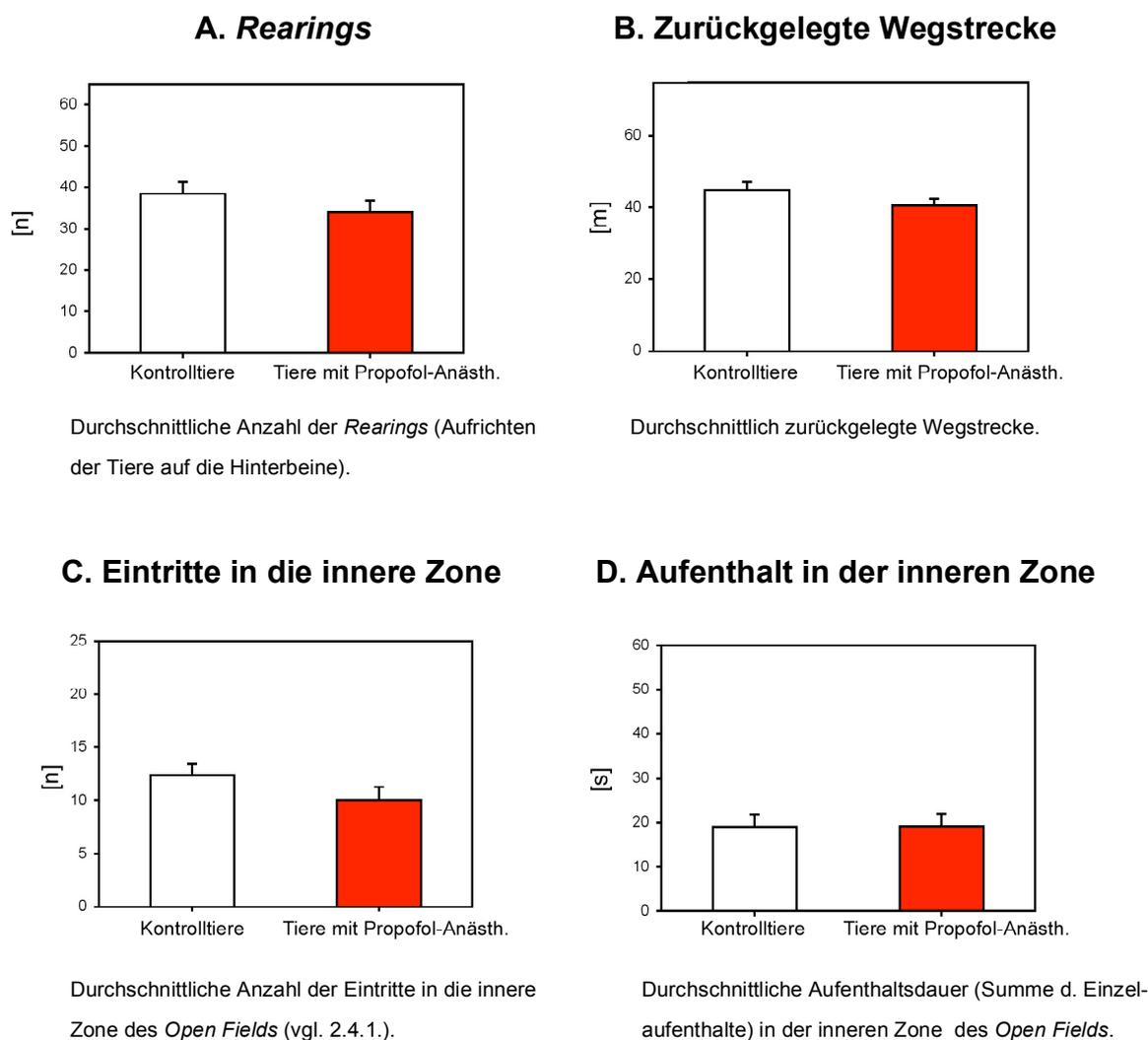
Die Testergebnisse werden im Folgenden nicht in der Reihenfolge ihrer chronologischen Durchführung vorgestellt, sondern nach der Einteilung in motorische Tests (*Open-Field*- und *Home-Cage-Activity*-Test) und Lern- und Gedächtnistests (*Morris-Water-Maze*- und *Hole-Board*-Test).

#### 3.3.1. *Open-Field*-Test

Die Ergebnisse des *Open-Field*-Tests gliedern sich in die vier Test-Kategorien „*Rearings*“, „Zurückgelegte Wegstrecke“, „Eintritte in die innere Zone“ und „Aufenthalt in der inneren Zone“. In den Abbildungen 9-11 sind die Mittelwerte der fünfminütigen Messungen mit den jeweiligen Standardfehlern als Säulendiagramme für die Kontrollgruppe in weiß und für die behandelten Tiere in rot dargestellt.

##### 3.3.1.1. Tiere mit Propofol-Anästhesie

Bei der Untersuchung der Tiere mit neonataler Propofol-Anästhesie ergaben sich in keiner der vier gemessenen Testkategorien signifikante Unterschiede zwischen behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Ein behandeltes Tier musste aus der Wertung genommen werden, da es über die Wand der Apparatur aus dem Versuchsfeld kletterte. Alle Messwerte waren normalverteilt.



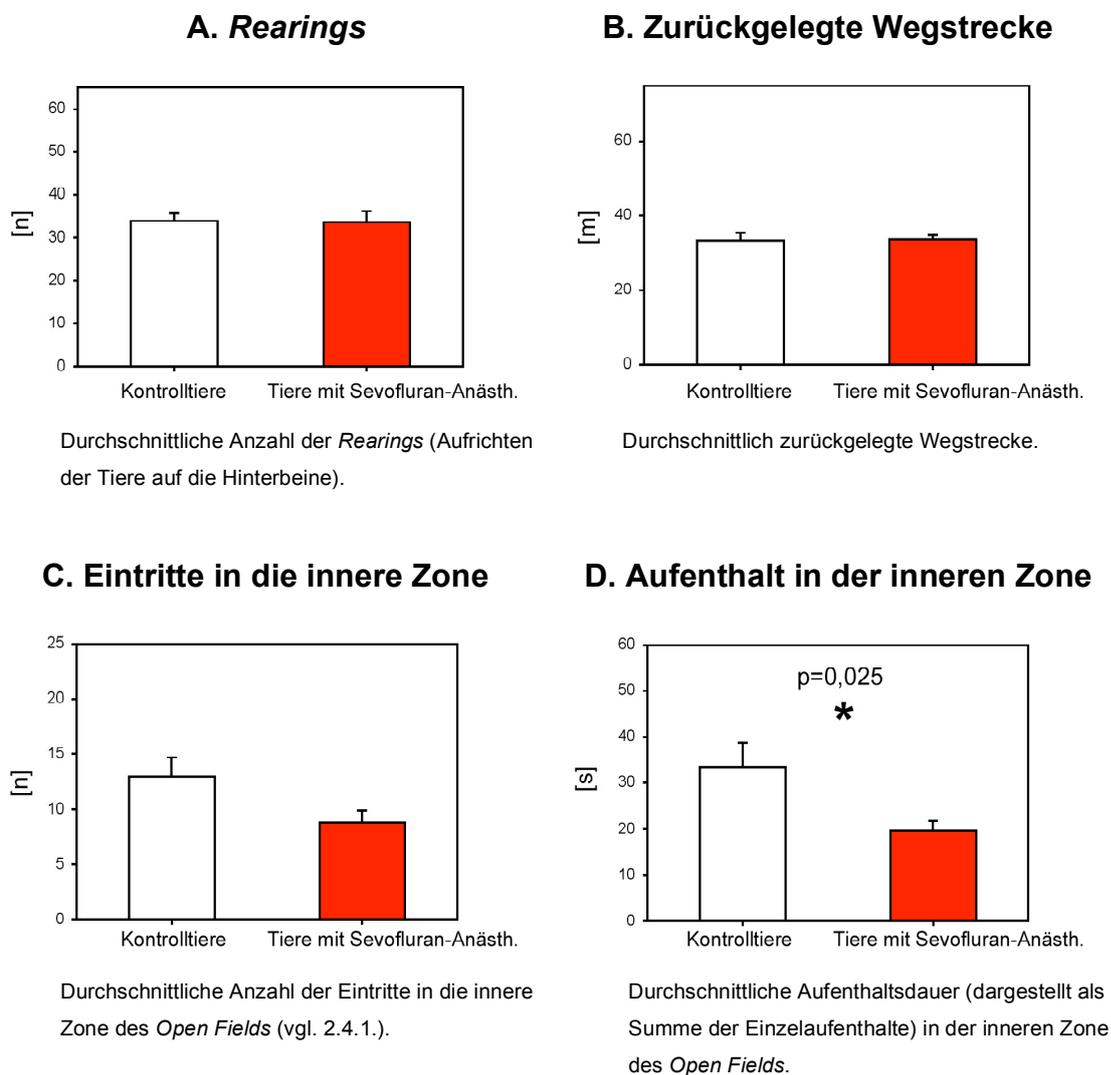
**Abb. 9 A-D: *Open-Field*-Test der Tiere mit Propofol-Anästhesie.**

Zwischen behandelten Tieren und Kontrolltieren waren keine signifikanten Verhaltensunterschiede zu verzeichnen. Alle Werte waren normalverteilt. Kontrolltiere (weiß): n=11, Tiere mit Propofol-Anästhesie (rot): n=22 (ein Tier kletterte aus der Apparatur).

### 3.3.1.2. Tiere mit Sevofluran-Anästhesie

Die Tiere mit Sevofluran-Anästhesie verhielten sich in drei der vier Kategorien des *Open-Field*-Tests genauso wie die Kontrolltiere (vgl. Abb. 10). Sowohl die Anzahl der innerhalb von fünf Minuten durchgeführten *Rearings* (vgl. Abb. 10 A) als auch die insgesamt in dieser Zeit zurückgelegte Wegstrecke (vgl. Abb. 10 B) waren gleich. Auch betraten die behandelten Tiere genauso oft die innere Zone des *Open Fields* wie die Kontrolltiere (vgl. Abb. 10 C).

Die Gesamtaufenthaltsdauer innerhalb dieses Bereichs der Apparatur war jedoch bei den behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert (vgl. Abb. 10 D). Wie bei der Propofol-Gruppe musste auch hier ein behandeltes Tier aus der Wertung genommen werden, da es während des Versuchs aus der Apparatur kletterte. Die Werte für „Zurückgelegte Wegstrecke“ und „Eintritte in die innere Zone“ waren normalverteilt, im Gegensatz zu den Messungen der Kategorien „*Rearings*“ und „Aufenthalt in der inneren Zone“.

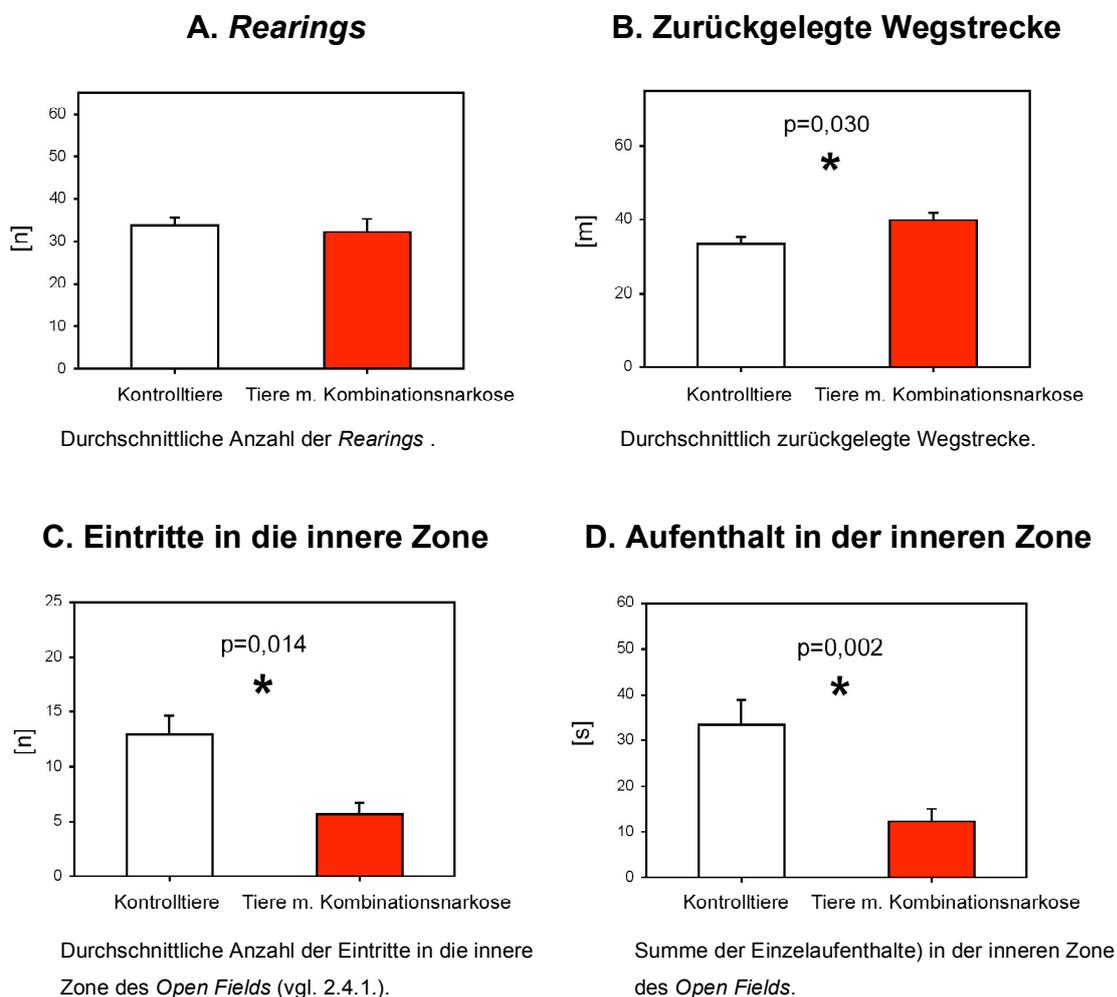


**Abb. 10 A-D: *Open-Field-Test* der Tiere mit Sevofluran-Anästhesie.**

Die behandelten Tiere hielten sich signifikant weniger in der inneren Zone auf (D). Kontrolltiere (weiß): n=14, Tiere mit Sevofluran Anästhesie (rot): n=14 (ein Tier kletterte aus der Apparatur).  $*=p<0,05$  (Sevofluran vs. Kontrolle).

### 3.3.1.3. Tiere mit Kombinationsnarkose

Versuchstiere nach neonataler Kombinationsnarkose zeigten genauso viele *Rearings* (vgl. Abb. 11 A) wie die Kontrolltiere, legten jedoch eine signifikant längere Wegstrecke innerhalb von fünf Minuten zurück (vgl. Abb. 11 B). Die behandelten Tiere zeigten außerdem signifikante Unterschiede beim Vermeiden bzw. Bevorzugen bestimmter Bereiche des *Open Fields*: sie betraten seltener in die innere Zone des *Open Fields* ein und hielten sich insgesamt kürzer dort auf (vgl. Abb. 11 C+D).

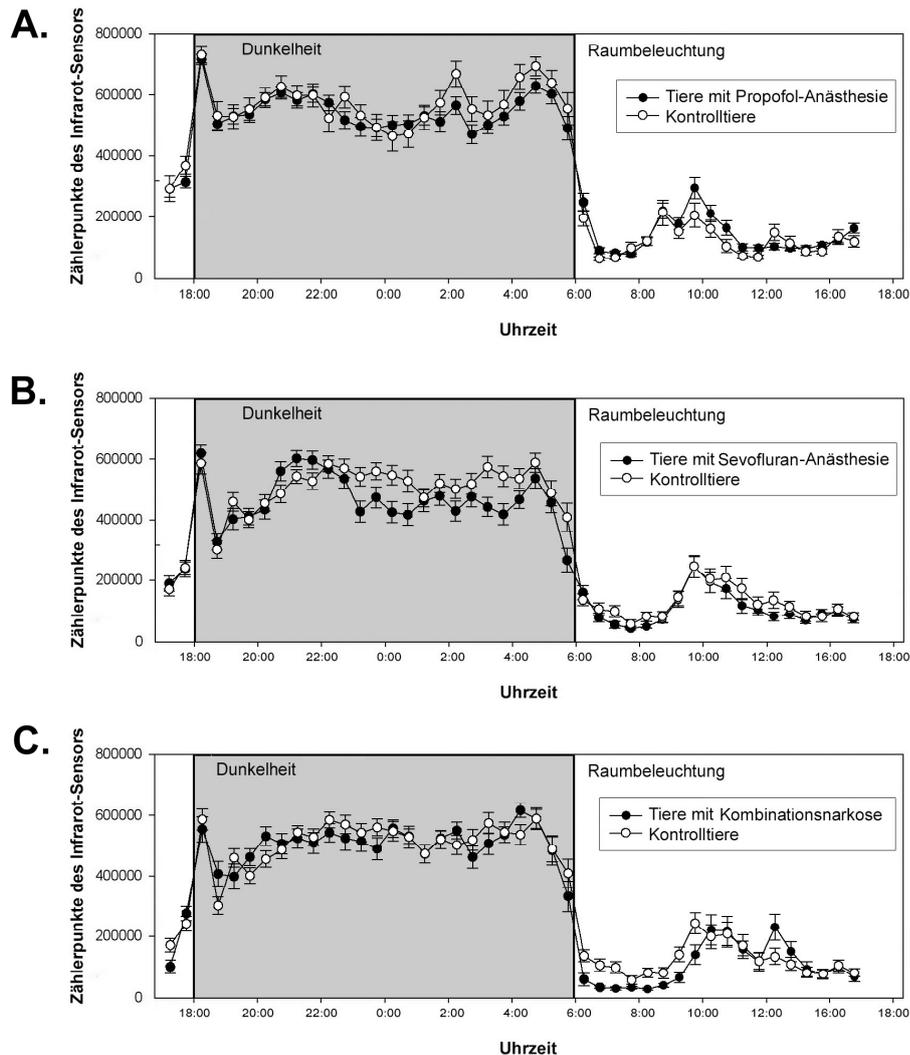


**Abb. 11 A-D: *Open-Field-Test* der Tiere mit Kombinationsnarkose.**

Die Tiere mit Kombinationsnarkose richteten sich während des Tests genauso häufig auf (A), legten jedoch durchschnittlich eine signifikant längere Wegstrecke innerhalb von fünf Minuten zurück (B). Dennoch betraten sie seltener als die Kontrolltiere die innere Zone des *Open Fields* (C), was sich auch signifikant auf die Aufenthaltsdauer in diesem Bereich der Apparatur auswirkte (D). Alle Werte bis auf die Kategorie „*Rearings*“ waren normalverteilt. Kontrolltiere (weiß): n=15, Tiere mit Kombinationsnarkose (rot): n=13. \*= $p<0,05$ .

### 3.3.2. Home-Cage-Activity-Test

Die Aktivität im Heimatkäfig wurde über 72 h gemessen. In den Abbildungen 12 (A-C) sind die mit Hilfe des Infrarot-Sensors gemessenen Zählerpunkte als Mittelwerte der drei Messtage mit ihren Standardfehlern über 24 h aufgetragen.



**Abb. 12 (A-C): Untersuchung der Aktivität im Heimatkäfig über 24 h (Home-Cage-Activity-Test).**

Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SEM von gemessenen Zählerpunkten eines Infrarot-Sensors über 24 h. (Die ursprüngliche Messung lief über 72 h). Die zirkadiane Rhythmik der nachtaktiven Tiere ist deutlich erkennbar. Behandelte Tiere: schwarze Punkte, Kontrolltiere: weiße Punkte. A: Tiere mit Propofol-Anästhesie: n=23 (Kontrolltiere: n=11), B: Tiere mit Sevofluran-Anästhesie: n=15 (Kontrolltiere: n=14), C: Tiere mit Kombinationsnarkose: n=13 (Kontrolltiere: n=15).

Der grau unterlegte Block in den Abbildungen entspricht der Zeit ohne Raumlicht von 18:00 bis 6:00 Uhr. Auf den Abbildungen ist der zirkadiane Rhythmus der nachtaktiven Tiere (Kontrolltiere: weiße Punkte, behandelte Tiere: schwarze Punkte) deutlich zu erkennen, d. h. bei allen Tieren war ein Anstieg des Aktivitätsniveaus während der Dunkelphase zu verzeichnen. Es bestanden jeweils keine Unterschiede zwischen behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Der „Aktivitäts-*Peak*“ um ca. 10:00 Uhr entspricht dem täglichen Nachfüllen von Wasser und Futter.

### 3.3.3. *Morris-Water-Maze-Test*

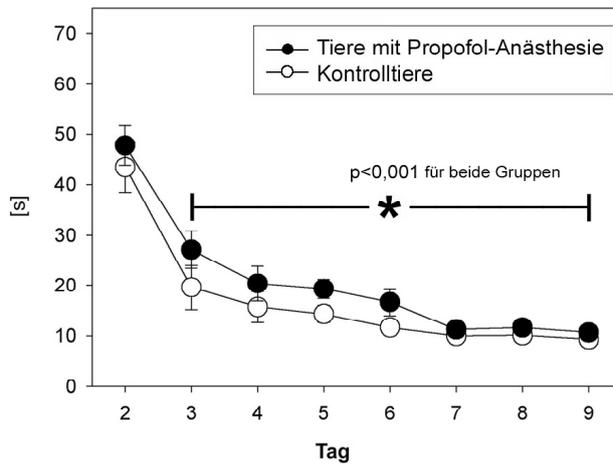
Die Analyse der Ergebnisse des *Morris-Water-Maze-Tests* setzt sich zusammen aus der sog. „Lernkurve“ der *Place Version* (Tag 2-9 mit Plattform) sowie aus einem Säulendiagramm zur *Spatial Probe* (Tag 10 ohne Plattform) zur Überprüfung des Lernerfolgs.

In den „Lernkurven“ zur *Place Version* sind auf der y-Achse die jeweils benötigten Zeitspannen bis zum Erreichen der Plattform (y-Achse) im Verlauf über acht Versuchstage (x-Achse) eingetragen. Bei den hierbei gemessenen Zeiten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den behandelten Tieren und der Kontrollgruppe (vgl. Abb. 13, 15 und 17).

Das Säulendiagramm zur *Spatial Probe* gibt Auskunft über die Gesamtschwimmdauer innerhalb der einzelnen Quadranten des *Morris Water Maze* am zehnten Versuchstag ohne Plattform. Alle behandelten Tiere wie auch die Kontrolltiere schwammen bzw. suchten signifikant am längsten im ehemaligen Plattformquadrant PQ (vgl. Abb. 14, 16 und 18).

### 3.3.3.1. Tiere mit Propofol-Anästhesie

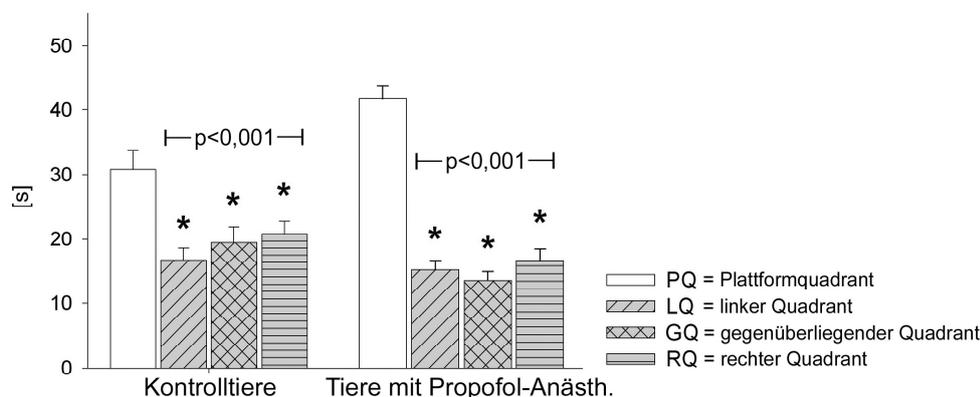
Die „Lernkurven“ der *Place Version* in Abbildung 13 zeigen für Kontrolltiere (weiße Punkte) und behandelte Tiere (schwarze Punkte) denselben Verlauf, d. h. dass beide Gruppen im Verlauf von acht Tagen jeweils gleich viel Zeit benötigten, die Plattform zu lokalisieren.



**Abb. 13: Morris-Water-Maze-Test (*Place Version*) für Tiere mit Propofol-Anästhesie.**

Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der durchschnittlich benötigten Schwimmdauer in Sekunden bis zum Auffinden der Plattform im zeitlichen Verlauf von Tag 2 bis Tag 9. Kontrolltiere: n=11 (weiße Punkte), behandelte Tiere: n=23 (schwarze Punkte). \*= $p<0,001$  (Tag 3-9 vs. Tag 2) für beide Gruppen.

Bei der Überprüfung des Lernerfolgs durch Entfernen der Plattform am zehnten Tag schwammen beide Gruppen signifikant am längsten innerhalb des ursprünglichen Plattformquadranten PQ (vgl. Abb. 14).

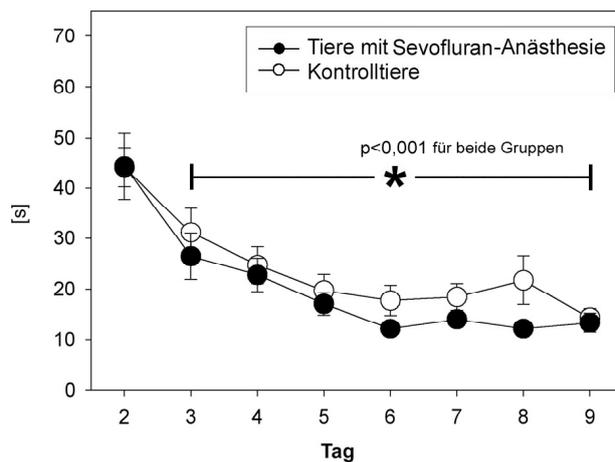


**Abb. 14: Morris-Water-Maze-Test (*Spatial Probe*) für Tiere mit Propofol-Anästhesie.**

Die signifikante Bevorzugung des Plattformquadranten PQ ist bei beiden Gruppen deutlich zu erkennen. Alle Werte waren normalverteilt. Kontrolltiere: n=11 (links), behandelte Tiere: n=23 (rechts). \*= $p<0,001$  (PQ vs. LQ, GQ, RQ).

### 3.3.3.2. Tiere mit Sevofluran-Anästhesie

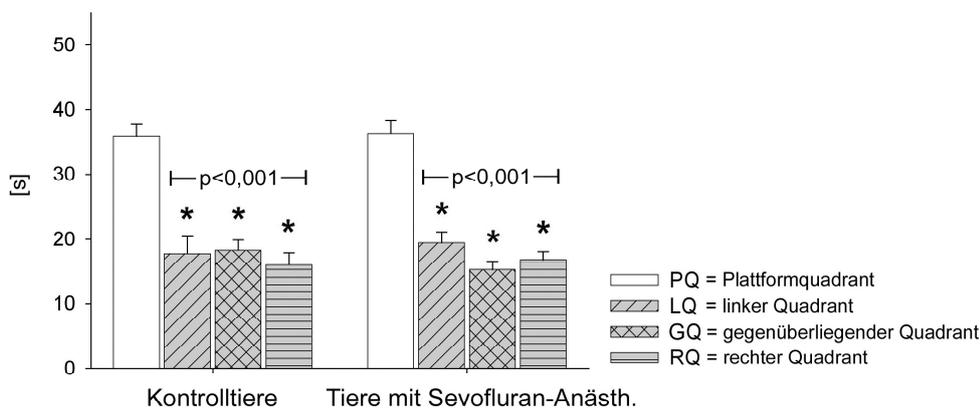
Auch bei der Sevofluran-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen behandelten Tieren und der Kontrollgruppe. Die Kurven beider Tiergruppen in Abb. 15 beschreiben im achttägigen Verlauf dieselben Schwimmzeiten bis zum Auffinden der Plattform.



**Abb. 15: Morris-Water-Maze-Test (Place Version) für Tiere mit Sevofluran-Anästhesie.**

Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der durchschnittlich benötigten Schwimmdauer bis zum Auffinden der Plattform im zeitlichen Verlauf von Tag 2 bis Tag 9 bilden die sog. „Lernkurve“. Kontrolltiere: n=14 (weiße Punkte), behandelte Tiere: n=15 (schwarze Punkte). \*= $p<0,001$  (Tag 3-9 vs. Tag 2) für beide Gruppen.

Am 10. Tag konnte beim Suchen der (entfernten) Plattform die deutliche Bevorzugung des ehemaligen Plattformquadrant PQ bei beiden Gruppen gleichermaßen beobachtet werden (vgl. Abb. 16).

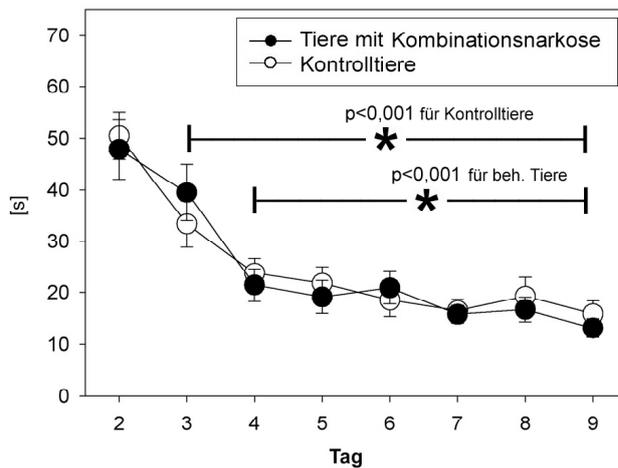


**Abb. 16: Morris-Water-Maze-Test (Spatial Probe) für Tiere mit Sevofluran-Anästhesie.**

Die signifikante Bevorzugung des Plattformquadranten PQ ist bei beiden Gruppen deutlich erkennbar. Alle Werte waren normalverteilt. Kontrolltiere: n=14 (links), behandelte Tiere: n=15 (rechts). Bei \*= $p<0,001$  (PQ vs. LQ, GQ, RQ).

### 3.3.3.3. Tiere mit Kombinationsnarkose

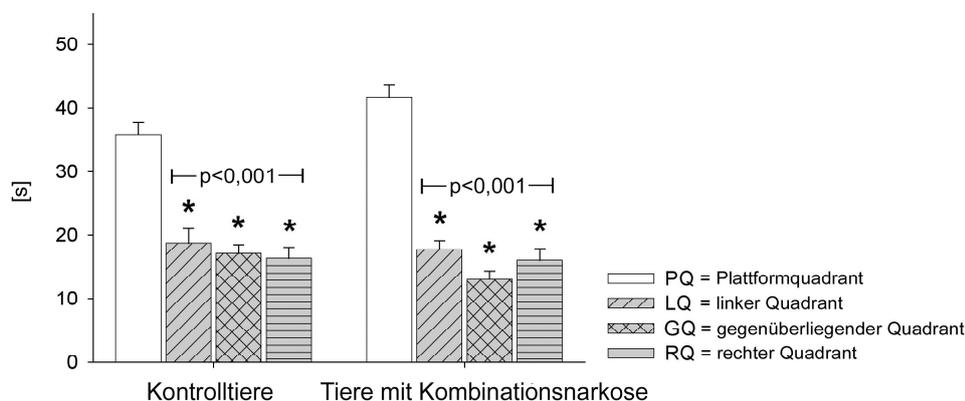
Auch bei Tieren, die eine Kombinationsnarkose erhalten hatten, konnte während der *Place Version* des *Morris-Water-Maze-Tests* ein Lernerfolg (Definition: vgl. Abschnitt 2.4.3.) beobachtet werden, welcher sich hier einen Tag später als bei den Kontrolltieren einstellte. Dennoch lernten beide Gruppen, die Plattform zu lokalisieren (vgl. Abb. 17).



**Abb. 17: Morris-Water-Maze-Test (*Place Version*) für Tiere mit Kombinationsnarkose.**

Es zeigten sich keine Unterschiede im Verlauf der gemessenen Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der durchschnittlich benötigten Schwimmdauer (y-Achse) bis zum Auffinden der Plattform im zeitlichen Verlauf von Tag 2 bis Tag 9. Kontrolltiere: n=15 (weiße Punkte), Tiere mit Kombinationsnarkose: n=13 (schwarze Punkte). \*= $p < 0,001$  (Tag 3-9 vs. Tag 2 für Kontrolltiere bzw. vs. Tag 3 für behandelte Tiere).

Ein Bevorzugtes Schwimmen im ehemaligen Plattformquadranten konnte in der *Spatial Probe* auch für Tiere mit Kombinationsnarkose beobachtet werden (vgl. Abb. 18).



**Abb. 18: Morris-Water-Maze-Test (*Spatial Probe*) für Tiere mit Kombinationsnarkose.**

Beide Gruppen zeigten am zehnten Versuchstag eine signifikante Bevorzugung des Plattformquadranten PQ. Kontrolltiere: n=15 (links), Tiere mit Kombinationsnarkose: n=13 (rechts). \*= $p < 0,001$  (PQ vs. LQ, GQ, RQ). Alle Werte waren normalverteilt.

### 3.3.4. Hole-Board-Test

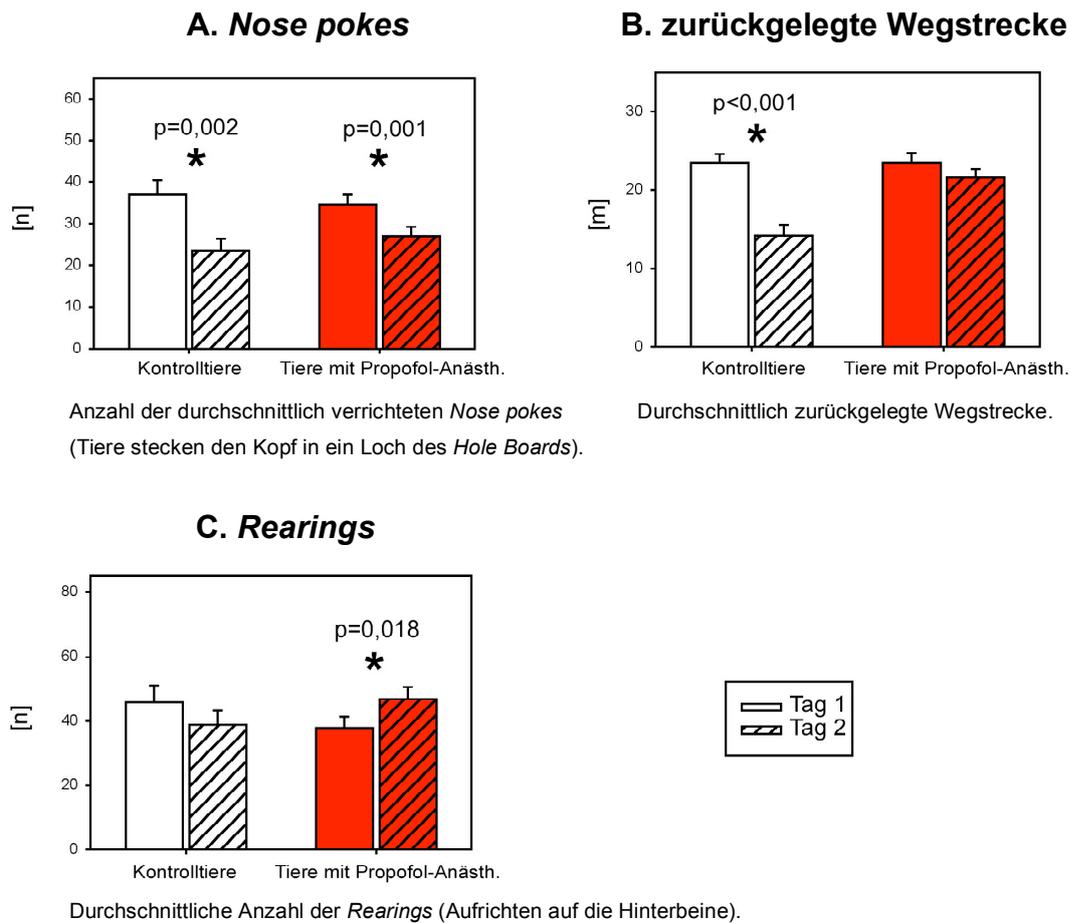
Das Ergebnis des *Hole-Board*-Tests setzt sich aus den drei gemessenen Kategorien „*Rearings*“, „*Nose pokes*“ und „Zurückgelegte Wegstrecke“ zusammen. In den Säulendiagrammen der Abbildungen 19-21 ist der zweite Tag jeweils durch Querstreifung gekennzeichnet. Links sind jeweils die Ergebnisse der Kontrolltiere in weiß angetragen, rechts die der behandelten Tiere in rot.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Verhaltenstests insgesamt waren insbesondere im *Hole-Board*-Test ausgeprägte Verhaltensauffälligkeiten zu beobachten: Sowohl bei Tieren mit Propofol-Anästhesie als auch bei Tieren mit Kombinationsnarkose konnten hier signifikante Unterschiede im Habitationsverhalten im Vergleich zur Kontrollgruppe aufgezeigt werden.

Die in Abschnitt 2.4.4. beschriebene Abnahme der drei gemessenen Parameter zum zweiten Versuchstag hin, die bei den Kontrolltieren zu erwarten gewesen wäre, konnte bzgl. der „*Rearings*“ bei keiner der drei Kontrollgruppen beobachtet werden. Die Anzahl der *Nose pokes* und die zurückgelegte Wegstrecke verringerten sich zum zweiten Tag hin allerdings bei allen Kontrollgruppen durchwegs signifikant.

#### 3.3.4.1. Tiere mit Propofol-Anästhesie

Tiere mit neonataler Propofol-Narkose zeigten im *Hole-Board*-Test im Vergleich zu den Kontrolltieren deutliche Verhaltensauffälligkeiten: Bei beiden Gruppen war zwar zum zweiten Tag hin eine signifikante Abnahme der *Nose pokes* zu zählen (vgl. Abb. 19 A), jedoch nahm die innerhalb der 10 Minuten gelaufene Wegstrecke bei den behandelten Tieren zum zweiten Tag hin nicht ab (vgl. Abb. 19 B). Die Anzahl der *Rearings* blieb von Tag 1 zu Tag 2 bei den Kontrolltieren gleich, nahm jedoch bei den behandelten Tieren zum zweiten Tag hin signifikant zu (vgl. Abb. 19 C). Somit erkundeten die Propofol-behandelten Tiere die Apparatur am zweiten Tag noch genauso intensiv wie am ersten, d. h. sie habituierten nicht an die neue Umgebung.

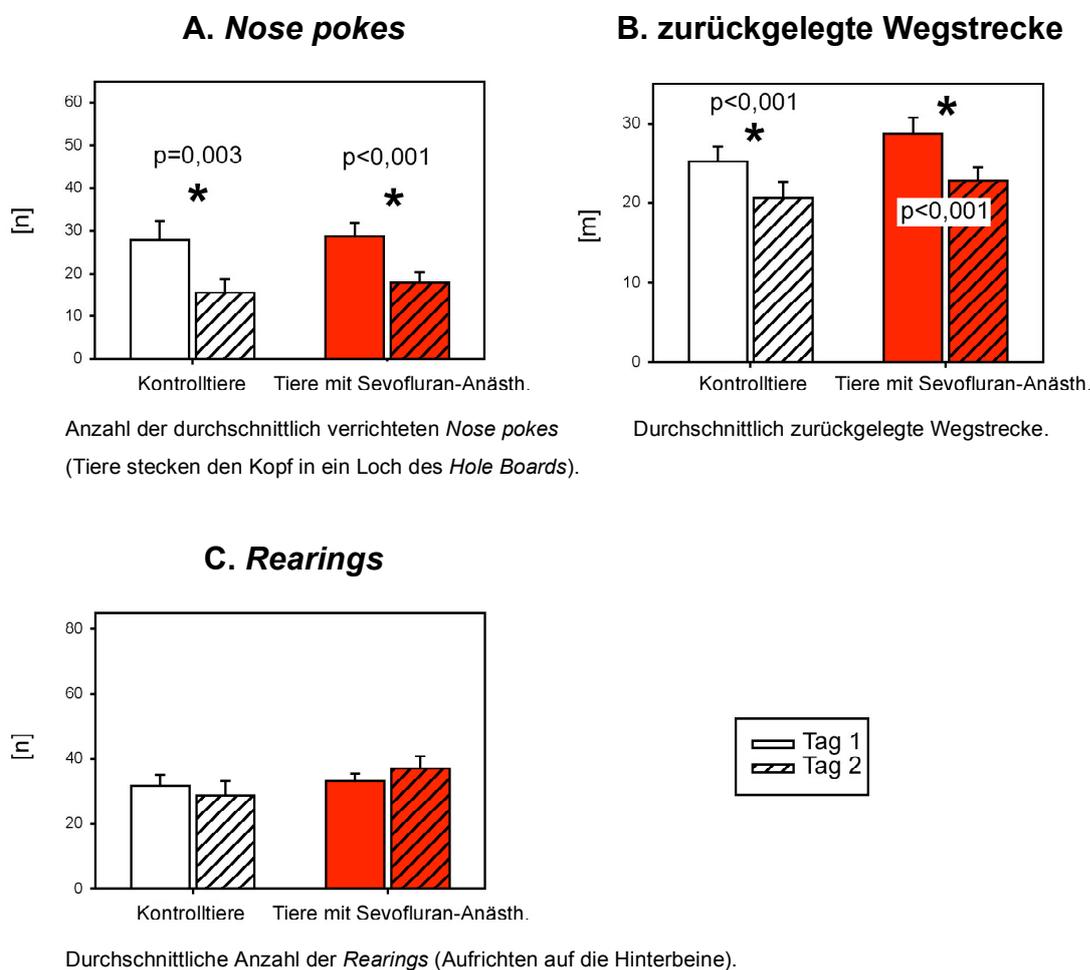


**Abb. 19 A-C: Hole-Board-Test für Tiere mit Propofol-Anästhesie.**

Im Vergleich der Messungen von Tag 1 (leere Säule) und Tag 2 (Querstreifung) zeigten die behandelten Tiere keine adäquate Abnahme des Erkundungsverhaltens zum zweiten Tag hin (vgl. B und C). Sie habituieren damit schlechter als die Kontrolltiere. Alle Werte waren normalverteilt. Kontrolltiere (weiß): n=11, Tiere mit Propofol-Anästhesie (rot): n=23.  $*=p<0,05$  (Tag 1 vs. Tag 2).

### 3.3.4.2. Tiere mit Sevofluran-Anästhesie

Beim *Hole-Board-Test* verhielten sich die Tiere mit neonataler Sevofluran-Anästhesie genauso wie die Kontrolltiere: die Anzahl der verrichteten *Nose pokes* nahm zum zweiten Tag hin signifikant ab (vgl. Abb. 20 A) und die innerhalb von 10 Minuten zurückgelegte Wegstrecke wurde bei beiden Gruppen zum zweiten Tag hin signifikant kürzer (vgl. Abb. 20 B). Alle Tiere zeigten dieselbe Anzahl an *Rearings* an beiden Tagen (vgl. Abb. 20 C). Die Sevofluran-behandelten Tiere habituierten ebenso wie die Kontrollgruppe an die neue Umgebung.



Anzahl der durchschnittlich verrichteten *Nose pokes* (Tiere stecken den Kopf in ein Loch des *Hole Boards*).

Durchschnittlich zurückgelegte Wegstrecke.

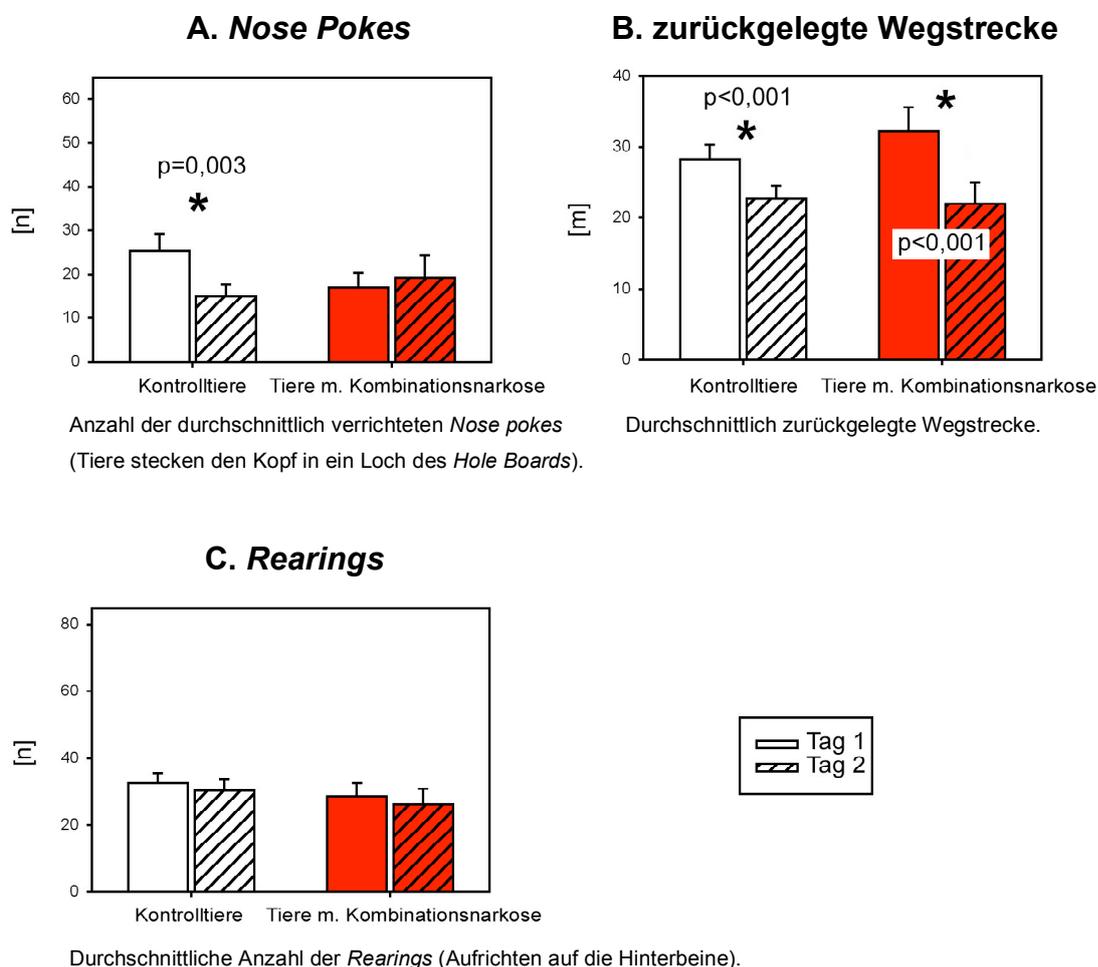
Durchschnittliche Anzahl der *Rearings* (Aufrichten auf die Hinterbeine).

**Abb. 20 A-C: Ergebnis des *Hole-Board-Tests* für Tiere mit Sevofluran-Anästhesie.**

Zu sehen ist eine signifikante Abnahme von *Nose pokes* (A) und zurückgelegter Wegstrecke (B) zum zweiten Tag hin sowie gleichbleibende Anzahl der *Rearings* (C) gleichermaßen bei beiden Gruppen. Somit ergaben sich keine Unterschiede zur Kontrollgruppe. Alle Werte waren normalverteilt. Leere Säule: Tag 1, Querstreifung: Tag 2. Kontrolltiere (weiß): n=14, Tiere mit Sevofluran-Anästhesie (rot): n=15. \* =  $p < 0,05$  (Tag 1 vs. Tag 2).

### 3.3.4.3. Tiere mit Kombinationsnarkose

Tiere mit neonataler Kombinationsnarkose zeigten - ähnlich wie die Propofol-Gruppe - signifikante Verhaltensauffälligkeiten im *Hole-Board*-Test: Die behandelten Tiere zeigten zum zweiten Tag hin ein gleich bleibendes Erkundungsverhalten bei den *Nose pokes* im Gegensatz zu abnehmenden *Nose-poke*-Zahlen bei der Kontrollgruppe. Eine Habituation konnte damit bei den behandelten Tieren nicht beobachtet werden (vgl. Abb. 21 A). In den Kategorien „Zurückgelegte Wegstrecke“ und „*Rearings*“ ergaben sich keine Unterschiede (vgl. Abb. 21 B und C).

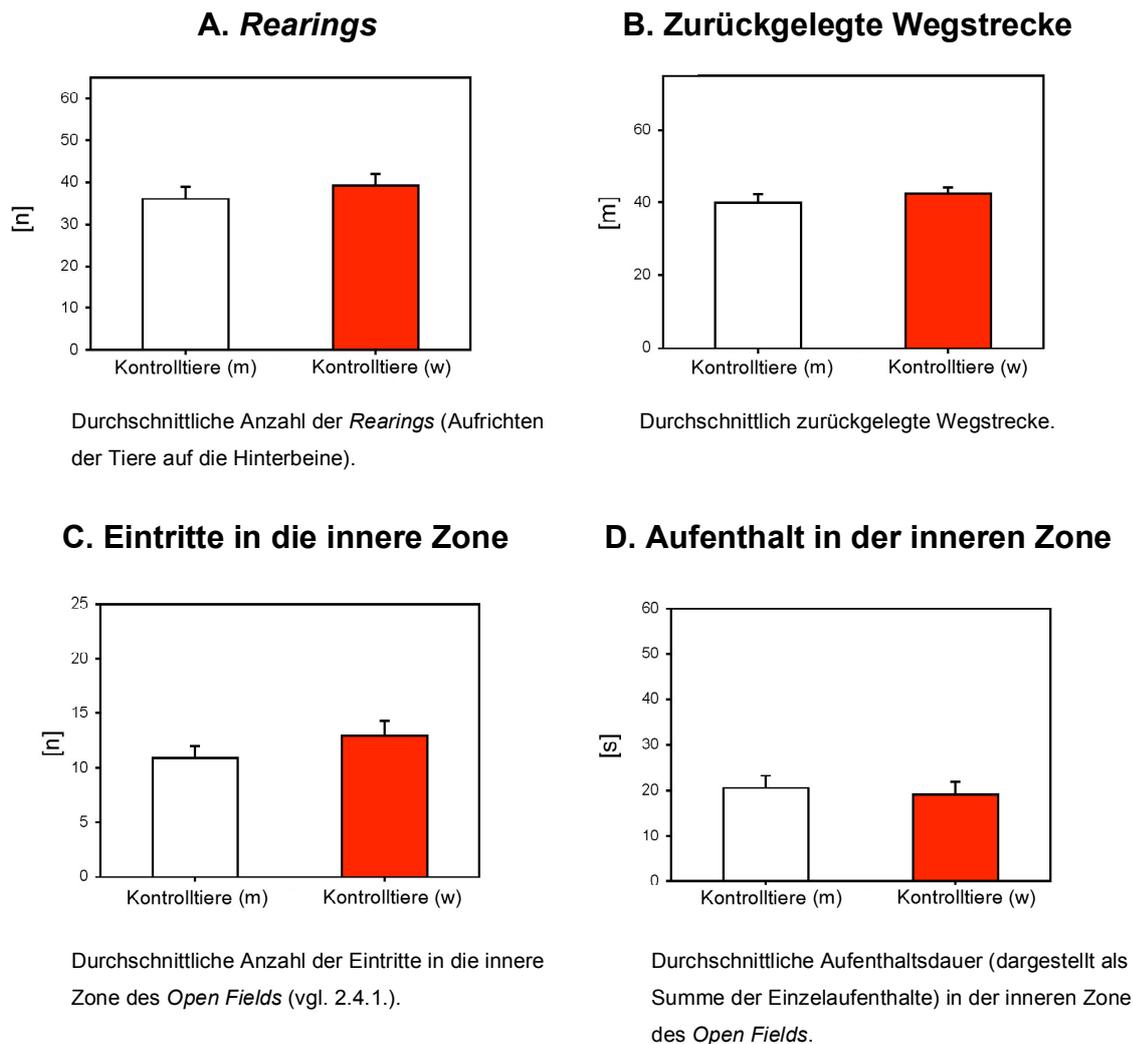


**Abb. 21 A-C: *Hole-Board*-Test für Tiere mit Kombinationsnarkose.**

Die behandelten Tiere (rote Säulen, n=13) zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren (weiße Säulen, n=15) keine Reduktion der *Nose pokes* zum zweiten Tag hin (A). Die Messungen der innerhalb von 10 Minuten zurückgelegten Wegstrecke (B) sowie der *Rearings* (C) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Alle Werte waren normalverteilt. \*= $p<0,05$  (Tag 1 vs. Tag 2).

### 3.3.5. Geschlechtsspezifisches Verhalten der Kontrolltiere

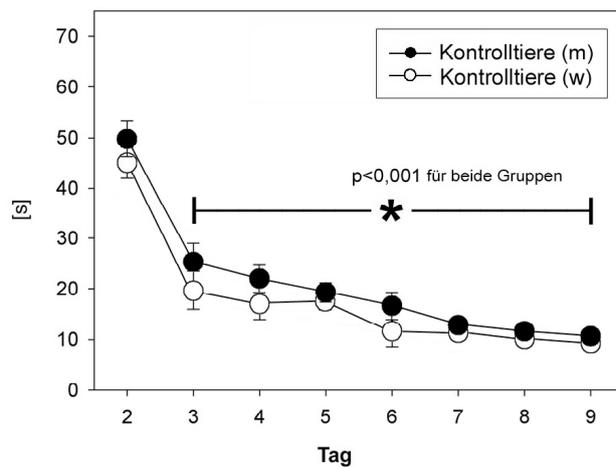
In den durchgeführten Tests zeigten sich zwischen männlichen und weiblichen Kontrolltieren keine signifikanten Verhaltensunterschiede. Die folgenden Abbildungen zeigen dies in den Ergebnissen des *Open-Field*-Tests (Abb. 22), des *Morris-Water-Maze*-Tests (Abb. 23) und des *Hole-Board*-Tests (Abb. 24).



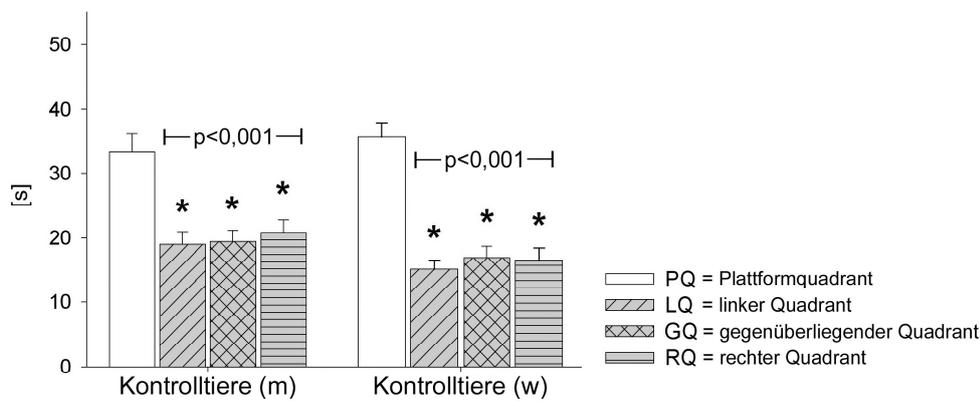
**Abb. 22 A-D: Geschlechtsspezifische Analyse des *Open-Field*-Tests für die Kontrolltiere.**

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen männlichen (m: weiße Säulen, n=26) und weiblichen (w: rote Säulen, n=14) Tieren gefunden werden.

**A.**

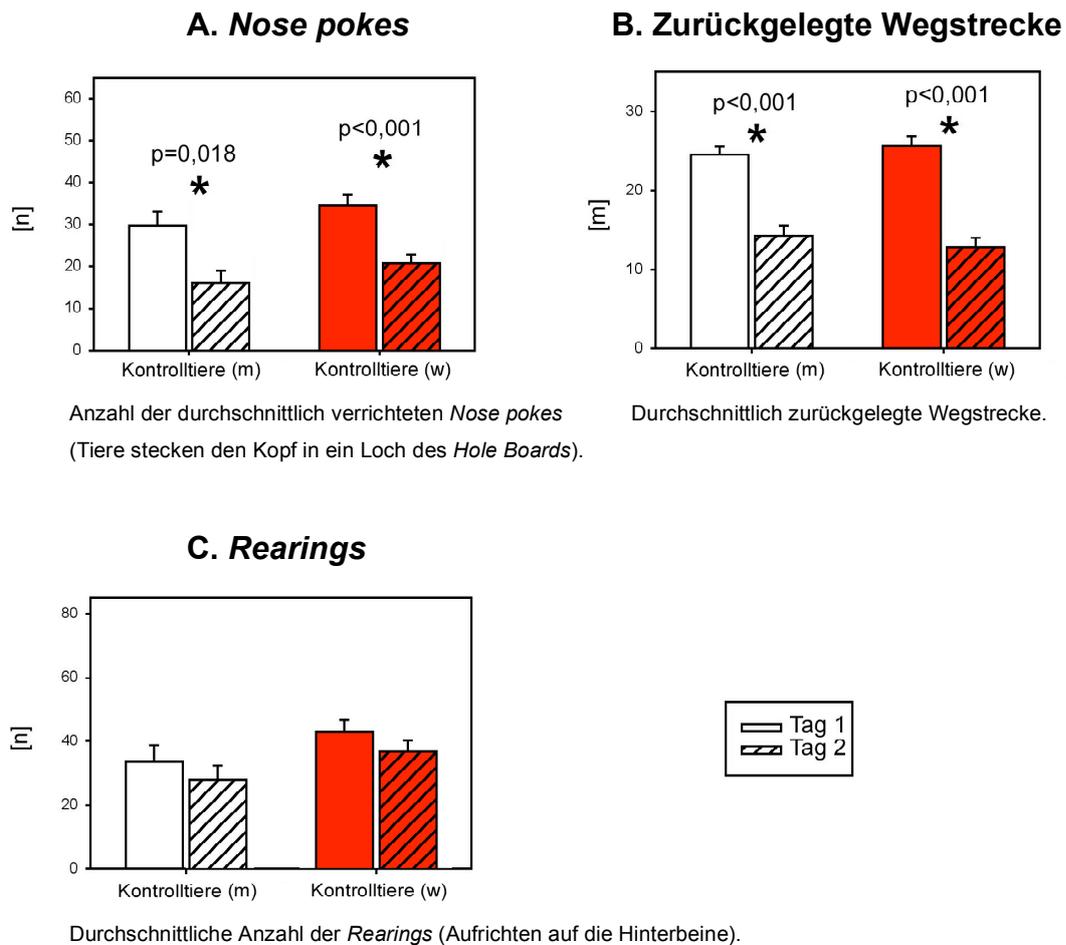


**B.**



**Abb. 23 A+B: Geschlechtsspezifische Analyse der Kontrolltiere im Morris-Water-Maze-Test.**

A: *Place Version* (Tag 2-9 mit Plattform): Die durchschnittlich benötigten Zeitspannen bis zum Auffinden der Plattform sind dargestellt im zeitlichen Verlauf von Tag 2-9. B: *Spatial Probe* (Tag 10 ohne Plattform): Die jeweils geschwommenen Zeiten pro Quadrant für PQ, LQ, GQ und RQ zeigen sowohl bei männlichen (m, links) als auch bei weiblichen (w) Tieren (rechts) gleichermaßen eine signifikante Bevorzugung des Plattformquadranten (PQ). Weder in der *Place Version* noch in der *Spatial Probe* konnten signifikante Unterschiede zwischen männlichen (n=26) und weiblichen (n=14) Tieren beobachtet werden. \*=p<0,001 (für *Place Version*: Tag 3-9 vs. Tag 2, für *Spatial Probe*: PQ vs. LQ, GQ und RQ).



**Abb. 24 A-C: Geschlechtsspezifische Analyse der Kontrolltiere im *Hole-Board*-Test.**

Männliche (m: weiße Säulen, n=26) und weibliche Tiere (w: rote Säulen, n=14) verhielten sich im *Hole-Board*-Test gleich. Tag 1(w) vs. Tag 1(m) und Tag 2(w) vs. Tag2 (m) waren nicht signifikant. \*=p<0,05 (Tag 1 vs. Tag 2).

## 4. DISKUSSION

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um eventuell vorhandene Veränderungen im Verhalten adulter Ratten, die neonatal mit Anästhetika behandelt wurden, in Verhaltenstests zu detektieren.

In zwei der vier durchgeführten Verhaltenstest konnten signifikante Unterschiede zwischen den behandelten Tieren und der Kontrollgruppe beobachtet werden: Die Propofol-Gruppe wies im *Hole-Board*-Test ein reduziertes Habitationsverhalten auf, die Sevofluran-Gruppe vermied es im *Open-Field*-Test, die innere Zone der Apparatur zu betreten. Tiere mit neonataler Kombinationsnarkose zeigten ein Mischbild der beiden zuvor geschilderten Verhaltensauffälligkeiten. Der folgende Abschnitt 4.1. geht auf die Interpretation dieser Verhaltensweisen näher ein.

### 4.1. Ergebnisse der Verhaltenstests

G. M. Morris fand heraus, dass hippocampale Läsionen das Verhalten von Ratten und von Mäusen im *Morris-Water-Maze*-Test beeinträchtigen können.<sup>97,98</sup> Zudem wurde dem *Morris-Water-Maze*-Test eine hohe Sensitivität für Beeinträchtigungen des GABA- bzw. Glutamat-Transmitter-System nachgewiesen.<sup>99</sup> Signifikante Defizite im räumlichen Lernen, wie sie nach der Kombinationsnarkose mit Midazolam, Lachgas und Isofluran bei Jevtovic-Todorovic et al.<sup>74</sup> auftraten, konnten nach neonataler Propofol- oder Sevofluran-Mononarkose genauso wenig wie nach einer Kombinationsnarkose der beiden Substanzen mit Midazolam beobachtet werden, obwohl es - basierend auf histologischen Untersuchungen - Hinweise auf eine neuronale Schädigung in hippocampalen Hirnarealen nach Anwendung von Propofol bei Neugeborenen gibt.<sup>75</sup>

Verhaltensdefizite bei Ratten mit hippocampalen Läsionen wurden des Öfteren bereits als sehr komplex beschrieben: So zeigten sich solche Tiere zwar beeinträchtigt, eine versteckte (d. h. Unter-Wasser-)Plattform zu finden, konnten eine Plattform jedoch problemlos lokalisieren, wenn sie sich – wie in dem hier verwendeten Versuchsmodell - jedes mal im selben Abstand und in der selben Richtung im Bezug auf Orientierungshilfen (z. B. Symbole an der Wand) befand.<sup>100</sup> Es wurde außerdem beobachtet, dass das Ausmaß des Lerndefizits beim räumlichen Lernen mit dem

Volumen des geschädigten Hippokampusgewebes korreliert und dorsale Läsionen des Hippokampus größere Effekte zeigen als ventrale.<sup>101,102</sup> Eine Aufschlüsselung nach dorsaler und ventraler Lokalisation der Apoptosen in der Hippokampusregion nach Propofol-Gabe liegt in unseren Untersuchungen nicht vor.<sup>75</sup>

Im *Hole-Board*-Test konnten bei zwei behandelten Gruppen Verhaltensunterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren gefunden werden. Der Test diente der Untersuchung des Habitationsverhaltens,<sup>92</sup> wobei die Anzahl der untersuchten Löcher des *Hole Boards* (*Nose pokes*), die insgesamt zurückgelegte Wegstrecke und die Anzahl der *Rearings* (Aufrichten auf die Hinterbeine) als Kriterien exploratorischer Aktivität interpretiert wurden. Am zweiten Versuchstag sollte die Abnahme der Explorationsaktivität auf Habituation bzw. Gewöhnung der Versuchstiere an die neue und unbekannte Umgebung hinweisen.<sup>94</sup> Tiere mit Propofol-Anästhesie habituierten schlechter d. h. sie untersuchten die Testapparatur am zweiten Tag noch genauso intensiv wie am ersten, obwohl alle Tiere die Testapparatur schon aus dem ersten Versuchstag kannten. Möglicherweise verfügten sie über ein schlechteres Objektgedächtnis als die Kontrolltiere, was die fehlende Abnahme der zurückgelegten Wegstrecke und die Zunahme der *Rearings* der behandelten Tiere am zweiten Versuchstag erklären könnte.

Tiere mit Sevofluran-Anästhesie zeigten lediglich im *Open-Field*-Test signifikante Verhaltensauffälligkeiten. In diesem Test wird die natürliche Aversivität der Ratten gegenüber großen und „fremden“ Räumen genutzt,<sup>84,103</sup> um die Ängstlichkeit der Tiere zu untersuchen.<sup>104,105</sup> In den gewonnenen Ergebnissen der vorliegenden Studie zeigten Tiere mit Sevofluran-Anästhesie ein ängstlicheres Verhalten als die Propofol- und Kontrolltiere, indem sie signifikant weniger Zeit in der inneren Zone der Apparatur verbrachten.

Bei der Testung der Tiere mit Kombinationsnarkose wiederholten sich schließlich, wie erwartet, qualitativ sowohl die Ergebnisse der Propofol- als auch der Sevofluran-Gruppe: In einer der drei Kategorien des *Hole-Board*-Tests zeigte sich eine signifikant verminderte Habituation sowie im *Open-Field*-Test eine gesteigerte Ängstlichkeit, d. h. sie bevorzugten es wie die Sevofluran-Gruppe, sich in der äußeren Zone der Testfläche aufzuhalten. Zudem zeigten sie im selben Versuch eine vermehrte lokomotorische Aktivität (d. h. eine signifikant längere Wegstrecke) im Vergleich zu den Kontrolltieren. In der Literatur wird ein direkter Zusammenhang zwischen exploratorischer Aktivität und Ängstlichkeit der Tiere beschrieben.<sup>106</sup> Es existieren allerdings widersprüchliche

Meinungen zur Interpretation der Lokomotion als Angstparameter: Während Untersuchungen an Ratten im *Open-Field-Test* darauf hinwiesen, dass gerade kürzere Wegstrecken mit stärkerer Ängstlichkeit der Tiere einhergehen können,<sup>107</sup> vertritt eine andere Arbeitsgruppe die Meinung, dass die Lokomotion im *Open-Field-Test* als Angstparameter nicht herangezogen werden dürfe.<sup>108</sup>

Zusammenfassend ist bei der Betrachtung dieser Ergebnisse ein Zusammenhang mit den bisherigen histologischen Untersuchungen zur Neurotoxizität der untersuchten Medikamente postulierbar (vgl. Kap. 1.3.), sodass aus Daten der Literatur möglicherweise abgeleitet werden kann, dass die Ursache des veränderten Verhaltens ein Anästhetika-induzierter Anstieg der Apoptoserate im neonatalen Gehirn sein könnte.<sup>109</sup>

Der folgende Abschnitt 4.2. soll einen Überblick geben, wann und unter welchen Umständen Apoptosevorgänge im Gehirn allgemein auftreten können.

#### **4.2. Neuronale Apoptosevorgänge im neonatalen Gehirn**

Jeden Tag werden im menschlichen Körper ca.  $60 \times 10^9$  Zellen neu gebildet. Um diesen Zellumsatz zu ermöglichen, werden überschüssige, nichtfunktionelle oder geschädigte Zellen zumeist durch programmierten Zelltod entfernt. Ein Gleichgewicht von Zellteilung und Zelltod sorgt dafür, dass bei der Regeneration von Organen und Organsystemen ihre Zellzahl relativ konstant bleibt. Während der Embryonalentwicklung und des gesamten Wachstums spielt der programmierte Zelltod bei der „Einschmelzung“ oder Reorganisation von Strukturen eine wichtige Rolle (z. B. Thymusatrophie, Interdigitalfalten).<sup>110,111</sup> Auch bei der Gehirnentwicklung spielt der programmierte Zelluntergang eine wichtige Rolle.

Kerr et al. beobachteten 1972 bei dieser Art von Zelltod deutliche morphologische Unterschiede zur Nekrose und führten so den Begriff „Apoptose“ ein.<sup>112</sup> Anders als bei der Nekrose, bei der die Zellorganellen zugrunde gehen, die Zellen aufplatzen und der Zellinhalt (u. a. Enzyme, Sauerstoffradikale und Zytokine) in das umgebende Gewebe ausgeschüttet wird und dort Entzündungsreaktionen hervorruft, bleiben bei der Apoptose Zellmembran und Zellorganellen intakt. Viele Moleküle wie auch proinflammatorische Substanzen werden so zurückgehalten und intrazellulär abgebaut.

Zu Beginn der Apoptose kann eine Verringerung des Zellvolumens beobachtet werden, der Zellkern schrumpft und das Chromatin verdichtet sich (Pyknose). Weiterhin werden auf der Zelloberfläche apoptotischer Zellen Signalmoleküle exprimiert, die sie für Makrophagen zur Phagozytose kennzeichnen.<sup>113</sup>

Die Signaltransduktionswege der Apoptose sind komplex, jedoch weitgehend geklärt. Kaskadenartig werden durch Abspaltung inhibitorischer Molekülbestandteile proteinabbauende Enzyme (Kaspasen) aktiviert, die letztendlich zum Abbau apoptoserelevanter Substrate führen.<sup>110</sup> Es sind bis heute drei Signalwege bekannt, über die die sog. Kaspasenkaskade ausgelöst werden, um so den programmierten Zelltod einleiten zu können: ein extrinsischer Weg, der über sog. „Todesrezeptoren“ (z. B. CD-95-, FAS- oder TNF-1-Rezeptor) vermittelt wird, ein intrinsischer (sog. „mitochondrialer“) Signalweg und ein alternativer Weg über das endoplasmatische Retikulum wurden bisher beschrieben.<sup>114,115</sup>

Der Todesrezeptorsignalweg ermöglicht über ein Adaptermolekül (FADD: *FAS-associated death domain protein*) die Rekrutierung von Procaspase-8 an den sog. CD-95-Rezeptor-Ligand-Komplex (engl.: *death inducing signaling complex*, DISC). Dadurch wird Procaspase-8 autoproteolytisch aktiviert und kann die Kaspasenkaskade starten. Das initiale Ereignis im mitochondrialen Signalweg ist die Freisetzung von Zytocrom C aus dem Mitochondrium. Im Zytosol löst Zytocrom C die an die Hydrolyse von dATP gekoppelte Ausbildung des sog. Apaf-1/Procaspase-9-Apoptosomkomplexes aus. Dadurch wird Procaspase-9 autoproteolytisch aktiviert und die Kaspasenkaskade eingeleitet.<sup>110</sup>

An der Modulation der Empfindlichkeit bzw. der Neigung zur Apoptose einzelner Zellen ist die intrazelluläre Expression der Regulatorproteine Bcl-2 und Bcl-xL maßgeblich beteiligt, die die Freisetzung von Cytochrom C blockieren, sowie die der Kaspase-3 als Endglied der Kaspasenkaskade (sog. Effektor-kaspase).<sup>111</sup>

Im Tiermodell mit neugeborenen Ratten schien eine (durch Anästhetika induzierte) vermehrte Expression des sog. *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) sowie die vermehrte Ausprägung des niedrig-affinen Neurotrophin-Rezeptors p75<sup>NTR</sup> im zerebralen Kortex zur Aktivierung der Apoptosekaskade zu führen.<sup>116</sup> BDNF gehört zur Familie der Neurotrophine und ist mittels hoch-affiner Bindung am TrkB-Rezeptor u. a. an Differenzierung, Funktionserhalt und synaptischer Plastizität von Nervenzellen beteiligt.<sup>117-119</sup>

Werden Apoptosen durch externe Stimuli induziert (z. B. medikamentös), scheint außerdem der Zeitpunkt der Behandlung der Tiere eine große Rolle zu spielen. Besonders empfindlich auf metabolische Einwirkungen sowie auf die Applikation von Anästhetika reagieren Neurone während der Phase des sog. *brain growth spurt*, d. h. während des Zeitpunkts der maximalen Hirnwachstums-Geschwindigkeit. Dieser wird bei verschiedenen Lebewesen zu verschiedenen Zeitpunkten im Bezug zur Geburt erreicht.<sup>43</sup> Eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber apoptotischen Vorgängen werden während dieses Zeitraumes nicht nur Neuronen, sondern auch Oligodendrozyten und Astrozyten im unreifen Gehirn zugeschrieben, insbesondere nach einer Zellschädigung durch freie Radikale.<sup>111</sup>

Anders als beim Menschen, wo die Synaptogenese vom letzten Trimenon der Schwangerschaft bis etwa zwei Jahre nach der Geburt andauert,<sup>120</sup> ist diese Phase bei der Ratte ein rein postnatales Ereignis, das um den 6. Lebenstag seinen Höhepunkt erreicht und etwa zwei bis drei Wochen andauert<sup>121</sup>. Der Zeitpunkt der Behandlung der Versuchstiere wurde deshalb auf den 6. Lebenstag festgelegt. Yon et al. beschrieben, dass eine spätere Anästhetika-Behandlung am 14. Lebenstag – d. h. gegen Ende der Synaptogenese bei der Ratte – keine Aktivierung der Signaltransduktion zur Apoptose zur Folge hatte.<sup>122</sup>

Neben den bekannten Ursachen wie Hypoxie, Hypoglykämie, Ischämie, Infektion und Epilepsie sind weitere Triggerfaktoren für apoptotische Vorgänge bei Neugeborenen bekannt: Stressoren aller Art, z. B. die Trennung vom Muttertier,<sup>123</sup> postoperative Unterernährung<sup>124,125</sup> sowie häufiges Anfassen (sog. „*Handling*“) durch den Menschen<sup>126</sup> in der Neonatalperiode können eine erhöhte Neurodegeneration hervorrufen.

GABA und Glutamat scheinen hierbei durch Modulation und Steuerung von Zellproliferation, Neuroblastenmigration und Dendritenreifung eine Schlüsselrolle bei der frühen Gehirnentwicklung zu spielen.<sup>127,128</sup>

Da die drei in dieser Studie verwendeten Anästhetika ihre Wirkung u. a. über GABA und/oder Glutamat entfalten, wird in Abschnitt 4.3. auf die Bedeutung dieser Transmitter in der frühen Gehirnentwicklung näher eingegangen.

### 4.3. Bedeutung von Glutamat und GABA in der Gehirnentwicklung

Neurotransmitter wie Glutamat und GABA funktionieren nicht allein als Effektoren der Signaltransduktion an der Synapse, sondern sie scheinen auch durch nicht-synaptische Wirkmechanismen bereits in sehr frühen Stadien der Gehirnentwicklung eine entscheidende Rolle zu spielen. Hierbei wird eine parakrine, diffuse d. h. nicht-synaptische Wirkungsweise der Transmitter beschrieben, im Kontrast zur schnellen, fokussierten Wirkung an der Synapse.<sup>129</sup>

GABA-positive Zellen können ab der sechsten Gestationswoche gefunden werden<sup>130</sup> und auch die exzitatorisch wirkende Aminosäure Glutamat ist schon während der ZNS-Entwicklung vorhanden.<sup>131</sup> Gleichzeitig exprimieren neuronale Stammzellen, migrierende Neuroblasten und unreife Neurone transmitterspezifische Rezeptoren.<sup>132,133</sup>

Die Proliferation neuronaler Progenitorzellen ist einer der ersten wichtigen Schritte der Cortex-Bildung, wobei der sog. Neocortex aus einer ventrikulären und einer subventrikulären Zone besteht<sup>134</sup>. Während Precursor-Zellen der ventrikulären Zone im adulten Gehirn schrittweise durch ependymale Zellen mit beschränkter Fähigkeit zur Proliferation ersetzt werden,<sup>135</sup> bleibt die subventrikuläre Zone lebenslang als proliferative Zellpopulation bestehen<sup>136,137</sup>. Die Rolle von GABA und Glutamat bei der Progenitorzellproliferation ist im Tiermodell ausführlich untersucht worden.<sup>131,138-142</sup> Sowohl durch Applikation von GABA als auch von Glutamat wird durch Verkürzung des Zellzyklus die Zellproliferation der ventrikulären Zone erhöht, die Proliferationsrate der subventrikulären Zone zugleich verringert.<sup>138</sup> Diese gegensätzliche Modulation von ventrikulären und subventrikulären Progenitorzellen scheint entscheidend zum neokortikalen Wachstum beizutragen.<sup>138,143</sup> GABA und Glutamat agieren zudem als trophische Faktoren der neuronalen Differenzierung zur Ausprägung des Dendritenbaums<sup>127,144</sup> und scheinen durch chemotaktische Effekte auch die Neuroblastenmigration von der ventrikulären Zone zur sog. *cortical plate*, dem späteren Neokortex zu beeinflussen<sup>141,142,145</sup>.

Auch externe Stimuli wie subkutane Injektion von hochdosiertem Glutamat bewirkte zudem im Tiermodell eine akute Nekrose von Nervenzellen in bestimmten Hirnarealen.<sup>146,147</sup> Eine Blockade des Glutamat-Rezeptors vom NMDA-Typ führte dagegen zu ausgeprägter Apoptose im sich entwickelnden Gehirn<sup>71</sup> und zu limitierter Synapsenausbildung im Hippokampus.<sup>148</sup> Transgene Tiere mit einem Funktionsverlust

des NMDA-Rezeptors zeigten erhöhte Apoptoseraten in bestimmten Hirnarealen während der Synaptogenese<sup>149</sup> und starben kurz nach der Geburt<sup>150</sup>.

Die meisten verwendeten Anästhetika verfügen über GABAerge und glutamaterge Wirkmechanismen. Es ist daher leicht vorstellbar, dass die neonatale Anwendung von Anästhetika nachteilige Effekte für das sich entwickelnde Gehirn mit sich bringen könnte, indem diese die zur regelrechten Gehirnentwicklung benötigte feine Balance aus GABA und Glutamat stören. Abschnitt 4.3. soll einen groben Überblick über die vorhandene Literatur zu o. g. Wirkungen von Anästhetika geben und betrachtet hierbei schwerpunktmäßig die in der vorliegenden Studie verwendeten Medikamente Propofol, Sevofluran und Midazolam.

#### **4.4. Einfluss von Anästhetika auf die ZNS-Entwicklung**

Für Propofol wurde *in vitro* eine selektive Neurotoxizität für subventrikuläre GABAerge Neurone, nicht aber für Astroglia bei neugeborenen Ratten nachgewiesen.<sup>151</sup> Histologisch konnten nach Propofol-Gabe vermehrte Apoptoseraten im Hippokampus beobachtet werden<sup>75</sup> und auch an Zellen des zerebralen Kortex neugeborener Tiere wurde gezeigt, dass Propofol dosisabhängig die Apoptose GABAerger Neurone induzieren kann, während andere Zelltypen wie Oligodendrozyten und Astrozyten in ihrer Entwicklung unbeeinträchtigt blieben<sup>152</sup>. Auch eine Beeinflussung des Dendritenwachstums wird im o. g. *in-vitro*-Modell mit GABAergen Neuronen<sup>153</sup> bei klinisch relevanten Konzentrationen von Propofol beschrieben<sup>154</sup>. Im Gegensatz zu Untersuchungen mit unreifen Nervenzellen konnte in einem *in-vitro*-Modell an drei Wochen alten hippokampalen Zellen kein Hinweis auf Neurotoxizität sogar bei hohen Konzentrationen von Propofol gefunden werden.<sup>152</sup> Dies entspricht den oben beschriebenen Beobachtungen zur Sensitivität von Neuronen gegenüber Apoptose-induzierenden Substanzen, welche bei Ratten um den sechsten Lebensstag einen Höhepunkt zu erreichen scheint (vgl. Abschnitt 4.1.). Es liegt deswegen die Vermutung nahe, dass auch die Ausprägung der potenziellen Neurotoxizität von Propofol stark vom Entwicklungsstadium abhängt, in dem die unreifen Neurone dem Medikament exponiert werden. Die Ergebnisse der Verhaltenstests der Tiere (vgl. Abschnitt 3.2.4.1.), die am sechsten Lebensstag eine Mononarkose mit Propofol erhielten, lassen ebenfalls ein neurotoxisches Potential von Propofol vermuten.

Der genaue Wirkmechanismus der volatilen Anästhetika wird gegenwärtig noch diskutiert,<sup>56</sup> dennoch steht fest, dass auch diese u. a. über GABA-mimetische und/oder NMDA-antagonistische Wirkungsweisen verfügen. Für Halothan wurde bereits vor 20 Jahren eine Beeinträchtigung von Dendritenwachstum und –ramifikation sowie eine erniedrigte Synapsendichte nach pränataler Exposition nachgewiesen.<sup>155</sup> Auch für Lachgas<sup>156</sup> und Isofluran<sup>157,158</sup> wurden neurodegenerative Wirkungen beschrieben. Die *in vitro* beobachteten Apoptosen nach neonataler Mononarkose mit Isofluran 1,5 Vol% traten nach einer Narkosedauer von mindestens fünf Stunden auf. Desweiteren wurde auch hier ein Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Neurodegeneration und dem Alter der Tiere am Tag der Narkose bzw. der Narkosedauer (vgl. Abschnitt 4.4.1.) vermutet.<sup>157</sup> Zu dem chemisch verwandten Sevofluran konnte trotz seiner Wirkung am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor bis heute kein Hinweis auf neurodegenerative Effekte nach neonataler Anwendung gefunden werden.<sup>159</sup> Inhalativen Anästhetika wie Isofluran und Sevofluran werden nach Studienergebnissen *in vivo* und *in vitro* sogar neuroprotektive Eigenschaften bei vorübergehenden Phasen intraoperativer Ischämie und Hypoglykämie zugeschrieben.<sup>160,161</sup> Bei transient supprimierter O<sub>2</sub>- und Glucose-Versorgung von reifen, gemischten zerebralen Zellkulturen der Ratte konnte *in vitro* die Glutamat-Aufnahme der Glia- und Nervenzellen durch Sevofluran stabilisiert werden.<sup>162</sup> Entsprechend zeigten die Tiere nach neonataler Sevofluran-Anästhesie in den Verhaltenstests im Vergleich zu den anderen Gruppen keine umfassenden Defizite komplexer Lernmechanismen, sondern lediglich subtile Veränderungen des Angstverhaltens (vgl. 3.2.1.2.).

Eine Apoptose-induzierende Wirkung wird auch für das am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Komplex wirksame Medikament Midazolam beschrieben.<sup>163</sup> *In vitro* waren hier die Effekte auf Differenzierung und Entwicklung GABAerger Neurone allerdings sehr unterschiedlich<sup>154</sup>: Auch hohe Konzentrationen von Midazolam (>25 µg/ml) schienen weit geringere Effekte auf die neuronale Differenzierung und Überlebensrate der Zellen auszuüben als geringe Dosen von Propofol. Eine Hypothese zur Erklärung dieses Phänomens ist der unterschiedliche Angriffsort am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Komplex: Während Propofol die Phosphorylierung an der β-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors induziert, greifen Benzodiazepine selektiv die α-Untereinheit des Rezeptors an.<sup>164</sup> Eine weitere Erklärung ergibt sich aus der Vermutung, dass Propofol im Gegensatz zu Benzodiazepinen auch über GABA<sub>A</sub>-unabhängige Wirkmechanismen verfügt. So wurde für Propofol auch eine inhibitorische Wirkung am NMDA-Rezeptor bei hippokampalen Neuronen beschrieben

sowie die Fähigkeit zur Signalinterferenz mittels nikotinerger Acetylcholin-Rezeptoren<sup>165</sup> und Ca<sup>2+</sup>-Kanälen vom T-Typ<sup>166</sup>.

Da Midazolam im klinischen Alltag häufig als Prämedikation vor einer Narkose verabreicht wird, wurden in der hier vorliegenden Studie nicht die Auswirkungen von Midazolam allein, sondern die der Anwendung in Kombination mit anderen Anästhetika getestet, um die Frage nach additiven oder synergistischen Effekten bei der Gabe mehrerer anästhetischer Wirkstoffe zu untersuchen. Ein Argument für die Anwendung von Kombinationsnarkosen allgemein ist die Vermutung, dass potenzielle Nebenwirkungen der Einzelsubstanzen durch die geringere Dosierung bei kombinierter Anwendung verringert werden können. Diese Hypothese ist bis dato nicht wissenschaftlich belegt. Fredriksson et al. zeigten 2007, dass bei zehn Tage alten Mäusen eine Kombinationsnarkose aus einem GABA<sub>A</sub>-Agonisten (Propofol oder Thiopental) und Ketamin, einem NMDA-Antagonisten, apoptotische Neurodegeneration mit resultierenden kognitiven Defiziten zur Folge hatte, die Mononarkose mit Propofol oder Thiopental jedoch kaum.<sup>76</sup>

Tiere, die in hier vorliegender Studie neonatal mit einer Kombinationsnarkose aus Midazolam, Propofol und Sevofluran behandelt worden waren, zeigten sechs bzw. zehn Wochen später Verhaltensauffälligkeiten im *Open-Field*- und *Hole-Board*-Test, die an die Auswirkungen der Mononarkosen mit Propofol und Sevofluran erinnerten (vgl. Abschnitt 3.2.1.3. und 3.2.4.3.). Dass die signifikanten Unterschiede im *Hole-Board*-Test der Tiere mit Kombinationsnarkose in nur einer der drei gemessenen Kategorien zu finden waren, könnte eventuell auf die Dosisreduzierung der Anästhetika zurückzuführen sein – insbesondere auf die hier verminderte Propofol-Dosis, bei dessen Einzeltestung Verhaltensauffälligkeiten in zwei Kategorien signifikant auftraten. Experimentelle Studien zeigten jedoch bisher auf, dass gerade die Kombination mehrerer Substanzen Schädigungen auf zerebrokortikaler Ebene potenzieren kann.<sup>156,163</sup> Die simultane Gabe niedriger Konzentrationen von Lachgas und Ketamin bewirkte beispielsweise eine ausgeprägtere Neurodegeneration als es die einfache Addition beider Einzelwirkungen erklären konnte.<sup>156</sup> Eine ähnlich potenzierende Wirkung schien die Simultangabe von Midazolam und Ketamin<sup>163</sup> oder eine Kombinationsnarkose mit Isofluran, Lachgas und Midazolam<sup>74</sup> zu haben. Die verhaltenspharmakologischen Auswirkungen von Midazolam als Einzelsubstanz wurden bislang in der Literatur und auch in der vorliegenden Studie nicht untersucht.

## 4.5. Methodenkritik

Legen die oben genannten Ergebnisse der tierexperimentellen Verhaltensuntersuchungen die Hypothese nahe, dass Langzeitfolgen einer neonatalen Anästhesie tatsächlich vorhanden und nachweisbar sind, so muss dennoch geprüft werden, mit welcher Eindeutigkeit die hier aufgetretenen Verhaltensauffälligkeiten auf die neonatale Anwendung der Anästhetika zurückzuführen sind. Das Kapitel 4.5. befasst sich deshalb mit den Kritikpunkten der Methodik und des experimentellen *Settings* bei der Behandlung der Tiere. Hierbei spielen vor allem die physiologischen Unterschiede und Besonderheiten einer Ratte im Vergleich zum Menschen eine wichtige Rolle.

### 4.5.1. Dauer der Exposition gegenüber Anästhetika

Einen interessanten Gedanken verfolgten Clancy et al. 2001, indem sie die artspezifische Dauer der Gehirnentwicklung verschiedener Säugetiere in zeitlicher Relation zu ihrer Lebensdauer betrachteten, und dabei errechneten, dass eine Behandlungsdauer von wenigen Stunden beim Menschen einer Medikamentenexposition von einigen Wochen bei der Ratte entspricht.<sup>167</sup> Aus dieser Überlegung würde folgen, dass die neurodegenerativen Veränderungen im hier vorliegenden Versuchsmodell nach übermäßig langer Medikamentenexposition auftraten – vergleichbar mit der Schädigung bei fetaler Alkoholembryopathie nach monatelanger Exposition durch einen maternalen Alkoholmißbrauch. Dies ist ein häufig zu findender Kritikpunkt in Studien zur Neurotoxizität von Anästhetika.<sup>111</sup> Ergebnisse neuerer Studien scheinen diesen Einwand zu widerlegen: Auch durch einmalige Exposition gegenüber Narkosemitteln in subanästhetischer Dosis konnten zwei- bis vierfach erhöhte Apoptoseraten im Gehirn von Mäusen während der Phase der Synaptogenese hervorgerufen werden.<sup>163</sup> *In vitro* wurde beobachtet, dass auch kurze Einwirkzeiten von Anästhetika die neuronale Entwicklung durch Störung von Dendritenwachstum und -ramifikation ungünstig beeinflussen können, ohne Apoptosen zu induzieren.<sup>154,168</sup>

#### 4.5.2. Folgen von intra-/postoperativer Mangelernährung

Die neugeborenen Ratten waren während der Behandlung mit Anästhetika vom Muttertier getrennt (d. h. sie erhielten keine Muttermilch) und begannen wegen der prolongierten Wirkung der Anästhetika erst ca. drei bis fünf Stunden nach Rückkehr zum Muttertier suffizient zu trinken. Parallel zeigten die behandelten Tiere der vorliegenden Studie 24 Stunden nach der Behandlung eine geringere Gewichtszunahme (vgl. Abschnitt 3.5.) als die Kontrolltiere, welche möglicherweise auf das initial veränderte Trinkverhalten zurückzuführen war. Signifikant reduziertes Gewicht war bei den herangewachsenen Tieren (sechs Wochen später) zwar nicht mehr zu beobachten, doch haben klinische und experimentelle Studien einen Zusammenhang zwischen Mangelernährung im Kindesalter und verminderter Gehirnentwicklung mit Lernbehinderungen bei menschlichen Säuglingen gezeigt<sup>124,125,169,170</sup>.

Als „Mangelernährung“ wird in diesen Studien die verminderte Kalorienaufnahme und die daraus resultierende, über einen längeren Zeitraum bestehende Hypoglykämie bezeichnet. Früh- und Neugeborene sowie Kinder mit einem zusätzlichen Risiko zur Hypoglykämie erhalten perioperativ für eine kontinuierliche Glucosezufuhr von 5 mg/kg/min (Vollelektrolytlösungen mit 1 – 2,5 %iger Glucose).<sup>26,171</sup>

Um hypoglykämischen Zuständen vorzubeugen, bekamen die Versuchstiere in hier vorliegender Studie während der Behandlung 0,5 ml 5%ige Glucose-Lösung subkutan appliziert. Hypoglykämie ist deshalb als Ursache der reduzierten Gewichtszunahme während der Behandlung weniger wahrscheinlich als vielmehr ein vorübergehender Mangel an Mineralstoffen (insbesondere Calcium), Proteinen und Fetten zum Aufbau von Knochen, sowie Muskel- und Fettgewebe.

#### 4.5.3. „Monitoring“ der Tiere während der Behandlung

Anästhetika wirken nicht nur auf das ZNS, sondern beeinflussen dosisabhängig auch Kreislauf und Atmung, sodass aus einer Überdosierung verminderte Organperfusion, Gewebshypoxie und -azidose resultieren können. Diese können wiederum Ursachen für vermehrte Apoptosevorgänge sein. Eine qualitativ vergleichbare, kontinuierliche

Überwachung der Vitalparameter wie beim Menschen ist bei neugeborenen Ratten jedoch nicht durchführbar.

Die Möglichkeit der Überwachung der Tiere mittels Blutgasanalysen erwies sich ebenfalls als schwierig: Eine Gefäßpunktion bei den kleinen Tieren (mit einem Körpergewicht von ca. 10-23 g) war in Pilotversuchen nicht durchführbar. Eine direkte kardiale Punktion beeinflusste Kreislauf und Gasaustausch (z. B. durch eine hohe punktionsbedingte Inzidenz von Pneumothoraces) derart, dass Blutgasanalysen dieses Punktats keine verlässlichen Werte erbrachten, und die Blutentnahme auf Grund des ohnehin geringen Blutvolumens der Tiere häufig mit deren Tod einherging. (Der Tod der beiden neugeborenen Tiere, die während der Propofol- bzw. Kombinationsnarkose starben (vgl. Abb. 7 A und C), trat möglicherweise in Folge einer perforierenden Gefäß- oder Darmverletzung durch die Blindpunktion des Intrapertonealraums ein.)

Obwohl zur Prophylaxe eines intravasalen Volumendefizits intermittierend ein Flüssigkeitsbolus subkutan injiziert wurde, konnte eine Zielparameter-orientierte Überwachung des Volumenhaushaltes nicht erfolgen. Stattdessen wurden engmaschig die Atemfrequenz, das Hautkolorit und die motorische Reaktion durch ein Punkte-System überwacht (vgl. Abschnitt 2.3.: Tabelle 2). Bei der Betrachtung der dokumentierten Punkteverläufe ist festzustellen, dass alle behandelten Tiere mit einer Atemfrequenz > 40/min und rosigem Hautkolorit stets kardiorespiratorisch stabil waren und gleichzeitig bei verringerter, aber nicht fehlender motorischer (Rest-)Aktivität eine angemessene Narkosetiefe erreicht wurde.

#### **4.5.4. Dosis-abhängige Wirkung von Anästhetika**

Die verwendeten Anästhetika zeigten ein dosisabhängiges Wirkspektrum. Die bei den neugeborenen Versuchstieren angewendete Propofol-Dosis von 3 x 30 mg/kg KG bei der Testung als Einzelsubstanz lag ebenso wie die halbe Propofol-Dosis in der Kombinationsnarkose weit über der bei Säuglingen und Kleinkindern gebräuchlichen Dosierung von 2-5 mg/kg KG bei der Einleitung und 5-10 mg/kg KG/h für die Narkoseaufrechterhaltung. In der Veterinärmedizin ist bekannt, dass die zur Narkose benötigte Dosis für kleinere Tiere höher liegt als für größere.<sup>172</sup> So beträgt beispielsweise die entsprechende Dosis von Midazolam für eine Maus (5 mg/kg KG) das Fünffache der Dosis für ein Kaninchen (1 mg/kg KG).<sup>173</sup>

In Pilotversuchen wurden Dosisfindungsuntersuchungen mit dem Ziel einer tiefen Narkose bei erhaltener Spontanatmung durchgeführt. Niedrigere Dosierungen führten zu keiner ausreichenden Narkosetiefe. Möglicherweise beeinflusste der gewählte Applikationsweg ebenfalls die erforderliche Dosis.

Dennoch ist die Betrachtung der Ergebnisse der Verhaltenstests in Bezug auf die unterschiedliche Dosierung von Propofol interessant: Das schlechtere Abschneiden der Tiere mit Propofol-Mononarkose (Propofol-Dosis: 3 x 30 mg/kg KG) im *Hole-Board*-Test im Vergleich zu den Tieren mit Kombinationsnarkose (Propofol-Dosis: 3 x 15 mg/kg KG) könnte durch eine dosisabhängige neuronale Schädigung erklärt werden. Aus dieser Hypothese würde eine vorrangige Schädigung durch Propofol auch während der Kombinationsnarkose folgen.

#### 4.5.5. Die Rolle von Schmerzstimuli und „Erleben“ der Narkose

Es wird vermutet, dass wiederholte Schmerzstimuli in der Neonatalphase ähnlich wie die Trennung vom Muttertier<sup>123</sup> als Stressfaktor zu vermehrten Apoptosevorgängen führen können.<sup>174</sup> Einen Schmerzstimulus erhielten jedoch nicht nur die behandelten Tiere beim Einstich der Kanüle (für die i.p.-Medikamentenapplikation) – wobei die behandelten Tiere nur bei der ersten Injektion „wach“ waren – , sondern auch die Kontrolltiere bei der subkutanen Injektion der Glucose-Lösung (vgl. Abschnitt 2.3.1. und 2.3.3.).

Da auch intraperitoneale Injektionen physiologischer NaCl-Lösung ohne anästhetisches Agens (sog. *sham injections*) Veränderungen im Verhalten hervorzurufen scheinen,<sup>175</sup> ist eine berechtigte Kritik am Modell das Fehlen solcher Placebo-Injektionen.

Gascon et al. äußerten den Hinweis, dass der perioperative Stress, der unter klinischen Bedingungen für ein gesteigertes Exzitationsniveau am NMDA-Rezeptor sorgen würde, im Tiermodell im Vergleich zur klinischen Situation fehlt.<sup>109</sup> Auf dieser Grundlage wird von der Arbeitsgruppe argumentiert, dass ohne die gesteigerte NMDA-Exzitation als Ausgangssituation – wie es im klinischen Kontext der Fall sei – die Anwendung von Anästhetika zur einer Suppression des normalen, basalen Exzitationsniveaus führe.<sup>176</sup>

#### 4.6. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie zeigt, dass adulte Tiere nach neonataler Propofol-Narkose signifikante Unterschiede im Habitationsverhalten gegenüber unbehandelten Kontrolltieren aufweisen können. Diese Defizite waren bei der Versuchstiergruppe mit neonataler Kombinationsnarkose ebenfalls zu beobachten.

Auch Sevofluran-behandelte Tiere zeigten signifikante Verhaltensauffälligkeiten: Im *Open-Field*-Test fiel ein Vermeidungsverhalten gegenüber der inneren offenen Fläche der Testapparatur auf (vgl. Abschnitt 3.1.2.), was als Ängstlichkeit der Tiere gedeutet werden kann.<sup>35</sup> Histologisch konnte jedoch nach neonataler Sevofluran-Narkose - im Gegensatz zu Propofol- und Kombinationsnarkose – von unserer Arbeitsgruppe keine signifikant erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden.<sup>177</sup>

Bei Tieren, die neonatal eine Kombinationsnarkose mit Propofol, Sevofluran und Midazolam erhalten hatten, wurde im *Open-Field*-Test dasselbe Verhaltensmuster wie bei der Sevoflurangruppe beobachtet (vgl. Abschnitt 3.1.3.).

Die eindeutige Zuweisung zu einer Substanz als Ursache für die beobachteten Verhaltensdefizite nach einer Kombinationsnarkose bleibt jedoch schwierig, da zum einen auch für Midazolam eine Apoptose-induzierende Wirkung nachgewiesen ist,<sup>178</sup> und zum anderen die unterschiedliche Dosierung der Einzelsubstanzen sowie Interaktionen der Medikamente untereinander das Geschehen auf zellulärer Ebene maßgeblich beeinflussen können.<sup>156,163</sup>

Für Propofol, Sevofluran und Midazolam gilt eine stimulierende Wirkung am inhibitorischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor als nachgewiesen.<sup>32,37</sup> In Anbetracht dieses gemeinsamen Wirkmechanismus der drei untersuchten Substanzen unterstützen die vorgestellten Daten die Hypothese, dass die Stimulation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors einen Pathomechanismus für apoptotische Neurodegeneration darstellt. Die dennoch sehr unterschiedlichen Ergebnisse der drei getesteten Tiergruppen in den Verhaltenstests - insbesondere im Vergleich zwischen Propofol- und Sevofluran-behandelten Tieren - könnten dadurch erklärt werden, dass zusätzlich zur GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Stimulation sowohl für Propofol als auch für Sevofluran eine Vielzahl unterschiedlicher Ligand-gesteuerter Ionenkanäle bei der Wirkungsentfaltung beschrieben sind<sup>32</sup>, die das neurotoxische Potenzial der Substanzen möglicherweise mitbeeinflussen. Beispielsweise wird die für Propofol nachgewiesene glutamaterge Wirkung am NMDA-

Rezeptor,<sup>32</sup> durch welche die regelrechte Entwicklung des Hippokampus ebenfalls gestört werden kann<sup>148</sup>, für Sevofluran noch diskutiert.<sup>32,54,69,70</sup>

#### 4.7. Ausblick

Auf der Suche nach Strategien, um oben beschriebene Nebenwirkungen der neonatalen Anwendung von Anästhetika zu vermeiden bzw. zu verringern, wurde in tierexperimentellen Apoplex-Versuchen und bei neurodegenerativen Erkrankungen die Gabe von 17- $\beta$ -Estradiol als mögliche Form der Neuroprotektion beschrieben.<sup>179</sup> Das Hormon scheint hierbei die mitochondriale Funktion zu stabilisieren, welche bei neuronalen Zellnekrosen bzw. -apoptosen und damit bei der Ätiologie neurodegenerativer Erkrankungen eine entscheidende Rolle spielt.<sup>180</sup> Kürzlich wurde 17- $\alpha$ -Estradiol, ein Struktur analogon des  $\beta$ -Estradiols, als Neuroprotektivum vorgestellt, das bezüglich seiner neuroprotektiven Eigenschaften genauso effektiv wie sein Isomer, jedoch nur in äußerst geringem Maße hormonaktiv ist,<sup>181</sup> was den Einsatz dieser Substanz als vielversprechende Möglichkeit zur Neuroprotektion erscheinen lässt.

In *in vivo*-Versuchen wurde nach Gabe von Neurotrophen wie BDNF eine Neuroprotektion nach Ischämie/Hypoxie<sup>182</sup> sowie in Epilepsie- und Trauma-Modellen<sup>183,184</sup> erreicht.

Auch Melatonin konnte – vermutlich durch antioxidative Wirkung – die neurotoxische Wirkung einer Narkosekombination aus Isofluran, Lachgas und Midazolam zu reduzieren.<sup>185</sup> In ersten klinischen Untersuchungen mit rekombinanten Erythropoietin bei Patienten mit einem Verschluss der Arteria cerebri media erwies sich Erythropoietin als neuroprotektiv, indem sich das Infarktareal reduzierte und sich der neurologische Zustand verbesserte.<sup>186</sup> Es besteht deshalb die Hypothese, dass rekombinantes Erythropoietin als präventives Neuroprotektivum für kranke Früh- und Neugeborene eingesetzt werden könnte, die im Rahmen einer Sedierung, Schmerztherapie oder Narkose zwangsläufig Medikamenten mit evtl. neurotoxischem Potenzial ausgesetzt sind.

Trotz der neuroprotektiven Möglichkeiten bleibt die Neurotoxizität von Anästhetika in der Neonatalperiode ein viel diskutiertes Thema in der Literatur.<sup>109,111,187,188</sup> Obwohl aus tierexperimentellen Ergebnissen nur eine sehr unpräzise Risikoevaluation für den

Menschen erfolgen kann, können diese Untersuchungen vielleicht dennoch einen Beitrag zur Entwicklung neuroprotektiver Strategien in der Kinderanästhesie leisten. Da systematische Studien zur Neurotoxizität bei unterschiedlicher Dosis und Expositionszeit an menschlichen Neugeborenen aus ethischen Gründen nicht möglich sind, erscheinen zukünftige Untersuchungen an Primaten als Ausblick sinnvoll.

Die Frage, ob die Kurzzeitanwendung von Anästhetika in der Neonatalperiode beim Menschen permanente kognitive Defizite verursacht, bleibt offen. Die Notwendigkeit einer adäquaten Anästhesie bei chirurgischen Eingriffen an Früh- und Neugeborenen sowie an Kleinkindern ist jedoch belegt<sup>189-191</sup> und muss trotz der hier diskutierten Beobachtungen gefordert werden.

Die hier dargestellten Ergebnisse sollten dazu auffordern, klinische Studien zu diesem Thema zu initiieren, da nur auf diesem Wege letztlich die Lücke zwischen *in-vitro*-Neurowissenschaft und klinischer Medizin überbrückt werden kann.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Untersuchung wurden die funktionellen Auswirkungen des Einsatzes von Anästhetika in der Neonatalperiode untersucht.

Neurodegenerative Effekte nach Anwendung von GABAergen und glutamatergen Medikamenten während der Phase der Synaptogenese wurden in der Literatur mehrfach beschrieben.<sup>71,74,76</sup> In histologischen Untersuchungen konnten durch eine Kombinationsnarkose mit Midazolam, Lachgas und Isofluran bei neugeborenen Ratten erhöhte Apoptoseraten insbesondere im Hippokampus induziert werden.<sup>74</sup> Auch nach Anästhesie mit Propofol als Einzelsubstanz sowie einer Kombinationsnarkose aus Ketamin und Propofol bzw. Ketamin und Thiopental wurde im neonatalen Gehirn von Ratten ein neurotoxischer Effekt nachgewiesen.<sup>76</sup>

Um die langfristigen Auswirkungen einer solchen neuronalen Schädigung nach neonataler Exposition gegenüber Anästhetika detailliert zu untersuchen, wurden drei Gruppen Wistar-Ratten am sechsten Lebenstag jeweils mit Propofol und Sevofluran als Einzelsubstanz sowie mit einer Narkosekombination beider Medikamente mit Midazolam behandelt und anschließend ab einem Alter von sieben Wochen ausführlichen Verhaltenstests unterzogen.

Die motorische Aktivität wurde sowohl im *Open-Field*-Test als auch im Heimatkäfig untersucht. Der sog. *Morris-Water-Maze*-Test diente der Überprüfung des räumlichen Lernens. Hierbei müssen die Tiere innerhalb von acht Tagen lernen, in einem Wasserbecken eine für sie nicht sichtbare Plattform zu finden. Um das Habituationlernen, d. h. das Sich-Gewöhnen an eine neue Umgebung, zu untersuchen, wurde der *Hole-Board*-Test an zwei aufeinander folgenden Tagen durchgeführt. Zwischen den einzelnen Test wurde eine Pause von einer Woche eingefügt, in der die Tiere ungestört in ihrem Heimatkäfig belassen wurden.

Die behandelten Ratten zeigten hierbei dieselbe Gewichtszunahme wie die Kontrolltiere. Auch in den Untersuchungen zur motorischen Aktivität im Heimatkäfig sowie zum räumlichen Lernen ergaben sich keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. So erlernten alle behandelten Tiere im *Morris-Water-Maze*-Test gleich schnell

wie die Kontrolltiere, in einem Wasserbecken eine Plattform zu lokalisieren, die sich – für die Tiere nicht sichtbar – knapp unter der Wasseroberfläche befand.

Im *Hole-Board*-Test zeigte sich jedoch, dass die Tiere mit neonataler Propofol-Narkose weniger an die neue Umgebung habituierten als die Kontrolltiere. So erkundeten sie die Apparatur am zweiten Versuchstag noch genauso intensiv wie am ersten.

Sevofluran-behandelte Tiere zeigten im *Open-Field*-Test signifikante Verhaltensauffälligkeiten, welche auf vermehrte Ängstlichkeit hindeuten.

Bei der Testung der Tiere, die neonatal eine Kombinationsnarkose erhalten hatten, konnten die Ergebnisse der Propofol- und Sevofluran-Einzeltestungen qualitativ wiederholt werden, jedoch – vermutlich aufgrund der reduzierten Dosis von Propofol und Sevofluran im Kombinationschema – mit geringerer Ausprägung.

Insgesamt zeigen die Untersuchungen, dass die neonatale Narkose mit Propofol (als Einzelsubstanz sowie in Kombination mit Sevofluran und Midazolam) zu keinen Veränderungen der motorischen Aktivität bei den adulten Ratten führte; der Einfluss auf das Lernverhalten muss differenziert betrachtet werden. Während das räumliche Lernen nicht beeinträchtigt war, so scheint Propofol - appliziert als neonatale Mononarkose sowie in Kombination mit Midazolam und Sevofluran - zu längerfristigen Defiziten beim Habituationlernen führen zu können. Derartige Veränderungen konnten nach neonataler Anästhesie mit Sevofluran nicht beobachtet werden.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neonatale Mononarkosen mit Propofol wie auch Kombinationsnarkosen von Propofol, Sevofluran und Midazolam durch Einfluss auf hippocampale Zellen kognitive Defizite verursachen können, die sich bis ins Erwachsenenalter nachweisen lassen.

Da zu den Langzeitfolgen der neonatalen Anwendung von Anästhetika keine klinischen Studien vorliegen, muss die Interpretation dieser Daten und die Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen mit großer Vorsicht geschehen, und klinische Studien sollten initiiert werden.

**6. LITERATURVERZEICHNIS:**

1. Würtz F: The Children's Book. Frankfurt, 1563. (Englische Übersetzung: London, 1656)
2. Meigs J: A Practical Treatise on the Diseases of Children. Philadelphia, Lindsay and Blackiston, 1853:23. 1853
3. Darwin C: The Expression of Emotions in Man and Animals. 1. Ausgabe 1872
4. Flechsig PE: Über Entwicklung der Markweiße im centralen Nervensystem (Vortrag). Tagebl 45. Vers dt Naturforscher Aerzte in Leipzig vom 12. bis 18. August 1872. Leipzig, 1872
5. Cope DK: Neonatal Pain: The Evolution of an Idea. ASA Newsletter No 9 1998 Sept; 62
6. Rees GJ: Anaesthesia in the newborn. Br Med J 1950; 2: 1419-22
7. Anand KJS, Hickey PR: Pain and its effects in the human neonate and fetus. N Engl J Med 1987; 317: 1321-9
8. André-Thomas: Études neurologiques sur le nouveau-né et le jeune nourrisson. Masson et Cie, Paris 1952:1
9. Lippmann M, Nelson RJ, Emmanouilides GC, Diskin J, Thibeault DW: Ligation of patent ductus arteriosus in premature infants. Br J Anaesth 1976; 48: 365-9
10. Shearer MH: Surgery on the paralyzed, unanesthetized newborn. Birth 1986; 13: 79
11. Norman EA: Pulse oximetry during repair of congenital diaphragmatic hernia. Br J Anaesth 1986; 58: 934-5
12. Katz J: The question of circumcision. Int Surg 1977; 62: 490-2
13. Obara H, Sugiyama D, Maekawa N et al.: Plasma cortisol levels in paediatric anaesthesia. Can Anaesth Soc J 1984; 31: 24-7
14. Talbert LM, Kraybill EN, Potter HD: Adrenal cortical response to circumcision in the neonate. Obstet Gynecol 1976; 48: 208-10

15. Gunnar MR, Fisch RO, Korsvik S, Donhowe JM: The effects of circumcision on serum cortisol and behavior. *Psychoneuroendocrinology* 1981; 6: 269-75
16. Anand KJS, Brown MJ, Bloom SR, Aynsley-Green A: Studies on the hormonal regulation of fuel metabolism in the human newborn infant undergoing anaesthesia and surgery. *Horm Res* 1985; 22: 115-28
17. Holve RL, Bromberger PJ, Groveman HD et al.: Regional anesthesia during newborn circumcision. Effect on infant pain response. *Clin Pediatr (Phila)* 1983; 22: 813-8
18. Dixon S, Snyder J, Holve R, Bromberger P: Behavioral effects of circumcision with and without anesthesia. *J Dev Behav Pediatr* 1984; 5: 246-50
19. Seyberth JH: Mehr Arzneimittelsicherheit für Kinder. *Dtsch Ärztebl* 1999; 96: 547-50
20. Conroy S, Choonara I, Impicciatore P et al.: Survey of unlicensed and off label drug use in paediatric wards in European countries. *European Network for Drug Investigation in Children. BMJ* 2000; 320: 79-82
21. Dell'Aera M, Gasbarro AR, Padovano M et al.: Unlicensed and off-label use of medicines at a neonatology clinic in Italy. *Pharm World Sci* 2007; 29: 361-7
22. Di Paolo ER, Stoetter H, Cotting J et al.: Unlicensed and off-label drug use in a Swiss paediatric university hospital. *Swiss Med Wkly* 2006; 136: 218-22
23. 't Jong GW, van der Linden PD, Bakker EM et al.: Unlicensed and off-label drug use in a paediatric ward of a general hospital in the Netherlands. *Eur J Clin Pharmacol* 2002; 58: 293-7
24. Neubert A, Dormann H, Weiss J et al.: The impact of unlicensed and off-label drug use on adverse drug reactions in paediatric patients. *Drug Saf* 2004; 27: 1059-67
25. FEAPA (Federation of European Associations of Paediatric Anaesthesia): Recommendations for Paediatric Anaesthesia Services in Europe. <http://www.feapa.org> [26.04.2008]. In deutscher Sprache veröffentlicht in: *Anästh Intensivmed* 2006;47:297-299
26. Jöhr M: *Kinderanästhesie* (S. 51-52). 6. Auflage. Elsevier GmbH Deutschland 2004. 338 Seiten. ISBN: 3437228307.
27. Bihlmayr J, Craß D, Sollmann V: *Kinderanästhesie (Kompendium)*. 5. überarbeitete Auflage Januar 2006. Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin, Klinikum Augsburg

28. Fachinformation: Trapanal® Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung ROTE LISTE®. Frankfurt/Main, Rote Liste® Service GmbH, Mai 2008
29. Fachinformation: Fentanyl HEXAL® 0,1 mg/-0,5 mg Injektionslösung ROTE LISTE®. Frankfurt/Main, Rote Liste® Service GmbH, Mai 2008
30. Fachinformation: Propofol 1% / -2% MCT Fresenius, Emulsion i.v., ROTE LISTE®. Frankfurt/Main, Rote Liste® Service GmbH, Mai 2008
31. Trapani G, Altomare C, Liso G, Sanna E, Biggio G: Propofol in anesthesia. Mechanism of action, structure-activity relationships, and drug delivery. *Curr Med Chem* 2000; 7: 249-71
32. Rudolph U, Antkowiak B: Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* 2004; 5: 709-20
33. AkdÄ (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft): Sexuelle Phantasien bei kurzen Eingriffen unter Narkose. *Dtsch Ärztebl* 1998; 95: 691
34. AkdÄ (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft): Verzögert auftretende Krampfanfälle nach Propofol - Vorsicht beim ambulanten Operieren! *Dtsch Ärztebl* 1994; 91: 666
35. Vasile B, Rasulo F, Candiani A, Latronico N: The pathophysiology of propofol infusion syndrome: a simple name for a complex syndrome. *Intensive Care Med* 2003; 29: 1417-25
36. Motsch J, Roggenbach J: Propofol infusion syndrome. *Anaesthesist* 2004; 53: 1009-24
37. Hapfelmeier G, Schneck H, Kochs E: Sevoflurane potentiates and blocks GABA-induced currents through recombinant alpha1beta2gamma2 GABAA receptors: implications for an enhanced GABAergic transmission. *Eur J Anaesthesiol* 2001; 18: 377-83
38. Stucke AG, Zuperku EJ, Krolo M et al.: Sevoflurane enhances gamma-aminobutyric acid type A receptor function and overall inhibition of inspiratory premotor neurons in a decerebrate dog model. *Anesthesiology* 2005; 103: 57-64
39. Conzen P: Sevofluran-Kompendium: Inhalationsanästhetikum, ISBN 3-926035-58-7. Wiesbaden, Wiss. Verl.-Abt. Abbott GmbH, 2001
40. Müllenheim J, Ebel D, Bauer M et al.: Sevoflurane confers additional cardioprotection after ischemic late preconditioning in rabbits. *Anesthesiology* 2003; 99: 624-31

41. Obal D, Scharbatke H, Barthel H et al.: Cardioprotection against reperfusion injury is maximal with only two minutes of sevoflurane administration in rats. *Can J Anaesth* 2003; 50: 940-5
42. Pypendop BH, Ilkiw JE: Hemodynamic effects of sevoflurane in cats. *Am J Vet Res* 2004; 65: 20-5
43. Siracusano L, Girasole V: Sevoflurane and cardioprotection. *Br J Anaesth* 2008; 100: 278; author reply 278-9
44. Trieschmann U: Kommentar zu dem Artikel: Excitation following sevoflurane: a problem in pediatric anesthesia? (erschienen in *Der Anaesthesist* 1999;48:917-18). *Der Anaesthesist* 2000; 49: 551-2
45. Kohno T, Kumamoto E, Baba H et al.: Actions of midazolam on GABAergic transmission in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. *Anesthesiology* 2000; 92: 507-15
46. Fachinformation: Dormicum® Injektionslösung, ROTE LISTE®. Frankfurt/Main, Rote Liste® Service GmbH, Mai 2008
47. Hartke RH, Jr., Gonzalez-Rothi RJ, Abbey NC: Midazolam-associated alterations in cardiorespiratory function during colonoscopy. *Gastrointest Endosc* 1989; 35: 232-8
48. Taylor JW, Simon KB: Possible intramuscular midazolam-associated cardiorespiratory arrest and death. *Dicp* 1990; 24: 695-7
49. Roback MG, Wathen JE, Bajaj L, Bothner JP: Adverse events associated with procedural sedation and analgesia in a pediatric emergency department: a comparison of common parenteral drugs. *Acad Emerg Med* 2005; 12: 508-13
50. Magny JF, d'Allest AM, Nedelcoux H, Zupan V, Dehan M: Midazolam and myoclonus in neonate. *Eur J Pediatr* 1994; 153: 389-90
51. Harte GJ, Gray PH, Lee TC, Steer PA, Charles BG: Haemodynamic responses and population pharmacokinetics of midazolam following administration to ventilated, preterm neonates. *J Paediatr Child Health* 1997; 33: 335-8
52. Massanari M, Novitsky J, Reinstein LJ: Paradoxical reactions in children associated with midazolam use during endoscopy. *Clin Pediatr (Phila)* 1997; 36: 681-4
53. Bergman I, Steeves M, Burckart G, Thompson A: Reversible neurologic abnormalities associated with prolonged intravenous midazolam and fentanyl administration. *J Pediatr* 1991; 119: 644-9

54. Franks NP: General anaesthesia: from molecular targets to neuronal pathways of sleep and arousal. *Nat Rev Neurosci* 2008; 9: 370-86
55. Sonner JM, Antognini JF, Dutton RC et al.: Inhaled anesthetics and immobility: mechanisms, mysteries, and minimum alveolar anesthetic concentration. *Anesth Analg* 2003; 97: 718-40
56. Campagna JA, Miller KW, Forman SA: Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* 2003; 348: 2110-24
57. Yamakura T, Bertaccini E, Trudell JR, Harris RA: Anesthetics and ion channels: molecular models and sites of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 23-51
58. Patel AJ, Honore E: Anesthetic-sensitive 2P domain K<sup>+</sup> channels. *Anesthesiology* 2001; 95: 1013-21
59. Franks NP, Lieb WR: Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 1994; 367: 607-14
60. Lodge D, Anis NA: Effects of phencyclidine on excitatory amino acid activation of spinal interneurons in the cat. *Eur J Pharmacol* 1982; 77: 203-4
61. Franks NP, Dickinson R, de Sousa SL, Hall AC, Lieb WR: How does xenon produce anaesthesia? *Nature* 1998; 396: 324
62. Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM, Mennerick S et al.: Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant and neurotoxin. *Nat Med* 1998; 4: 460-3
63. Mennerick S, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM et al.: Effect of nitrous oxide on excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. *J Neurosci* 1998; 18: 9716-26
64. Jurd R, Arras M, Lambert S et al.: General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA(A) receptor beta3 subunit. *FASEB J* 2003; 17: 250-2
65. Reynolds DS, Rosahl TW, Cirone J et al.: Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA(A) receptor isoforms. *J Neurosci* 2003; 23: 8608-17
66. de Sousa SL, Dickinson R, Lieb WR, Franks NP: Contrasting synaptic actions of the inhalational general anesthetics isoflurane and xenon. *Anesthesiology* 2000; 92: 1055-66

67. Cull-Candy S, Brickley S, Farrant M: NMDA receptor subunits: diversity, development and disease. *Curr Opin Neurobiol* 2001; 11: 327-35
68. Flohr H, Glade U, Motzko D: The role of the NMDA synapse in general anesthesia. *Toxicol Lett* 1998; 100-101: 23-9
69. Solt K, Eger EI, 2nd, Raines DE: Differential modulation of human N-methyl-D-aspartate receptors by structurally diverse general anesthetics. *Anesth Analg* 2006; 102: 1407-11
70. Ogata J, Shiraishi M, Namba T et al.: Effects of anesthetics on mutant N-methyl-D-aspartate receptors expressed in *Xenopus oocytes*. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 318: 434-43
71. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M et al.: Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 1999; 283: 70-4
72. Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ et al.: Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 2000; 287: 1056-60
73. Ishimaru MJ, Ikonomidou C, Tenkova TI et al.: Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 1999; 408: 461-76
74. Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y et al.: Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 2003; 23: 876-82
75. Weise M, Dreykluft C, Bercker S, Bittigau P, Kerner T: Untersuchung auf neurodegenerative Effekte von Sevofluran und Propofol am Gehirn neugeborener Ratten. 8. Hauptstadtkongress für Anästhesie und Intensivmedizin (HAI), Berlin, Deutschland 2006
76. Fredriksson A, Ponten E, Gordh T, Eriksson P: Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology* 2007; 107: 427-36
77. Bittigau P, Sifringer M, Genz K et al.: Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002 Nov 12; 99: 15089-94
78. OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development): Series on Testing and Assessment No. 20: Guidance Document for Neurotoxicity Testing, OECD Environment, Health and Safety Publications. Paris, November 2004

79. Milner B, Squire LR, Kandel ER: Cognitive neuroscience and the study of memory. *Neuron* 1998; 20: 445-68
80. Pawlow IP: Selected Works. Central Books Ltd., London. 1955.
81. Hall CS: Emotional behaviour in the rat. I. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. *Journal of Comparative Psychology* 1934; 18: 385-403
82. File SE: Models of anxiety. *Br J Pract Suppl* 1985; 38: 15-20
83. Gilad GM: Differences in open-field behavior and in learning tasks between two rat strains in their reactivity to stressors. *Behav Brain Res* 1989; 32: 89-93
84. Archer J: Tests for emotionality in rats and mice: A review. *Animal Behav* 1973; 21: 205-35
85. Chaouloff F, Kulikov A, Saieau A, Castanon N, Mormede P: Male Fischer 344 and Lewis rats display differences in locomotor reactivity, but not in anxiety-related behaviours: relationship with the hippocampal serotonergic system. *Brain Res* 1995; 693: 169-78
86. Handley SL, Mithani S: Effects of alpha-adrenoceptor agonists and antagonists in a maze-exploration model of "fear"-motivated behaviour. *Nanyn Schmiedberg's Arch Pharmacol* 1984; 327: 1-5
87. Chaouloff F, Kulikov A, Sarrieau A, Castanon N, Mormede P: Male Fischer 344 and Lewis rats display differences in locomotor reactivity, but not in anxiety-related behaviours: relationship with the hippocampal serotonergic system. *Brain Res* 1995; 693: 169-78
88. TSE InfraMot: Animal activity measurement in home cages. TSE Systems - Product overview 2006: 3-6
89. D'Hooge R, De Deyn PP: Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; 36: 60-90
90. Morris RG: Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984; 11: 47-60
91. Wolfer DP, Mohajeri HM, Lipp HP, Schachner M: Increased flexibility and selectivity in spatial learning of transgenic mice ectopically expressing the neural cell adhesion molecule L1 in astrocytes. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 708-17
92. Durcan MJ, Lister RG: Does directed exploration influence locomotion activity in a holeboard test? *Behav Neurol Biol* 1989; 51: 121-5

93. Bert B, Fink H, Huston JP, Voits M: Fischer 344 and wistar rats differ in anxiety and habituation but not in water maze performance. *Neurobiol Learn Mem* 2002; 78: 11-22
94. Schildlein S, Huston JP, Schwarting RK: Injections of tacrine and scopolamine into the nucleus accumbens: opposing effects of immediate vs delayed posttrial treatment on memory of an open field. *Neurobiol Learn Mem* 2000; 73: 21-30
95. Moser VC, Padilla S: Age- and gender-related differences in the time course of behavioral and biochemical effects produced by oral chlorpyrifos in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1998; 149: 107-19
96. Tamas A, Lubics A, Szalontay L, Lengvari I, Reglodi D: Age and gender differences in behavioral and morphological outcome after 6-hydroxydopamine-induced lesion of the substantia nigra in rats. *Behav Brain Res* 2005; 158: 221-9
97. Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J: Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 1982; 297: 681-3
98. Logue SF, Paylor R, Wehner JM: Hippocampal lesions cause learning deficits in inbred mice in the Morris water maze and conditioned-fear task. *Behav Neurosci* 1997; 111: 104-13
99. Myhrer T: Neurotransmitter systems involved in learning and memory in the rat: a meta-analysis based on studies of four behavioral tasks. *Brain Res Brain Res Rev* 2003; 41: 268-87
100. Pearce JM, Roberts AD, Good M: Hippocampal lesions disrupt navigation based on cognitive maps but not heading vectors. *Nature* 1998; 396: 75-7
101. Moser E, Moser MB, Andersen P: Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. *J Neurosci* 1993; 13: 3916-25
102. Moser MB, Moser EI, Forrest E, Andersen P, Morris RG: Spatial learning with a minilab in the dorsal hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92: 9697-701
103. Griebel G: 5-Hydroxytryptamine-interacting drugs in animal models of anxiety disorders: more than 30 years of research. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 65: 319-95
104. Montgomery SA: The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behaviour. *J Comp Physiol Psychol* 1955; 48: 254-60

105. Stöhr T, Schulte-Wermeling D, Weiner I, Feldon J: Rat strain differences in open-field behaviour and the locomotor stimulating and rewarding effects of amphetamine. *Pharmacol Biochem Behav* 1998; 59: 813-8
106. Townsend P: Use of in-cage shelters by laboratory rats. *Animal Welfare* 1997; 6: 95-103
107. Costall B, Jones BJ, Kelly ME, Naylor RJ, Tomkins DM: Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety. *Pharmacol Biochem Behav* 1989; 32: 777-85
108. Sheldon MH: Exploratory behaviour: the inadequacy of activity measures. *Psycho Sci* 1968; 11: 38
109. Gascon E, Klauser P, Kiss JZ, Vutskits L: Potentially toxic effects of anaesthetics on the developing central nervous system. *Eur J Anaesthesiol* 2007; 24: 213-24
110. Weber SU, Schewe JC, Putensen C, Stuber F, Schroder S: [Apoptosis as a pathomechanism in sepsis]. *Anaesthesist* 2004; 53: 59-65
111. Anand KJ, Soriano SG: Anesthetic agents and the immature brain: are these toxic or therapeutic? *Anesthesiology* 2004; 101: 527-30
112. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57
113. Leist M, Jaattela M: Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 589-98
114. Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407: 770-6
115. Nakagawa T, Yuan J: Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000; 150: 887-94
116. Lu LX, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V: General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis* 2006 Sept.; 11: 1603-15
117. Teng KK, Hempstead BL: Neurotrophins and their receptors: signaling trios in complex biological systems. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61: 35-48
118. Rabacchi SA, Kruk B, Hamilton J et al.: DNF and NT4/5 promote survival and neurite outgrowth of pontocerebellar mossy fiber neurons. *J Neurobiol* 1999 40: 254-69

119. Huang EJ, Reichardt LF: Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24: 677-736
120. Bayer SA, Altman J, Russo RJ, Zhang X: Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. *Neurotoxicology* 1993; 14: 83-144
121. Dobbing J, Sands J: Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 1979; 3: 79-83
122. Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V: Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 2005; 135: 815-27
123. Anand KJ, Scalzo FM: Can adverse neonatal experiences alter brain development and subsequent behavior? *Biol Neonate* 2000; 77: 69-82
124. Dobbing J: Undernutrition and the developing brain. The relevance of animal models to the human problem. *Am J Dis Child* 1970; 120: 411-5
125. Lucas A, Morley R, Cole TJ et al.: Early diet in preterm babies and developmental status at 18 months. *Lancet* 1990; 335: 1477-81
126. Horvath KM, Harkany T, Mulder J et al.: Neonatal handling increases sensitivity to acute neurodegeneration in adult rats. *J Neurobiol* 2004; 60: 463-72
127. Represa A, Ben-Ari Y: Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 2005; 28: 278-83
128. Waters KA, Machaalani R: NMDA receptors in the developing brain and effects of noxious insults. *Neurosignals* 2004; 13: 162-74
129. Owens DF, Kriegstein AR: Developmental neurotransmitters? *Neuron* 2002; 36: 989-91
130. Nguyen L, Rigo JM, Rocher V et al.: Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res* 2001; 305: 187-202
131. Benitez-Diaz P, Miranda-Contreras L, Mendoza-Briceno RV, Pena-Contreras Z, Palacios-Pru E: Prenatal and postnatal contents of amino acid neurotransmitters in mouse parietal cortex. *Dev Neurosci* 2003; 25: 366-74
132. Herlenius E, Lagercrantz H: Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol* 2004; 190 S8-21

133. Lujan R, Shigemoto R, Lopez-Bendito G: Glutamate and GABA receptor signalling in the developing brain. *Neuroscience* 2005; 130: 567-80
134. Embryonic vertebrate central nervous system: revised terminology. The Boulder Committee. *Anat Rec* 1970; 166: 257-61
135. Sidman RL, Miale IL, Feder N: Cell proliferation and migration in the primitive ependymal zone: an autoradiographic study of histogenesis in the nervous system. *Exp Neurol* 1959; 1: 322-33
136. Altman J: Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. IV. Cell proliferation and migration in the anterior forebrain, with special reference to persisting neurogenesis in the olfactory bulb. *J Comp Neurol* 1969; 137: 433-57
137. Doetsch F, Caille I, Lim DA, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A: Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell* 1999; 97: 703-16
138. Haydar TF, Wang F, Schwartz ML, Rakic P: Differential modulation of proliferation in the neocortical ventricular and subventricular zones. *J Neurosci* 2000; 20: 5764-74
139. LoTurco JJ, Owens DF, Heath MJ, Davis MB, Kriegstein AR: GABA and glutamate depolarize cortical progenitor cells and inhibit DNA synthesis. *Neuron* 1995; 15: 1287-98
140. Antonopoulos J, Pappas IS, Parnavelas JG: Activation of the GABA<sub>A</sub> receptor inhibits the proliferative effects of bFGF in cortical progenitor cells. *Eur J Neurosci* 1997; 9: 291-8
141. Behar TN, Li YX, Tran HT et al.: GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci* 1996; 16: 1808-18
142. Behar TN, Schaffner AE, Scott CA, Greene CL, Barker JL: GABA receptor antagonists modulate postmitotic cell migration in slice cultures of embryonic rat cortex. *Cereb Cortex* 2000; 10: 899-909
143. Kornack DR, Rakic P: Changes in cell-cycle kinetics during the development and evolution of primate neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 1242-6
144. Rajan I, Cline HT: Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J Neurosci* 1998; 18: 7836-46

145. Behar TN, Scott CA, Greene CL et al.: Glutamate acting at NMDA receptors stimulates embryonic cortical neuronal migration. *J Neurosci* 1999; 19: 4449-61
146. Olney JW: Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 164: 719-21
147. Olney JW, Sharpe LG: Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* 1969; 166: 386-8
148. Luthi A, Schwyzer L, Mateos JM, Gähwiler BH, McKinney RA: NMDA receptor activation limits the number of synaptic connections during hippocampal development. *Nat Neurosci* 2001; 4: 1102-7
149. Adams SM, de Rivero Vaccari JC, Corriveau RA: Pronounced cell death in the absence of NMDA receptors in the developing somatosensory thalamus. *J Neurosci* 2004; 24: 9441-50
150. Li Y, Erzurumlu RS, Chen C, Jhaveri S, Tonegawa S: Whisker-related neuronal patterns fail to develop in the trigeminal brainstem nuclei of NMDAR1 knockout mice. *Cell* 1994; 76: 427-37
151. Honegger P, Matthieu JM: Selective toxicity of the general anesthetic propofol for GABAergic neurons in rat brain cell cultures. *J Neurosci Res* 1996; 45: 631-6
152. Spahr-Schopfer I, Vutskits L, Toni N et al.: Differential neurotoxic effects of propofol on dissociated cortical cells and organotypic hippocampal cultures. *Anesthesiology* 2000; 92: 1408-17
153. Gascon E, Vutskits L, Zhang H et al.: Sequential activation of p75 and TrkB is involved in dendritic development of subventricular zone-derived neuronal progenitors in vitro. *Eur J Neurosci* 2005; 21: 69-80
154. Vutskits L, Gascon E, Tassonyi E, Kiss JZ: Clinically relevant concentrations of propofol but not midazolam alter in vitro dendritic development of isolated gamma-aminobutyric acid-positive interneurons. *Anesthesiology* 2005; 102: 970-6
155. Uemura E, Bowman RE: Effects of halothane on cerebral synaptic density. *Exp Neurol* 1980; 69: 135-42
156. Jevtovic-Todorovic V, Benshoff N, Olney JW: Ketamine potentiates cerebrocortical damage induced by the common anaesthetic agent nitrous oxide in adult rats. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 1692-8

157. Wise-Faberowski L, Zhang H, Ing R, Pearlstein RD, Warner DS: Isoflurane-induced neuronal degeneration: an evaluation in organotypic hippocampal slice cultures. *Anesth Analg* 2005; 101: 651-7
158. Johnson SA, Young C, Olney JW: Isoflurane-induced Neuroapoptosis in the Developing Brain of Nonhypoglycemic Mice. *J Neurosurg Anesthesiol* 2008 Jan; 20: 21-8
159. Dreykluft C, Bercker S, Weise M et al.: Untersuchung auf cerebrale neurodegenerative Effekte von Sevofluran an neugeborenen Ratten. Deutscher Anästhesiekongress (DAC), Leipzig, Deutschland 2006
160. Miura Y, Amagasa S: [Perioperative cerebral ischemia and the possibility of neuroprotection by inhalational anesthetics]. *Masui* 2003; 52: 116-27
161. Payne RS, Akca O, Roewer N, Schurr A, Kehl F: Sevoflurane-induced preconditioning protects against cerebral ischemic neuronal damage in rats. *Brain Res* 2005; 1034: 147-52
162. Canas PT, Velly LJ, Labrande CN et al.: Sevoflurane protects rat mixed cerebrocortical neuro-gial cell cultures against transient oxygen-glucose deprivation: Involvement of glutamate uptake and reactive oxygen species. *Anesthesiology* 2006 Nov; 105: 990-998
163. Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ et al.: Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol* 2005; 146: 189-97
164. Stephenson FA, Duggan MJ, Pollard S: The gamma 2 subunit is an integral component of the gamma-aminobutyric acidA receptor but the alpha 1 polypeptide is the principal site of the agonist benzodiazepine photoaffinity labeling reaction. *J Biol Chem* 1990; 265: 21160-5
165. Flood P, Ramirez-Latorre J, Role L: Alpha 4 beta 2 neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the central nervous system are inhibited by isoflurane and propofol, but alpha 7-type nicotinic acetylcholine receptors are unaffected. *Anesthesiology* 1997; 86: 859-65
166. Todorovic SM, Lingle CJ: Pharmacological properties of T-type Ca<sup>2+</sup> current in adult rat sensory neurons: effects of anticonvulsant and anesthetic agents. *J Neurophysiol* 1998; 79: 240-52
167. Clancy B, Darlington RB, Finlay BL: Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 2001; 105: 7-17

168. Vutskits L, Gascon E, Tassonyi E, Kiss JZ: Effect of ketamine on dendritic arbor development and survival of immature GABAergic neurons in vitro. *Toxicol Sci* 2006; 91: 540-9
169. Lucas A, Morley R, Cole TJ: Randomised trial of early diet in preterm babies and later intelligence quotient. *Bmj* 1998; 317: 1481-7
170. Hayashi H, Dikkes P, Soriano SG: Repeated administration of ketamine may lead to neuronal degeneration in the developing rat brain. *Paediatr Anaesth* 2002; 12: 770-4
171. Strauß JM, Sümpelmann R: Perioperative Flüssigkeitstherapie bei Früh- und Neugeborenen, Säuglingen und Kleinkindern. Thieme-connect (© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart New York): *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2007; 42: 634-41
172. Hardee GE, Baggot JD: Development and Formulation of Veterinary Dosage Forms. *Drugs and the Pharmaceutical Sciences* 1998; 88
173. Erhardt W, Henke J, Haberstroh J: *Anästhesie & Analgesie beim Klein- und Heimtier*. Schattauer Verlag Stuttgart, 2003
174. Anand KJ, Coskun V, Thirvikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM: Long-term behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups. *Physiol Behav* 1999; 66: 627-37
175. Lapin IP: Only controls: effect of handling, sham injection, and intraperitoneal injection of saline on behavior of mice in an elevated plus-maze. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1995; 34: 73-7
176. Bhutta AT, Anand KJ: Vulnerability of the developing brain. Neuronal mechanisms. *Clin Perinatol* 2002; 29: 357-72
177. Bercker S, Bittigau P, Bühner C et al.: Kurzzeitanwendung von Sevofluran induziert keine apoptotische Neurodegeneration bei neugeborenen Ratten. *Deutscher Anästhesiecongress (DAC) 2005*
178. Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C et al.: Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 2001; 62: 401-5
179. Lu LX, Yon JH, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V: General anesthesia activates BDNF-dependent neuroapoptosis in the developing rat brain. *Apoptosis* 2006; 11: 1603-15
180. Simpkins JW, Wang J, Wang X et al.: Mitochondria play a central role in estrogen-induced neuroprotection. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005; 4: 69-83

181. Simpkins JW, Dykens JA: Mitochondrial mechanisms of estrogen neuroprotection. *Brain Res Rev* 2008; 57: 421-30
182. Han BH, Holtzman DM: BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 2000 Aug 1; 20: 5778-81
183. Tandon P, Yang Y, Das K, Holmes GL, Stafstrom CE: Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in seizures during development. *Neuroscience* 1999; 91: 293-303
184. Zhou L, Shine HD: Neurotrophic factors expressed in both cortex and spinal cord induce axonal plasticity after spinal cord injury. *J Neurosci Res* 2003 Oct; 74: 221-6
185. Yon JH, Carter LB, Reiter RJ, Jevtovic-Todorovic V: Melatonin reduces the severity of anesthesia-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 2006; 21: 522-30
186. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C et al.: Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002 Aug; 8: 495-505
187. Olney JW, Young C, Wozniak DF, Ikonomidou C, Jevtovic-Todorovic V: Anesthesia-induced developmental neuroapoptosis. Does it happen in humans? *Anesthesiology* 2004; 101: 273-5
188. Todd MM: Anesthetic neurotoxicity: the collision between laboratory neuroscience and clinical medicine. *Anesthesiology* 2004; 101: 272-3
189. Taddio A, Shah V, Gilbert-MacLeod C, Katz J: Conditioning and hyperalgesia in newborns exposed to repeated heel lances. *Jama* 2002; 288: 857-61
190. Tobiansky R, Lui K, Roberts S, Veddovi M: Neurodevelopmental outcome in very low birthweight infants with necrotizing enterocolitis requiring surgery. *J Paediatr Child Health* 1995; 31: 233-6
191. Chacko J, Ford WD, Haslam R: Growth and neurodevelopmental outcome in extremely-low-birth-weight infants after laparotomy. *Pediatr Surg Int* 1999; 15: 496-9

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
BGA	Blutgasanalyse
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	chemische Formel von Kohlenstoffdioxid
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
d. h.	das heißt
FAS	<i>fibroblast-associated</i>
FEM	Forschungseinrichtungen der Experimentellen Medizin (Charité - Universitätsmedizin Berlin)
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GQ	gegenüberliegender Quadrant
h	Stunde(n)
5-HT <sub>3</sub>	5-Hydroxytryptamin Typ 3
i.p.	intraperitoneal
Kap.	Kapitel
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LQ	linker Quadrant
m	Meter
M.	Morbus
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter

mm	Millimeter
mmol	Millimol
MWM	<i>Morris Water Maze</i>
n	Anzahl
NMDA	n-Methyl-D-Aspartat
N <sub>2</sub> O	chemische Formel von Lachgas
O <sub>2</sub>	chemische Formel von molekularem Sauerstoff
PQ	Plattformquadrant
PVC	Polyvinylchlorid
RQ	rechter Quadrant
s	Sekunde(n)
s.c.	subkutan
SEM	<i>standard error of measurement</i>
sog.	sogenannte(s/r)
TNF	Tumornekrosefaktor
TrkB	<i>tropomyosin-related kinase B</i>
u. a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

**Kongressbeiträge:**

29./30. Sept. 2005

15. VETPHARM Symposium, Wien

Vortrag: Kammerl, A. et al.: Propofol-Narkose bei neugeborenen Ratten - Hinweise auf verminderte Lernfähigkeit im Jugendalter.

5.-8. Mai 2007

Deutscher Anästhesie Congress (DAC), Hamburg

Eingeladener Vortrag im wissenschaftlichen Vortragswettbewerb: Kammerl, A. et al.: Verhaltensuntersuchungen nach neonataler Anästhetika-Behandlung von Ratten: Propofol und Sevofluran im Vergleich.

24.-28. Juni 2007

5th World Congress on Pediatric Critical Care (PCC), Genf

Posterpräsentation: Kammerl, A. et al.: Memory impairments in adolescent rats after neonatal anaesthesia.

## Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt der Betreuerin der Verhaltensversuche, Frau Dr. Bettina Bert, für die Einarbeitung in die Methodik und ihre großzügige Bereitschaft, bei Problemen jeglicher Art zu helfen. Die kompetente Betreuung durch Frau Dr. Bert war für die Durchführung und Auswertung der Verhaltenstests unverzichtbar.

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Thoralf Kerner danke ich für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit zur Durchführung der Versuche. Die Struktur seiner Arbeitsgruppe und sein persönliches Engagement haben es mir ermöglicht, sowohl in praktischer als auch in theoretischer Hinsicht meinen wissenschaftlichen Horizont zu erweitern. Sein stetes Interesse am Fortschritt der Untersuchungen sowie zu guter letzt sein mühevolleres Korrekturlesen haben wesentlich zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen.

Bei Herrn Dr. Sven Bercker möchte ich mich sehr herzlich für seine stets freundliche Betreuung, für die wissenschaftliche und praktische Anleitung bei der Anästhesie der neugeborenen Tiere sowie für die Durchsicht und Korrektur des Manuskripts trotz vieler Arbeit und anderer Verpflichtungen bedanken.

Frau Prof. Dr. Heidrun Fink, Leiterin des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Veterinärmedizin der Freien Universität Berlin, bin ich für ihre Kooperation und die dadurch geschaffene Möglichkeit dankbar, die Verhaltenstests durchführen zu können. Ihre ausführlichen Erläuterungen zu Fragestellungen, die ihres verhaltenspharmakologischen Fachwissens bedurften, boten eine große Hilfestellung. Allen Mitarbeitern ihres Instituts gilt ein besonderer Dank für die kollegiale und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Danken möchte ich außerdem den Doktorandinnen aus der Arbeitsgruppe, Frau Christiane Dreykluft und Frau Mirjam Weise, die mir während der Phase der Einarbeitung bei der Anästhesie der Jungtiere mit Rat und Tat zur Seite standen, sowie Frau PD Dr. Petra Bittigau insbesondere für die Logistik bei den tierexperimentellen Untersuchungen.

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen lieben Eltern für ihre unermüdliche Unterstützung und Förderung während meiner gesamten Ausbildung, sowie Michael, der ganz besonders zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

## Erklärung

„Ich, Antonia M. Kammerl, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Tierexperimentelle Verhaltensuntersuchungen nach neonataler Anästhetika-Behandlung* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

---

Datum

---

Unterschrift