

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur Wirkung von Propofol und Sevofluran  
auf embryonale neuronale Zellkulturen der Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lucas Seeberg

aus Berlin

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

Datum der Promotion: 03.09.2010

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1	Historischer Aspekt der Anästhesie bei Neugeborenen	1
1.2	Anästhetikainduzierte Neurodegeneration	1
1.3	Entwicklungsbedingte Prädisposition gegenüber Neurodegeneration	3
1.4	Propofol	4
1.5	Sevofluran	5
1.6	$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)	6
1.6.1	GABA-Rezeptoren	6
1.6.2	GABA-Rezeptor-Antagonisten	7
1.6.2.1	Gabazine	7
1.6.2.2	Picrotoxin	8
1.7	Unterscheidung des Zelltods	8
1.7.1	Nekrose	8
1.7.2	Apoptose und Excitotoxizität	9
1.7.2.1	Caspasen und deren Inhibitoren	10
1.7.2.2	Proteinkinasen und deren Inhibitoren	10
1.7.2.2.1	Mitogenaktivierte Protein-Kinase-Kinase (MEK1/2)	10
1.7.2.2.2	Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)	11
1.8	Fragestellung	11
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODIK</b>	<b>13</b>
2.1	Materialliste und Bezugsquellen	13
2.1.1	Chemikalien und Zellkulturmedien	13
2.1.2	Zellkulturbedarf	14
2.1.3	Kits	14
2.1.4	Geräte	15
2.1.5	Software	16
2.2	Versuchstiere	16
2.3	Neonatale primäre Neuronenkultur der Ratte	16
2.3.1	Gewinnung	16

2.3.2	Färbungen.....	17
2.3.3	Anlage und Kultivierung .....	18
2.4	Testung der Zellviabilität .....	19
2.5	Propofolversuche .....	20
2.6	Sevofluranversuche .....	21
2.7	Beeinflussung durch GABA-Rezeptor-Antagonisten.....	22
2.8	Testung der Fragmentierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) .....	22
2.9	Beeinflussung der apoptotischen und protektiven Signaltransduktion .....	23
2.10	Statistische Analyse und grafische Darstellung .....	24
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>25</b>
3.1	Alleinige Propofolexposition .....	25
3.2	Alleinige Sevofluranexposition .....	28
3.3	Addition von GABA-Rezeptor-Antagonisten bei Propofolexposition .....	31
3.4	Addition von GABA-Rezeptor-Antagonisten bei Sevofluranexposition.....	33
3.5	DNA-Fragmentierung nach Propofolexposition.....	34
3.6	DNA-Fragmentierung nach Sevofluranexposition .....	35
3.7	Proapoptotische / antiapoptotische Signalkaskaden bei Propofolexposition.....	36
3.8	Proapoptotische / antiapoptotische Signalkaskaden bei Sevofluranexposition ...	37
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>38</b>
4.1	Anästhetika mit neurodegenerativem Potential.....	38
4.2	Propofol .....	40
4.2.1	Propofolwirkung bei primären, neonatalen Neuronenkulturen der Ratte .....	40
4.2.2	Einfluss von GABA-Rezeptor-Antagonisten auf die Propofolwirkung.....	41
4.2.3	Evaluation des Propofol-bedingten Zelltods .....	42
4.3	Sevofluran.....	43
4.3.1	Sevofluranwirkung bei primären, neonatalen Neuronenkulturen der Ratte ...	43
4.3.2	Einfluss von GABA-Rezeptor-Antagonisten auf die Sevofluranwirkung .....	44
4.3.3	Evaluation des Sevofluran-bedingten Zelltods .....	44
4.4	Kritische Bewertung der verwendeten Methodik.....	45
4.4.1	Beurteilung der verwendeten Propofolkonzentrationen.....	46
4.4.2	Beurteilung der verwendeten Sevoflurankonzentrationen .....	46
4.4.3	Extrapolation der klinischen Relevanz aus den Versuchsdaten .....	47

4.5 Ausblick .....	48
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>49</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>51</b>
<b>7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>68</b>
<b>8 ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>71</b>
<b>VERÖFFENTLICHUNGEN.....</b>	<b>72</b>
<b>LEBENS LAUF .....</b>	<b>73</b>
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>74</b>
<b>ERKLÄRUNG AN EIDES STATT .....</b>	<b>75</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Historischer Aspekt der Anästhesie bei Neugeborenen

Aufgrund der schwer kontrollierbaren, dämpfenden Wirkung auf die unreifen Organsysteme wurde einer Anästhesierung Neugeborener und Kleinkinder lange Zeit mit extremer Vorsicht begegnet. Hieraus wurde im Laufe des letzten Jahrhunderts die gängige Praxis abgeleitet, bei Patienten dieser Altersklasse eine Anästhesie ausschließlich mit Lachgas und D-Tubocurarin durchzuführen, volatile oder intravenöse Anästhetika jedoch vorzuenthalten (Hobbs et al. 1988). Aufbauend auf neuere Untersuchungsergebnisse in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts erfolgte ein Paradigmenwechsel hinsichtlich des Verständnisses der Neurophysiologie von Neugeborenen. Die Erkenntnis, dass das neonatale zentrale Nervensystem (ZNS) im Zuge einer chirurgischen Intervention fähig ist, Schmerzreize wahrzunehmen und Stressantworten zu generieren (Anand und Aynsley-Green 1988, Anand und Hickey 1987, Anand et al. 1988), führte zu einem fundamentalen Wandel in Bezug auf die perioperative Behandlung Neugeborener (Anand 1993, Bouwmeester et al. 2001, van Lingen et al. 2002). In einer Reihe von Veröffentlichungen berichteten Anand und Kollegen von der Notwendigkeit einer tiefen Anästhesie zur Reduktion der hohen Stresshormonlevel, welche bei kardialen Eingriffen im Säuglingsalter auftraten. Diese klinischen Studien wurden unterstützt durch tierexperimentelle Untersuchungen an neugeborenen Ratten, bei denen u. a. schmerzhaft stimuli in Zusammenhang mit Abnormalitäten des Langzeitverhaltens und der Schmerzempfindung gebracht wurden (Liu et al. 1997, Anand et al. 1999, Ruda et al. 2000). Vor allem diese Ergebnisse führten zu dem aktuell vorherrschenden Verständnis und praktischem Vorgehen der intra- bzw. perioperativen Gabe von Anästhetika bzw. Analgetika in der pädiatrischen operativen Medizin.

## 1.2 Anästhetikainduzierte Neurodegeneration

Unter dem Oberbegriff „Neurodegeneration“ versteht man die Entartung zellulärer Strukturen oder Funktionen, die im Rahmen der Schädigung von Nervenzellen auftritt.

Unterscheiden lassen sich hierbei die retrograde Degeneration (sog. *dying back* Mechanismus), die Neurotmesis-bedingte Waller-Degeneration und die transneurale Degeneration.

Neben den heutzutage in der Kinderanästhesie verwendeten Opiaten wirken sowohl die intravenösen als auch die Inhalationsanästhetika über zwei prinzipielle Wirkmechanismen: erstens einer Steigerung der Inhibition synaptischer Übertragung via GABA-Rezeptoren [z. B., Benzodiazepine, Barbiturate, Propofol, Imidazolderivate, Isofluran, Enfluran und Halothan] (Franks und Lieb 1994, Fredriksson et al. 2007, Rudolph und Antkowiak 2004) und zweitens einer Verminderung der Exzitation durch N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren [z. B., Ketamin, N<sub>2</sub>O und Xenon] (Franks 1998, Ikonomidou et al. 2001, Jevtovic-Todorovic 1998, Mennerick 1998, Young et al. 2005). Für die Einleitung und Aufrechterhaltung einer Narkose können Substanzen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen verwendet werden.

Untersuchungen der Gruppe um Ikonomidou ließen auf eine signifikant beschleunigte Neurodegeneration bei Rattenjungtieren durch Stoffe mit GABA-agonistischen und NMDA-antagonistischen Eigenschaften schließen (Ikonomidou et al. 1999, Ikonomidou et al. 2000, Bittigau et al. 2002). Jevtovic-Todorovic et al. berichteten, dass Rattenjungtiere, welche einer Kombination aus Isofluran, Midazolam und Lachgas ausgesetzt wurden, eine vergleichbare Neurodegeneration sowie Defizite bei Lern- und Gedächtnis-Tests aufwiesen (Jevtovic-Todorovic et al. 2003).

Gleichzeitig wurde durch Studien belegt, dass sowohl GABA als auch Glutamat, neben ihrer Rolle als synaptische Neurotransmitter im ZNS, weit reichende Aufgaben in der Steuerung der neuronalen Entwicklung übernehmen. So ist mittlerweile bekannt, dass sie in Form epigenetischer Faktoren unter anderem an der Proliferation von Progenitorzellen, der Migration von Neuroblasten und der Maturation von Neurondendriten beteiligt sind (Represa und Ben-Ari 2005, Waters und Machaalani 2004). Das Zusammenspiel dieser Resultate führte zu der Besorgnis, die Anwendung von Stoffen GABA-agonistischen und NMDA-antagonistischen Wirkprofils in der Kinderanästhesie, Pädiatrie und Geburtshilfe könnte zur Induktion degenerativer Vorgänge im sich entwickelnden menschlichen Gehirn führen (Olney et al. 2004, Soriano et al. 2005, Todd 2004). Für pädiatrische Anästhesisten und Intensivmediziner war diese Entwicklung von hohem Interesse, da somit die Sicherheit der in der Kinderanästhesie verwendeten Anästhetika in Frage gestellt wurde (Davidson und Soriano 2004).

### 1.3 Entwicklungsbedingte Prädisposition gegenüber Neurodegeneration

Es bestehen kaum Zweifel, dass das ZNS außerordentlich empfindlich gegenüber einer Unordnung des internen Milieus ist und im Vergleich zu anderen Organsystemen ein geringes Regenerationspotential aufweist, mit der Folge, dass zugrunde gegangene Neuronen bis auf wenige Ausnahmen bei eventuell ablaufenden Degenerationsvorgängen unwiderruflich verloren gehen (Bhutta und Anand 2002). Abgesehen von möglichen unphysiologischen Einflüssen unterliegt das unreife Gehirn zudem einer Reihe von apoptotischen Degenerationsvorgängen als Teil seiner normalen Entwicklung (Kuan et al. 2000).

In den späten 1970er Jahren wurde bei Ratten gezeigt, dass die spezifische Hochphase der Synaptogenese, auch als „Phase des rapiden Gehirnwachstums“ (*brain growth spurt period*) bezeichnet, in den ersten drei postnatalen Wochen liegt (Abb. 1) (Dobbing und Sands 1979). Beim Menschen entspricht dies dem Zeitraum vom Beginn des dritten Trimesters an bis zum Ende des zweiten Lebensjahres (Dobbing und Sands 1973). Es lässt sich erkennen, dass in diesem kritischen Zeitfenster die neuronale Schadensanfälligkeit durch eine unphysiologische Exposition mit GABA-agonistischen bzw. NMDA-antagonistischen Stoffen (Ikonomidou et al. 1999, Ikonomidou et al. 2000) und Stressoren (u. a. schmerzhafte Stimuli, Hypoglykämie, Ischämie, Hyp- und Hyperoxie) am stärksten ausgeprägt ist. In zahlreichen Nagetier-Versuchen der Gruppe um John W. Olney zeigte sich die Beschleunigung der apoptotischen Prozesse durch die perinatale Exposition mit anästhetischen oder antikonvulsiven Stoffen sowie Ethanol (Olney et al. 2000, Olney et al. 2000, Olney et al. 2002). Die durch Anästhetika ausgelöste Unterdrückung neuronaler Aktivität sowie der zugrunde liegende Mechanismus der Anästhetika-induzierten Neurotoxizität sind bisher nicht hinreichend geklärt und weiterhin Gegenstand aktueller Forschung.

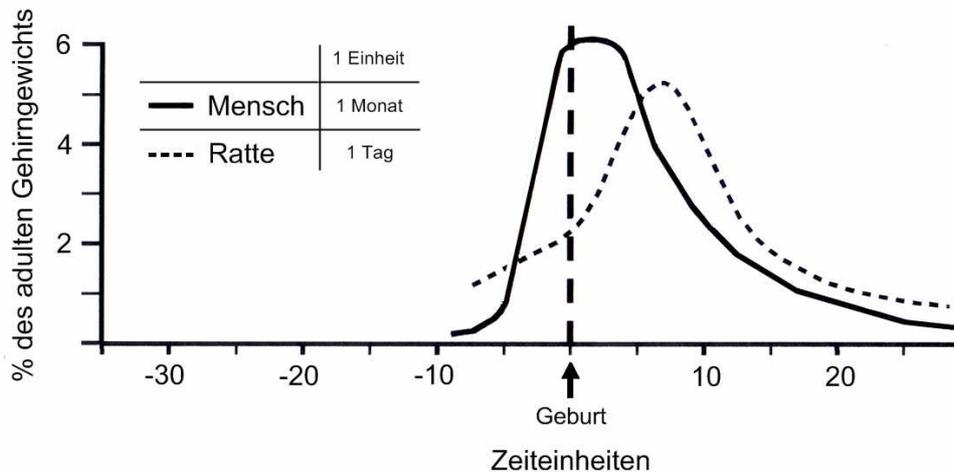
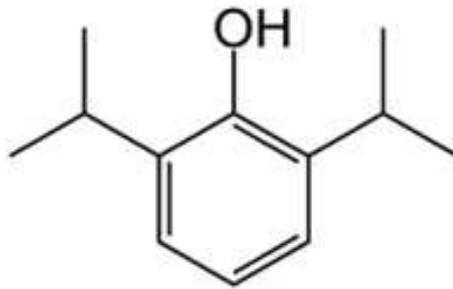


Abb. 1: „Phase des rapiden Gehirnwachstums“ (*brain growth spurt period*).

## 1.4 Propofol

Propofol (2,6-Diisopropylphenol) hat die Summenformel  $C_{12}H_{18}O$ , gehört zu den kurz wirkenden, intravenösen Anästhetika und wurde 1986 in die klinische Praxis eingeführt. Es ist in den handelsüblichen Präparaten in einer Lipidemulsion (Sojaöl, Phosphatid und Glycerin) gelöst (Glen 1980, Langley und Heel 1988). Wegen seiner rasch einsetzenden Wirkung, einer antiemetischen Wirkkomponente sowie der guten Sedierung und Verträglichkeit ist Propofol ein geschätztes und häufig angewandtes Anästhetikum und Sedativum. Propofol besitzt pharmakokinetische Eigenschaften (starke Lipophilie, hohe Proteinbindung von 98 %, hohes Verteilungsvolumen von 10 l/kg Körpergewicht), die unter Dauergabe auf eine potentielle Kumulation in proteinreichen Geweben hindeuten. In der Vergangenheit wurden bereits mehrfach mögliche unerwünschte Wirkungen, wie beispielsweise das „Propofol-Infusionssyndrom“, beschrieben. Wesentliche Merkmale dieser unerwünschten Wirkung sind eine schwere metabolische Azidose, Rhabdomyolyse, Nieren- und Herzversagen. Todesfälle traten insbesondere dann auf, wenn ein schweres Krankheitsbild vorlag und Dosen über 5 mg/kg/Stunde über eine längere Dauer (> 48 Stunden) verabreicht wurden (Motsch und Roggenbach 2004). Abgesehen davon existieren mehrere Studien, die Propofol sowohl mit einer neuroprotektiven (Gelb et al. 2002, Kawaguchi et al. 2005) als auch einer neurotoxischen Wirkung (Honegger und Matthieu 1996, Jevtotovic-

Todorovic et al. 2003) in Zusammenhang bringen. Propofol ist in Deutschland als kurz wirkendes, intravenöses Hypnotikum zur Einleitung und Aufrechterhaltung einer Narkose bei Kindern (ab 1 Monat) und Erwachsenen, zur Sedierung von Erwachsenen bei diagnostischen Maßnahmen sowie bei Erwachsenen ab 17 Jahren zur Sedierung von beatmeten Patienten im Rahmen der Intensivbehandlung zugelassen.

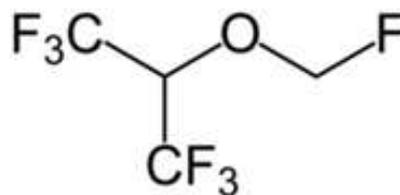


**Abb. 2:** Strukturformel von Propofol.

## 1.5 Sevofluran

Sevofluran (1,1,1,3,3,3-Hexafluor-2-[Fluormethoxy]-Propan) hat die Summenformel  $C_4H_3OF_7$ , ist ein zur Gruppe der Flurane gehörendes volatiles Anästhetikum und wurde 1995 in Deutschland eingeführt. Es ist als polyfluorierter Kohlenwasserstoff auf Basis eines Diäthyläthers lipophil und liegt bei Raumtemperatur in flüssiger Form vor. Aufgrund des Siedepunktes von  $58,8\text{ °C}$  muss das Inhalationsnarkotikum für die Anwendung über einen speziellen Verdampfer vaporisiert und anschließend dem Frischgas zugeführt werden. Die Konzentration der gasförmigen Phase kann beliebig eingestellt werden und wird als volumenprozentiger Anteil (Vol%) angegeben. Der geringe Blut-Gas-Verteilungskoeffizient von ca. 0,65 bedingt eine schnelle Einschlaf- und Aufwachphase. Die gute hypnotische und muskelrelaxierende sowie die nur schwach ausgebildete analgetische Wirkkomponente bedingen die breite Verwendung als Mittel zur Narkoseführung (Carpenter et al. 1986, Conzen und Nuscheler 1996). Zusätzlich besitzt Sevofluran einen, im Vergleich zu den anderen Fluranen, angenehmen Geruch (TerRiet et al. 2000) und ist weniger schleimhautreizend, wodurch sich der häufige Gebrauch bei der inhalativen Narkoseeinleitung in der Kinderanästhesie erklären lässt. Abgesehen von der sowohl in tierexperimentellen als auch in klinischen Studien nachgewiesenen Fähigkeit, die Ischämietoleranz des

Herzens zu verbessern (De Hert et al. 2002, Julier et al. 2003, Toller et al. 1999), konnten postischämisch auch potentiell neuroprotektive Effekte nachgewiesen werden (Bundgaard et al. 1998, Toner et al. 2001, Werner et al. 1995). Bei Exposition mit Succinylcholin und / oder volatilen Anästhetika, z. B. Sevofluran, besteht die Gefahr des Auftretens einer lebensbedrohlichen, genetisch determinierten Störung der Skelettmuskelfunktion, welche auch als „maligne Hyperthermie“ bezeichnet wird (Rosenberg et al. 2007, Kudoh und Matsuki 2000). Ein möglicherweise vorhandener toxischer Einfluss des in der pädiatrischen Anästhesiologie weit verbreiteten Inhalationsnarkotikums auf sich entwickelnde Neuronen ist bisher nicht untersucht.



**Abb. 3:** Strukturformel von Sevofluran.

## 1.6 $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)

GABA ist neben Glutamat und Glycin ein dominierender Neurotransmitter im menschlichen Gehirn und Schätzungen zufolge Bestandteil von ungefähr 25-40 % aller Nervenendigungen (Herlenius und Lagercrantz 2004). Während GABA im Erwachsenenalter als wichtigster inhibitorischer Transmitter des ZNS gilt, unterscheidet sich die Funktion des Transmitters in der frühen Entwicklungsphase erheblich. Der in dieser Periode dem eines Wachstumsfaktors ähnelnde Wirkungsbereich umfasst sowohl die Proliferation, Migration und Differenzierung von Neuronen als auch die Maturation von Synapsen und die Apoptose-Regulation (Owens und Kriegstein 2002a, Owens und Kriegstein 2002b).

### 1.6.1 GABA-Rezeptoren

GABA bindet spezifisch an GABA-Rezeptoren, die sich als Transmembranproteine an Nervenzellen in ionotrope (GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>C</sub>) sowie metabotrope Rezeptoren

(GABA<sub>B</sub>) unterteilen lassen. Bedingt durch die vorherrschenden hohen intrazellulären Chlorid-Ionenkonzentrationen kommt es bei Aktivierung unreifer GABA-Rezeptoren in der Frühphase der Entwicklung des zentralen Nervensystems zu einer Exzitation. Erst aufgrund der perinatalen Expression des Kalium-Ion / Chlorid-Ion (K<sup>+</sup> / Cl<sup>-</sup>)-Kotransporters KCC2 und der damit einhergehenden Änderung des Membranpotentials erfolgt eine Konversion zu einem inhibitorischen Effekt (Ben-Ari 2002, Miles et al. 1999). Den in dieser Arbeit untersuchten Anästhetika Propofol und Sevofluran wird aufgrund von zahlreichen Studien vor allem eine stark ausgeprägte GABA-agonistische und eher schwache (Sevofluran) bis nicht vorhandene (Propofol) NMDA-antagonistische Wirkkomponente zugesprochen (Mellon et al. 2007, Dilger 2002). Propofol potenziert die GABA-Wirkung im ZNS über die Induktion einer Tyrosinkinase-abhängigen Phosphorylierung der β-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkomplexes (Björnström et al. 2002). Sevofluran steigert ebenso wie Propofol erstens die Affinität von GABA zum GABA-Rezeptor und erhöht zweitens die Öffnungswahrscheinlichkeit des Chlorid-Ionenkanals (Hapfelmeier et al. 2001). Dies erfolgt allerdings über eine gesonderte, nicht durch Propofol aktivierbare Bindungsstelle am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, deren genaue Identifizierung bisher aussteht (Grasshoff und Antkowiak 2004).

## **1.6.2 GABA-Rezeptor-Antagonisten**

### **1.6.2.1 Gabazine**

Bei dem Pyridazinyl-GABA Derivat SR95531 (2-[3-Carboxypropyl]-3-Amino-6-[4-Methoxyphenyl]-Pyridaziniumbromid), das auch als Gabazine bezeichnet wird, handelt es sich um einen spezifischen, kompetitiven GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonisten, der somit als allosterischer Inhibitor der Öffnung des Chlorid-Ionenkanals wirkt (Ueno et al. 1997). Durch die resultierende Abschwächung des transmembranen Chloridionenstroms kommt es zur Reduzierung der GABA-bedingten synaptischen Inhibition und damit auch der neuronalen Hyperpolarisation (Yeung et al. 2003). Der ausschließlich in der Laborationsmedizin verwendete Wirkstoff steht in Verdacht im menschlichen Organismus Konvulsionen zu verursachen (Behrens et al. 2007).

### **1.6.2.2 Picrotoxin**

Picrotoxin, auch unter dem Namen Cocculin bekannt, ist die Bezeichnung für das Gemisch aus Picrotoxinin und Picrotinin (Dupont et al. 1979). Diese beiden Alkaloide sind im Stamm und den Wurzeln der Scheinmyrte, einer Pflanze aus der Familie der Mondsamengewächse (Menispermaceae), enthalten. Zusätzlich zu der Anwendung als Antidot bei Barbituratintoxikationen stellt der Wirkstoff eine neue Behandlungsmöglichkeit des Morbus Menière dar (Helling und Scherer 2005). Picrotoxin gilt als nichtkompetitiver GABA<sub>A</sub>-Rezeptorantagonist und bindet den Untersuchungen von Chen et al. nach, neben einer Reihe von Insektiziden, an einer Bindungsstelle, die sich innerhalb des von fünf Transmembransegmenten umschlossenen Lumens des Chlorid-Ionenkanals befindet (Chen et al. 2006). Der resultierende inhibitorische Effekt an einem Neuron ist das Ergebnis aus Reduzierung der Öffnungsfrequenz, sowie Verkürzung der mittleren Öffnungszeit. Zusätzlich hat der Wirkstoff antagonistische Eigenschaften am GABA<sub>C</sub>-Rezeptor, der im Kontrast zu den schnellen, hochfrequenten Antworten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors langsam und anhaltend reagiert.

## **1.7 Unterscheidung des Zelltods**

Hinsichtlich morphologischer und biochemischer Kriterien können prinzipiell zwei Formen des eukaryontischen Zelltods unterschieden werden: Nekrose und Apoptose (Kerr et al. 1972, Wyllie et al. 1980). Zudem wird im Gebiet der Neurowissenschaften empfohlen, eine weitere Art der Zelldegeneration als Subklassifikation des apoptotischen Zelltods zu unterscheiden: die Excitotoxizität (Olney et al. 1972). Nicht nur der Entwicklungsstand des zentralen Nervensystems und die Art des beeinflussenden Stimulus, sondern auch dessen Intensität und Dauer entscheiden über den resultierenden Weg des Zellunterganges (Bredesen 2000).

### **1.7.1 Nekrose**

Unter der Einwirkung mechanischer, thermischer sowie chemischer Stimuli kommt es passiv zur Ionenpermeabilitätssteigerung der Plasmamembran (Calcium-Ion (Ca<sup>2+</sup>)-Einstrom). Der Ca<sup>2+</sup>-bedingte Adenosintriphosphat (ATP)-Verlust resultiert neben der

Desintegration von Zellorganellen in einem Anschwellen der Zelle und der als „osmotische Lyse“ bezeichneten Ruptur der Zellmembran (Chalmers-Redman et al. 1997). Die hieraus resultierende Freisetzung inflammatorischer Mediatoren in das Interstitium bedingt eine ausgeprägte Entzündungsreaktion.

### **1.7.2 Apoptose und Excitotoxizität**

Der apoptotische Zelltod ist von herausragender Bedeutung im Rahmen der Ontogenese und der physiologischen Regeneration im Sinne des Homöostaseprinzips. Es wird davon ausgegangen, dass ca. 50 % der sich entwickelnden Neuronen bis zur Ausreifung des Gehirns durch apoptotische Degenerationsvorgänge eliminiert werden (Yao und Cooper 1995). Eine spezifische Reizkombination bedingt die kaskadenartige Aktivierung von endogenen Endonukleasen und Proteasen, deren katalytische Umsetzung der Substrate zu einem kontrollierten Abbau zellulärer Strukturen führt (Vento et al. 2001). Unter morphologischen und biochemischen Gesichtspunkten kommt es anschließend zu der als Zeiose bezeichneten Stabilitätsabnahme der Zellmembran, Chromatinkondensation, internukleosomalen DNA-Fragmentation und Bildung von Apoptosekörperchen. In der Initialphase bleiben im Gegensatz zur Nekrose die Integrität der Zellmembran und Funktionsfähigkeit der Zellorganellen größtenteils erhalten. Durch den aktiven Prozess der Phagozytose entstandener Apoptosekörperchen wird einer sekundären Entzündungsreaktion entgegengewirkt.

Der Begriff „Excitotoxizität“ bezeichnet alle akuten Prozesse, bei denen Glutamat oder vergleichbare Strukturanaloga (NMDA oder Kainat) einen neuronalen Zelltod im ZNS verursachen. Eine synaptische Überaktivierung führt zu einer exzessiven Glutamat-Freisetzung und einer damit einhergehenden Aktivierung postsynaptischer Membranrezeptoren, die über die Öffnung der assoziierten Kanalporen einen neurotoxischen Ionen-Einstrom bewirken (Gardoni und Di Luca 2006). Mittlerweile ist bekannt, dass excitotoxische Degenerationsvorgänge mit zahlreichen akuten (z. B. nach Apoplex oder Trauma) sowie chronischen (z. B. Morbus Parkinson, Multiple Sklerose, Amyotrophe Lateralsklerose oder Morbus Alzheimer) neurologischen Schädigungen bzw. Erkrankungen in Zusammenhang stehen (Lipton et al. 2007).

### **1.7.2.1 Caspasen und deren Inhibitoren**

Die Interaktion von Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNF-Rezeptor) und -Ligand, die Aktivierung des Tumorsuppressorgens p53 durch zytotoxische Stoffe oder DNA-Schäden sowie der über das endoplasmatische Retikulum vermittelte Zelluntergang stellen drei der auf molekularer Ebene erfassten Hauptmechanismen der Apoptoseauslösung dar (Chen und Wang 2002, Van Cruchten und Van Den Broeck 2002) und münden in der Aktivierung der Caspasen. Diese Cystein-abhängigen, Aspartat-schneidenden Proteasen sind als Zymogene in allen eukaryontischen Zellen vorzufinden und kommen kompartmentunabhängig frei im Zytoplasma vor (Degterev et al. 2003). Ihre kontrollierte Inaktivität ist Voraussetzung für das Überleben der Zelle.

Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon (zVAD-FMK) ist ein zellgängiger Breitspektrum-Caspase-Inhibitor und gehört zu den synthetischen Peptidinhibitoren. Durch die erzeugte kovalente Bindung mit dem aktiven Zentrum aller bisher bekannten Caspasen kommt es zu deren sofortiger und irreversibler Aktivitätshemmung (Borner und Monney 1999, Garcia-Calvo et al. 1998). Der Einsatz von zVAD-FMK sollte in unseren Untersuchungen der Überprüfung eines möglichen, über Caspasen ablaufenden, apoptotischen Signaltransduktionsweges dienen.

### **1.7.2.2 Proteinkinasen und deren Inhibitoren**

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Caspasen stellt die Aktivierung von Proteinkinasen den Beginn eines weiteren Signaltransduktionsweges im Rahmen der Apoptoseregulation dar. Die Verwendung der Inhibitoren von mitogenaktivierter Protein-Kinase-Kinase und Phosphoinositid-3-Kinase sollte Aufschluss über deren Anästhetika-bedingte, potentielle Aktivierung geben.

#### **1.7.2.2.1 Mitogenaktivierte Protein-Kinase-Kinase (MEK1/2)**

Als Untergruppe der mitogenaktivierten Protein-Kinasen (MAPK) gehören die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK1/2) aufgrund ihrer Modifizierung zu den Serin/Threonin-Kinasen. Über Tyrosinkinase-Rezeptoren (Trk-Rezeptoren) kommt es zur Aktivierung des G-Proteins Ras, das die MAPK-Kinase-Kinase (MAP3K) bindet und zur Phosphorylierung der MEK1/2 führt. Die resultierende Aktivierung der ERK1/2 leitet

durch eine partielle Translokation in den Nukleus die Umlagerung von Phosphatgruppen an zahlreiche Transkriptionsfaktoren ein. Diese, eigentlich im Rahmen der terminalen Differenzierung unreifer neuronaler Zellen und des Schutzes vor Apoptose, durch Neurotrophine aktivierte Signaltransduktionskaskade konnte in neueren Studien über verschiedene Stimuli, wie z. B. Östradiol oder Hyperoxie, auch mit der Induktion eines Zellunterganges in Zusammenhang gebracht werden (Wong et al. 2003, Zhang et al. 2003).

1,4-Diamino-2,3-Dicyano-1,4-bis[2-Aminophenylthio]Butadien (U0126) ist ein hochselektiver, in Studien etablierter Inhibitor der MEK1 und MEK2 (Duncia et al. 1998, Favata et al. 1998), der nachweislich den physiologischen Schutz vor apoptotischer Degeneration blockieren kann (Buckley et al. 1999).

#### **1.7.2.2 Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)**

Die aus zwei Untereinheiten bestehende PI3K kann ebenfalls mit dem G-Protein Ras oder direkt mit Rezeptortyrosinkinasen interagieren. Über die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat (PIP<sub>3</sub>) aus Membranlipiden kommt es zur Rekrutierung der Proteinkinase B, deren kontrollierte Aktivität entscheidend für eine adäquate Zellhomöostase ist (Patapoutian und Reichhardt 2001).

2-(4-Morpholinyl)-8-Phenyl-1(4H)-Benzopyran-4-onhydrochlorid (ly294002) ist ein spezifischer, zellgängiger Inhibitor der PI3-Kinase (Vlahos et al. 1994), dessen Einsatz in Studien zu einer Steigerung der Apoptoserate in einem Modell für Hypoxie-induzierte Schädigung bei Gehirn-Schnitten neonataler Ratten führte (Hirai et al. 2004).

### **1.8 Fragestellung**

Eine stetig wachsende Anzahl experimenteller Daten deutet darauf hin, dass Anästhetika aufgrund ihrer GABAergen und Glutamatergen Wirkmechanismen eine negative Beeinflussung des unreifen zentralen Nervensystems nach sich ziehen können. Verstärkt wird diese These durch neuere Erkenntnisse, nach denen GABA und Glutamat, zusätzlich zu ihrer Rolle als synaptische Neurotransmitter, vielfältige Aufgaben der neuronalen Entwicklungsregulation im ZNS erfüllen. Da eine aus tierexperimentellen und klinischen Studien resultierende, generelle Vorenthaltung

anästhetischer Stoffe bei Neugeborenen und Kleinkindern nicht zur Diskussion steht, sollten weitere klinische und laborexperimentelle Untersuchungen erfolgen, um die komplexen thematischen Zusammenhänge zwischen Anästhetikaaanwendung und Neurodegeneration weiter aufzuklären und somit zur Sicherheit der Kinderanästhesie und neonatologischen Intensivmedizin beitragen zu können.

In der vorgelegten Arbeit sollten die in der Kinderanästhesie verwendeten Anästhetika Propofol und Sevofluran hinsichtlich ihrer Zellviabilitätsbeeinflussung von neonatalen kortikalen Neuronen der Ratte durch Testung mittels einer Zeit- und Konzentrationsreihe untersucht werden. Ziel war die Detektion potentieller neuroprotektiver und / oder neurodegenerativer Effekte der untersuchten Anästhetika im Tiermodell durch Viabilitätsmessung mittels 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT). Weiterführend sollte über die mögliche Beeinflussung der Anästhetikawirkung durch gleichzeitige Applikation eines GABA-Rezeptor-Antagonisten (Gabazine, Picrotoxin) versucht werden, eine Aussage über deren vorherrschenden Wirkmechanismus zu treffen. Die Verwendung eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) zur DNA-Fragmentierungs-Detektion sollte helfen, zwischen einem nekrotischen oder apoptotischen Degenerationspotential der Anästhetika differenzieren zu können und anschließend durch Inhibition der Caspasen (mittels zVAD-FMK), der MEK1/2 (mittels U0126) und der PI3K (mittels Iy294002) eine Beeinflussung des Signaltransduktionsweges zu überprüfen.

## 2 Material und Methodik

Die Grundsätze der Charité - Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guten wissenschaftlichen Arbeitens wurden beachtet. Zur Sicherung des größtmöglichen Keimausschlusses wurden, falls notwendig, alle Arbeitsschritte unter einer LaminAir® Sicherheitswerkbank durchgeführt.

### 2.1 Materialliste und Bezugsquellen

Die bei Durchführung der vorliegenden Arbeit verwendeten Materialien sind im Folgenden unterteilt in Chemikalien und Zellkulturmedien, Zellkulturbedarf, Kits, Geräte und Software aufgeführt.

#### 2.1.1 Chemikalien und Zellkulturmedien

*Abbott GmbH und Co. KG, Wiesbaden, Deutschland:*

Sevofluran (SEVOrane®)

*Biochrom Berlin AG, Berlin, Deutschland:*

Penicillin / Streptomycin

*Cell Signaling Technology Inc., Beverly, MA, USA:*

ly294002

U0126

*Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg v. d. H., Deutschland:*

Ampuwa® Spüllösung

Propofol 1% Fresenius

*Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA:*

Gibco® B-27 Supplement

Gibco® Neurobasal™ Medium

Trypsin / EDTA

*Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland:*

EDTA

Isopropanol

*PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich:*

Dulbecco`s PBS (1x)

*Promega Corp., Madison, WI, USA:*

zVAD-FMK

*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland:*

L-Glutamin

Picrotoxin

Poly-D-lysine hydrobromide

Salzsäure

SDS

SR95531

Trypanblau

### **2.1.2 Zellkulturbedarf**

*BD Biosciences, San Jose, CA, USA:*

Falcon® Conical Tube, 15 ml

Falcon® Conical Tube, 50 ml

Falcon® Cell Culture Flask, 75 cm<sup>2</sup>

Falcon® Cell Culture Petri Dish, 100 mm x 20 mm

Falcon® Cell Strainer 40 µm Nylon

Falcon® MICROTTEST™ 96-well Microplate, flat-bottom

*Corning Incorporated, New York, NY, USA:*

costar® Reagent Reservoir, 50 ml

costar® stripette®

*Sarstedt AG und Co., Nümbrecht, Deutschland:*

Zentrifugenröhre, 15 ml

Zentrifugenröhre, 50 ml

### **2.1.3 Kits**

*Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach-Wyhlen, Deutschland:*

Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup>

## 2.1.4 Geräte

*billups-rothenberg inc., Del Mar, CA, USA:*

Modular Incubator Chamber (M.I.C.-101™)

*Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland:*

Trockenschrank ED 53

*Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA:*

Microplate Reader Model 550

*Datex-Ohmeda Corp., Helsinki, Finnland:*

CAPNOMAC CO<sub>2</sub> und Agens Monitor

*Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland:*

Centrifuge 5714R

*GFL GmbH, Burgwedel, Deutschland:*

Wasserbad Typ 1004

*Gottl. Kern und Sohn GmbH, Balingen-Frommern, Deutschland:*

Analysenwaage 770

*Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland:*

LaminAir® HBB 2448

Megafuge 1.0R

*Hirschmann Laborgeräte GmbH und Co. KG, Eberstadt, Deutschland:*

pipetus®-akku

*IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA:*

MS1 Minishaker

*Karl Hecht KG, Sondheim, Deutschland:*

Zählkammer nach Neubauer *improved*

*Labotect Labor-Technik GmbH, Göttingen, Deutschland:*

Formula Scientific 3164 Incubator

*Olympus Corp., Tokyo, Japan:*

Phasenkontrast-Tischmikroskop CK2

Kamera PM-C35DX

*STEPHAN GmbH Medizintechnik, Gackebach, Deutschland:*

Artec Anästhesiesystem

Vapomasta 6

### **2.1.5 Software**

*Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA:*

Microplate Manager PC Software, Version 4.0

*GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA:*

Graphpad Prism Software, Version 4.03

## **2.2 Versuchstiere**

Für die Anlage der primären kortikalen Zellkulturen wurden embryonale Wistar-Ratten vom Embryonaltag 18 (E18) verwendet. Es wurde versucht, das Alter der embryonalen Neuronen so zu wählen, dass es dem neuronalen Entwicklungsstand von Frühgeborenen bzw. Föten im dritten Trimester der Schwangerschaft beim Menschen gleichzusetzen ist und einem Stadium innerhalb der postulierten „Phase des rapiden Gehirnwachstums“ entspricht. Alle vor der Entnahme terminiert verpaarten Ratten wurden in einem vollklimatisierten Tierstall unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur  $23 \pm 1$  °C, relative Luftfeuchte  $55 \pm 5$  %, zwölfstündiger Hell-Dunkel Rhythmus) mit freiem Zugang zu Futter (Altromin<sup>®</sup>, Lage) und Trinkwasser gehalten.

## **2.3 Neonatale primäre Neuronenkultur der Ratte**

### **2.3.1 Gewinnung**

Die Gewinnung der neuronalen Primärkulturen aus embryonalem Gehirngewebe wurde unter Beachtung des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland und den davon abgeleiteten Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen durchgeführt. Eine Anzeige der Tötung von Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken nach § 4 (3) TSchG wurde beim Landesamt für Gesundheit und Soziales mit der Nummer T0169/03 am 26.06.2003 gestellt. Die Präparationen der kortikalen Neuronen erfolgten nach einem modifizierten Protokoll von Akaike (Akaike et al. 1993). Das trächtige Tier wurde mit CO<sub>2</sub> narkotisiert und durch zervikale Dislokation getötet. Nach keimarmer Entnahme des Uterus erfolgte die Freipräparation der Embryonen, sowie nach einem Nackenschnitt die Freilegung der Cerebri und deren Entnahme. Nach der Abtrennung der Cortices vom restlichen Hirngewebe wurden diese von Blutgefäßen und Hirnhäuten

befreit und in gekühltes Medium überführt. Dieses bestand in allen betreffenden Arbeitsschritten aus NeuroBasal<sup>TM</sup> Medium + B27 Supplement (B27) [2 %] + L-Glutamin (L-Glut) [1 %] + Penicillin/Streptomycin (P/S) [1 %] (NBM). Anschließend wurde das Gewebe vorsichtig dreimal mit 5 ml *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* (D-PBS) gespült und für 15 Minuten, versetzt mit einer gebrauchsfertigen Trypsin / *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA)-Lösung [0,05/0,02 %], in dem 37 °C warmen Wasserbad inkubiert. Durch darauf folgendes, dreimaliges Waschen des Gewebes in NBM erfolgte die Inaktivierung des Trypsins. Die nun in 5 ml NBM befindlichen Zellen wurden im weiteren Verlauf mit in der Flamme abgerundeten Pasteurpipetten unterschiedlicher Größe in zwei Schritten mechanisch desintegriert. Um Zellbruchstücke und Erythrozyten zu eliminieren, wurde nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 1000 rpm für 4 Minuten und Raumtemperatur der Überstand verworfen und das Zellpellet in 2 ml frischem NBM resuspendiert. Verbliebene, undissoziierte Gewebstücke wurden mittels Filtration durch eine 40 µm Siebmembran entfernt. Nach Anfärbung von 20 µl der Zellsuspension mit 80 µl einer Trypanblaulösung [0,5 %] konnte unter Zuhilfenahme einer Neubauer *improved* Zählkammer die gewonnene Gesamtzellzahl bzw. die Zellzahl pro ml bestimmt werden.

### **2.3.2 Färbungen**

Das Gehirn selbst sowie die daraus hergestellten Zellsuspensionen setzen sich aus mehreren Zelltypen (Astrozyten, Neuronen, Oligodendrozyten, Mikroglia und Zellen aus verunreinigenden Geweben wie Gefäße und Reste der weichen Hirnhaut) zusammen. Im Rahmen der Untersuchung bestimmter Zellarten ist die Färbung einzelner spezifischer Zellbestandteile und die damit einhergehende zweifelsfreie Identifikation des Zelltyps unerlässlich.

Das fibrilläre, saure Gliaprotein (GFAP) gehört zur Familie der Typ III-Intermediärfilamente und kann einzeln oder auch gruppiert im Zytoskelett vorliegen. Neben seiner Existenz in Astrozyten (sowie den davon abgeleiteten Zellen) und ependymalen Zellen ist eine Ko-Expression mit neuronalen Markern bei fetalen Kulturen nachgewiesen (Rosser et al. 1997).

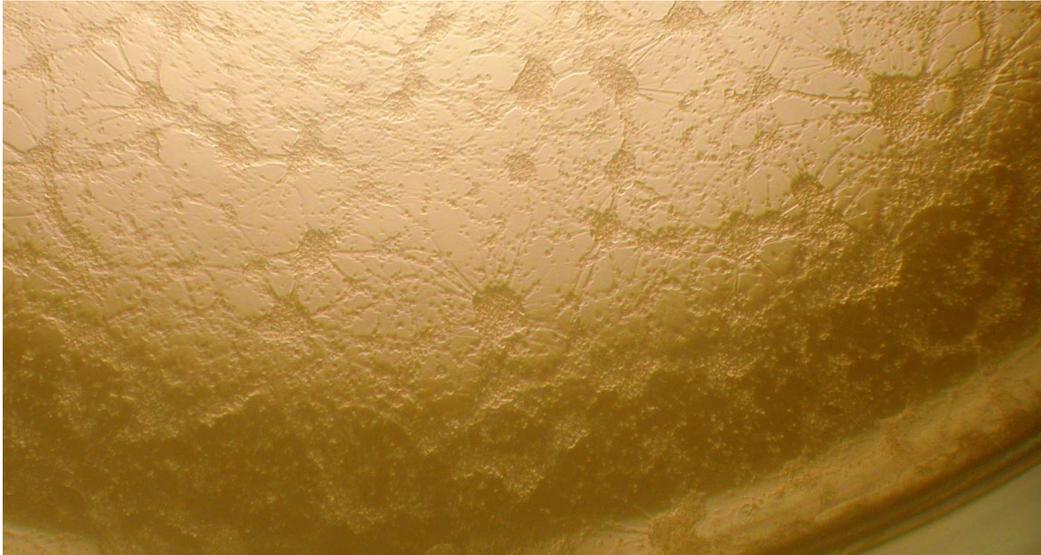
Neurofilamente (NF) sind neuronenspezifische Intermediärfilamente, die sich als Heteropolymere aus verschiedenen Typ-IV-Polypeptiden darstellen (NF-L, NF-M und NF-H). Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihres Molekulargewichts und dem

Zeitpunkt des Auftretens während der Hirnentwicklung. Im Zentrum jedes Axons befinden sich stabartig angeordnete Neurofilamente, welche oft mit Mikrotubuli assoziiert sind. Neurofilamente sind für die Dickenzunahme der Axone verantwortlich und sind so mitbestimmend für die Geschwindigkeit der Impulsleitung.

Mithilfe von routinemäßigen Färbungen für GFAP und Neurofilament, konnte gezeigt werden, dass bei der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Art der Gewinnung ein Zellverhältnis von 98-99 % Neuronen pro Gesamtzellen resultiert (Berns et al. 2009).

### **2.3.2 Anlage und Kultivierung**

Die 96-Well-Zellkulturplatten wurden mit 30 µl pro Vertiefung (Well) einer poly-D-Lysin-Lösung [0,1 mg/ml] eines 30-70 kDa Homopolymers vorbeschichtet, dreimalig mit 200 µl Aqua dest. gewaschen und für 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Im Anschluss wurden die Vertiefungen mit 100 µl NBM gefüllt und die Zellsuspension in dem Falcon<sup>®</sup> Röhrchen mit NBM auf eine Konzentration von  $2,4 \times 10^6$  Zellen pro ml verdünnt. In jedes Well wurden jeweils 25 µl der Suspension gegeben, so dass ca. 60.000 Neuronen pro Well zur Aussaat kamen. Zur Eliminierung der erhöhten Verdunstung in den außen liegenden Wells (*Edge Effect*) wurde in diese jeweils 200 µl Aqua dest. pipettiert (Lundholt et al. 2003). Die Zellen wurden bei 37 °C in 5 % kohlendioxidhaltiger Atmosphäre in humidifizierten Begasungsbrutschränken kultiviert. Am 7. Tag in vitro (DIV) wurden 75 µl NBM zupipettiert und am 14. DIV 100 µl des Mediums gewechselt. Nach Maturation erfolgten zwischen dem 12. und 22. DIV die Experimente.



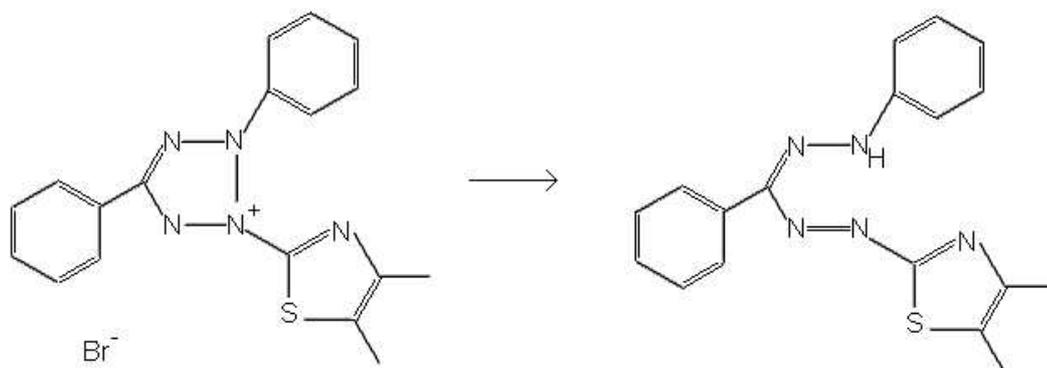
**Abb. 4:** Die Fotografie mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops zeigt den Ausschnitt eines Zellkulturplatten-Wells mit neonatalen, primären Neuronen der Ratte nach 12 Tagen Kultivierung. Vierfache Vergrößerung.

## 2.4 Testung der Zellviabilität

Die Reduktion des gelblich gefärbten, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid) zum tiefblau-schwarz gefärbten, wasserunlöslichen Formazan durch zelluläre Succinat-Dehydrogenasen, reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH) und reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) stellt das Hauptprinzip der MTT-Methode dar (Abb. 5). Diese enzymatisch katalysierten Reduktionsschritte finden in den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum statt, in denen sich der Farbstoff anreichert. Das dort kristallin abgelagerte Formazan ist optisch gut gegenüber den anderen Zellkompartimenten abgrenzbar und lässt sich mit organischen Lösungsmitteln in Lösung bringen. Die Menge des extrahierten, reduzierten Farbstoffes entspricht der Metabolisierungsaktivität der Zellkultur. Die Absorption des entstandenen Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm (Messwellenlänge) gegen 630 nm (Referenzwellenlänge) bestimmt. Da Dehydrogenasen nur in lebenden Zellen aktiv sind, dient die Umwandlung von MTT als Maß für die Lebensfähigkeit (Viabilität) einer Zellpopulation (Mosmann 1983).

Vor dem Ende des jeweiligen Versuches wurde eine Lösung aus 90 % NBM und 10 % gebrauchsfertiger MTT-Stammlösung (5 mg/ml in Aqua dest.) hergestellt. Die

behandelten Kulturplatten wurden entsprechend der bestimmten Expositionsdauer aus dem Inkubator genommen und die Versuchslösungen vorsichtig entfernt. Jeweils 100 µl pro Well der MTT / NBM-Lösung der Konzentration 1 mg/ml wurde auf die Zellen pipettiert und die Wellplatten für weitere zwei Stunden inkubiert. Durch Zugabe von 100 µl einer gebrauchsfertigen 10 %igen *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS)-Lösung (Natriumdodecylsulfat in Isopropanol mit 10 mM HCl) und einer anschließenden Inkubation über 24 Stunden wurden die gebildeten Formazankristalle gelöst. Ein ELISA Microplate Reader bestimmte bei 570 nm die Absorptionswerte der einzelnen Wells, aus denen mithilfe der Microplate Manager PC Software die Mittelwerte berechnet wurden.



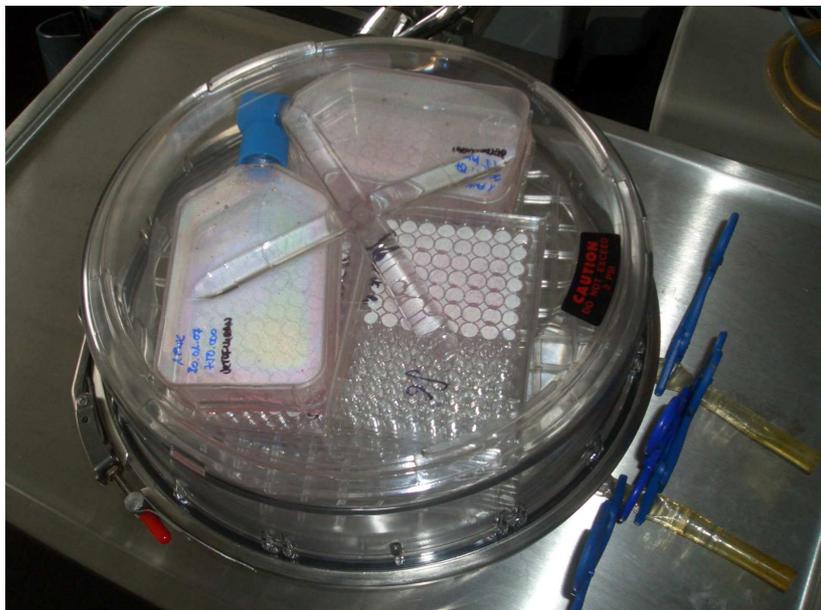
**Abb. 5:** Reduktionsschritt von MTT zu Formazan durch zelluläre Reduktasen.

## 2.5 Propofolversuche

Zu Versuchsbeginn wurden Propofol / NBM-Lösungen in den gewünschten Konzentrationen von 0,01, 0,1 und 1 mg/ml hergestellt. Auf den Kulturplatten befindliches Nährmedium wurde abgesaugt und in die 6 bis 12 Vertiefungen jeweils 100 µl Lösung der zu untersuchenden Konzentration pipettiert. Die unbehandelten Kontrollen bestanden aus jeweils 6 bis 12 Wells, in die 100 µl pro Well NBM pipettiert wurden. Die sechs vorbereiteten Kulturplatten wurden nun bei 37 °C in 5 % kohlendioxidhaltiger Atmosphäre in humidifizierten Begasungsbrutschränken für 3, 6, 9, 12, 24 oder 48 Stunden inkubiert.

## 2.6 Sevofluranversuche

Zum Versuchsstart wurde das noch in den Wells befindliche NBM entfernt und jeweils 100 µl pro Well NBM zupipettiert. Die Modular Incubator Chamber (MIC) (Studer et al. 2000) wurde unter der LaminAir® Werkbank mit sechs in dieser Art vorbereiteten 96-Well-Zellkulturplatten und einer 6-Well-Platte mit 2 ml Aqua dest. pro Well, zur Aufrechterhaltung der humidifizierten Atmosphäre, befüllt. Anschließend wurde die Inkubationskammer an ein Anästhesiesystem mit einem Vapomasta 6 Sevofluran-Vaporisator angeschlossen und mit der Sevoflurananflutung begonnen. Über einen Zeitraum von 10 Minuten wurde mithilfe eines CAPNOMAC CO<sub>2</sub> und Agens Monitors je nach Versuchsansatz 4 oder 8 Vol% Sevofluran eingestellt und die MIC zur Aufrechterhaltung der Versuchstemperatur geschlossen in einem Begasungsbrutschrank platziert. Bei Plattenentnahme nach einer Expositionsdauer von 3, 6, 9, 12, 24 oder 48 Stunden wurde das quantitative Zellüberleben mithilfe der MTT-Methode bestimmt und die Volumenkonzentration von Sevofluran in der Kammer wiederhergestellt. Als Kontrollen dienten jeweils 6 bis 12 Wells unbehandelter Zellplatten des gleichen Zellalters, in die zu Versuchsbeginn 100 µl pro Well NBM pipettiert wurden und die jeweils dem gleichen Inkubationszeitraum entsprachen.



**Abb. 6:** Die Fotografie zeigt die mit Zellflaschen und Wellplatten befüllte Modular Incubator Chamber kurz nach Wiederaufsättigung der für den Versuch notwendigen Sevoflurankonzentration mithilfe eines Artec Anästhesiesystems.

## 2.7 Beeinflussung durch GABA-Rezeptor-Antagonisten

Zuerst wurden Gabazine / NBM- bzw. Picrotoxin / NBM-Lösungen der Konzentration 0,1 mM hergestellt. Unabhängig von folgender Propofol- oder Sevofluran-Exposition wurden 6 bis 12 Wells mit 100 µl der GABA-RA / NBM-Lösung für 30 Minuten in dem Begasungsbrutschrank präinkubiert. Anschließend wurden die entsprechenden Wells abgesaugt. Bei den Untersuchungen der Propofol-Exposition wurde in die vorbehandelten Wells eine vorher angefertigte Propofol [1 mg/ml] / GABA-RA<sub>A</sub> [0,1 mM] / NBM-Lösung gegeben. Für die Untersuchungen der Sevofluran-Exposition wurden die präinkubierten Zellkulturplatten-Wells vor Platzierung in der MIC mit 100 µl einer GABA-RA [0,1 mM] / NBM-Lösung befüllt. Analog zu den vorangegangenen Versuchen ohne GABA-RA wurde nach einer Expositionsdauer von 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden das quantitative Zellüberleben bestimmt und die Versuchsbedingungen in der Kammer wiederhergestellt.

## 2.8 Testung der Fragmentierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Die DNA-Fragmentierung zu Oligonukleosomen ist ein irreversibler Schritt im apoptotischen Programm. Eine am Ende der Apoptosesignalkaskade aktivierte Endonuklease führt durch Schneiden der DNA an den für das Enzym zugänglichen Linkerregionen der Nukleosomen zur Entstehung von DNA-Histon-Komplexen. Das verwendete Cell Death Detection ELISA<sup>PLUS</sup> Kit, ein quantitativer *sandwich-enzyme-immuno-assay*, ermöglicht den quantitativen Nachweis von Mono- und Oligonukleosomen unter Verwendung von monoklonalen Antikörpern gegen DNA und Histonproteine. Aufgrund der Nekrose-bedingten Steigerung der Ionen-Permeabilität der Zellmembran und deren resultierender Ruptur (osmotische Lyse) spricht der Nachweis von Nukleosomen in dem Zellkulturüberstand für einen nekrotischen Degenerationsvorgang, wohingegen diese bei apoptotischen Degenerationsvorgängen intrazellulär nachweisbar sind. Zur Unterscheidung eines nekrotischen von einem apoptotischen Degenerationsgeschehen wurden somit sowohl der Überstand, als auch die Zellen als Untersuchungsmaterial verwendet. Der Überstand der mit Propofol bzw. Sevofluran behandelten Zellen wurde vorsichtig entfernt und bei 2-8 °C zwischengelagert. Die in den Wells befindlichen Neuronen wurden mit 200 µl pro Well Lysepuffer für 30 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Anschließend wurden die

Wellplatten mitsamt Lysat bei 1100 rpm für 10 Minuten zentrifugiert, um kleine, lösliche DNA-Histon-Komplexe von hochmolekularen Bestandteilen zu trennen. Zu der mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatte wurden nun jeweils 20 µl pro Well des lysierten Überstandes sowie in weitere Wells 20 µl des im ersten Schritt entfernten Zellüberstandes pipettiert. In gleicher Art wurde mit unbehandelten Zellen (Negativkontrolle), einem gebrauchsfertigen DNA-Histon-Komplex (Positivkontrolle) und dem Inkubationspuffer (Leerkontrolle) verfahren. Im nächsten Schritt wurde unter Zugabe von 80 µl pro Well eines Immuno-Reagens (Gemisch aus Anti-Histon-Biotin und Anti-DNA-Peroxidase) die Wellplatte für 2 Stunden bei Raumtemperatur und 300 rpm auf einen MS1 Minishaker gestellt. Während dieser Inkubationsperiode bindet der Anti-Histon-Antikörper an die Histon-Komponente der eventuell vorhandenen Nukleosomen und wird als Immunokomplex an die mit Streptavidin beschichtete Mikrotiterplatte gebunden. Zusätzlich reagiert der Anti-DNA-POD-Antikörper mit der DNA-Komponente der Nukleosomen. Durch vorsichtiges, dreimaliges Spülen mit 300 µl Inkubationspuffer wurden ungebundene Komponenten entfernt. Die nun teilweise in den Wells vorliegende Peroxidase setzte die 100 µl des Substrats 2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonat) (ABTS) zu einem grünen Farbstoff um, welcher photometrisch im ELISA Microplate Reader bei 405 nm (gegen 492 nm) bestimmt wurde. Die gemessene Absorption der Farbstofflösung ist proportional zur Konzentration der Oligonukleosomen (Holdenrieder et al. 2004).

## **2.9 Beeinflussung der apoptotischen und protektiven Signaltransduktion**

Zu Beginn des Versuchs wurden eine zVAD-FMK / NBM-Lösung [0,04 mM], eine U0126 / NBM-Lösung [0,1 mM] und eine Iy294002 / NBM-Lösung [0,1 mM] hergestellt. Von den aus dem Inkubator entnommenen Zellkulturplatten wurde das Medium durch Absaugen entfernt und in 6-12 Wells 100 µl des zu untersuchenden Hemmstoffes apoptotischer Signalwege pipettiert. Nach einer Präinkubationszeit von 30 Minuten wurden die behandelten Wells erneut abgesaugt und in Abhängigkeit des Anästhetikums entweder mit 100 µl einer Propofol [1 mg/ml] / Hemmstoff [0,04 bzw. 0,01 mM] / NBM-Lösung für den Propofolversuch oder mit 100 µl einer Hemmstoff [0,04 bzw. 0,01 mM] / NBM-Lösung für den Sevofluranversuch befüllt. Bei den für 24 Stunden inkubierten Neuronen wurde das quantitative Zellüberleben mithilfe der MTT-Methode bestimmt.

## **2.10 Statistische Analyse und grafische Darstellung**

Alle ermittelten Viabilitäts- und Absorptionswerte werden angegeben als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM). Statistische Vergleiche der Gruppen bei Normalverteilung wurden unter Verwendung des T-Tests für unabhängige Stichproben oder gegebenenfalls der Multi-Varianz Analyse (ANOVA) und des Bonferroni Post-Tests durchgeführt. Sowohl die statistische Auswertung, als auch die Erstellung der Säulendiagramme erfolgte mit der Graphpad Prism Software. Alle p-Werte sind zweiseitig und wurden bei der Auswertung ab einem p-Wert von  $< 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Alleinige Propofolexposition

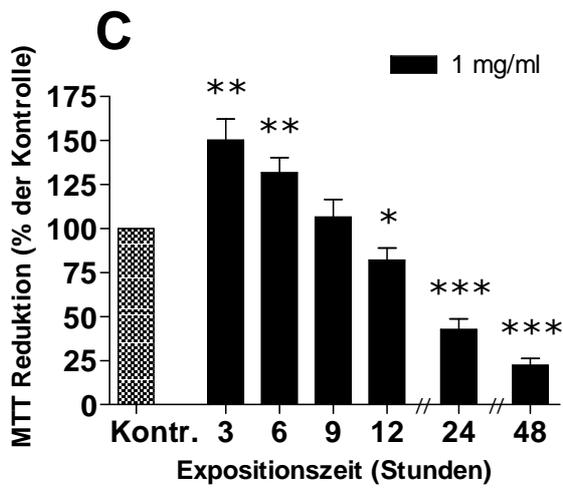
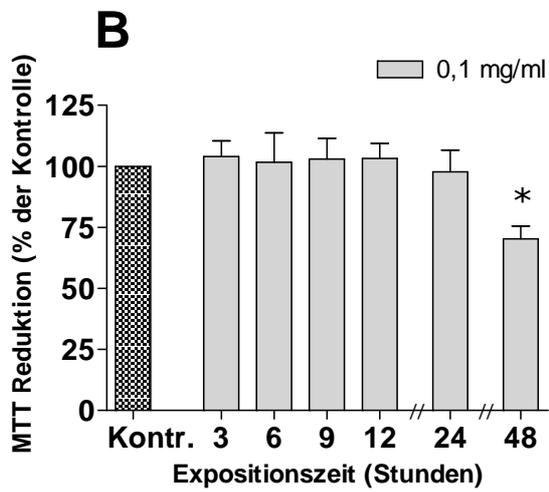
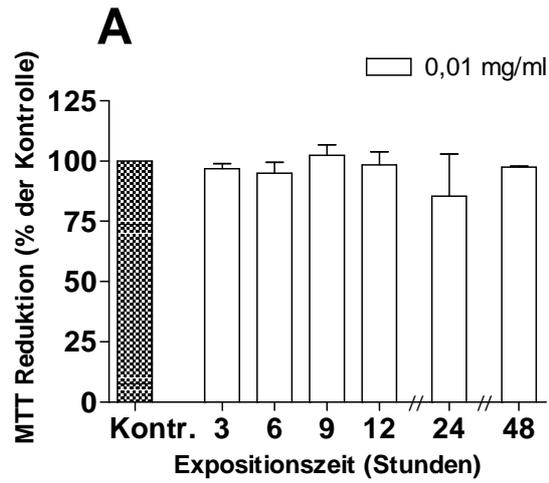
Bei einer Propofolkonzentration von 0,01 mg/ml zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des quantitativen Zellüberlebens gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 7A). Bei insgesamt fünf Versuchsdurchgängen betrug das mittlere Zellalter  $17,6 \pm 1,6$  DIV.

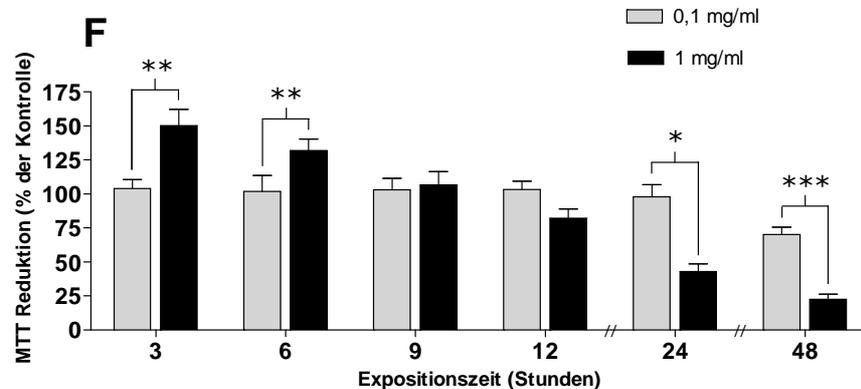
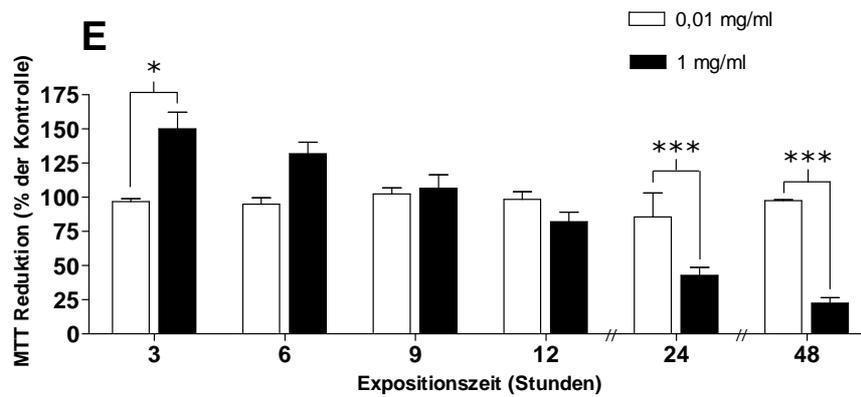
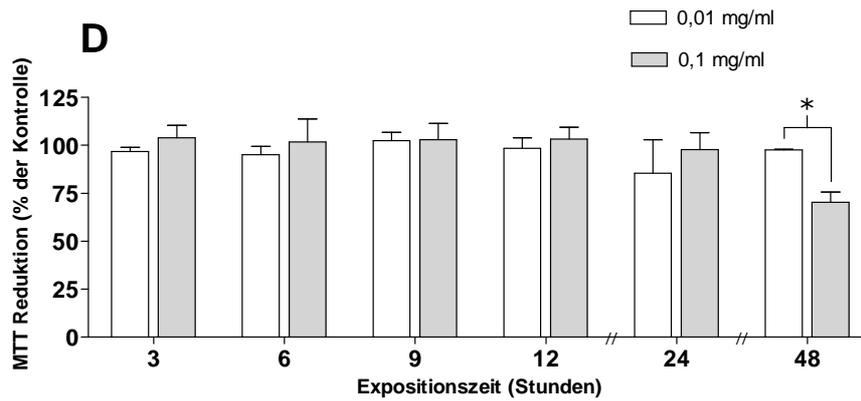
0,1 mg/ml Propofol zeigte im Vergleich zu dem Zeitraum von 3 bis 24 Stunden nach Applikation, in dem sich in Bezug auf die unbehandelte Kontrollgruppe keine statistische Signifikanz zeigte, bei einer Expositionsdauer über 48 Stunden einen signifikanten Rückgang der Überlebensfähigkeit um etwa zwei Drittel ( $70,3 \pm 5,3$  %,  $p=0,0113$ ) (Abb. 7B). Bei insgesamt fünf Versuchsdurchgängen betrug das mittlere Zellalter  $17,6 \pm 1,6$  DIV.

Nach 3 und 6 Stunden Exposition mit Propofol in der Konzentration 1 mg/ml war das quantitative Zellüberleben verglichen mit den Kontrollen signifikant größer ( $150,1 \pm 12,1$  %,  $p=0,0033$  bzw.  $131,8 \pm 8,5$  %,  $p=0,0056$ ). Nach 9 Stunden sanken die Werte auf ein Level der Kontrollgruppe ( $106,6 \pm 9,8$  %,  $p=0,5192$ ). Des Weiteren kam es zu einer signifikanten Verringerung der Überlebensrate nach 12, 24 und 48 Stunden Exposition ( $82,1 \pm 6,9$  %,  $p=0,0285$ ;  $42,8 \pm 5,9$  %,  $p<0,0001$  und  $22,4 \pm 4,0$  %,  $p<0,0001$ ) (Abb. 7C). Bei insgesamt zehn Versuchsdurchgängen betrug das mittlere Zellalter  $18,2 \pm 1,5$  DIV.

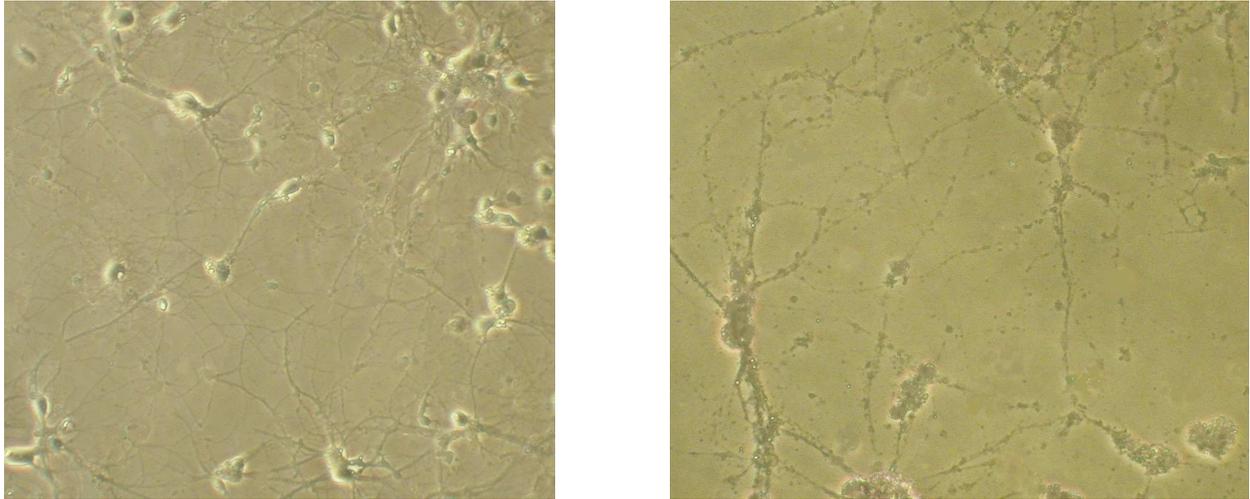
Zusätzlich zu den Einzelabbildungen (Abb. 7A-C) sind die direkten Vergleiche der Zellviabilitätswerte der drei untersuchten Propofolkonzentrationen in weiteren Abbildungen zusammengefasst (Abb. 7D-F)

Fotografien der mit Propofol in der Konzentration von 1 mg/ml für 24 Stunden behandelten Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie ließen morphologisch deutlich neurodegenerative Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen erkennen (Abb. 8).





**Abb. 7:** Zellviabilitätswerte von neonatalen primären neuronalen Kulturen der Ratte ermittelt nach 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden Exposition mit Propofol in den Konzentrationen 0,01 mg/ml (*weiß*) (A), 0,1 mg/ml (*grau*) (B) und 1 mg/ml (*schwarz*) (C). Gegenüberstellung von Zellviabilitätswerten bezüglich der Propofol Exposition von 0,01 mg/ml (*weiß*) und 0,1 mg/ml (*grau*) (D), der Propofol Exposition von 0,01 mg/ml (*weiß*) und 1 mg/ml (*schwarz*) (E), sowie der Propofol Exposition von 0,1 mg/ml (*grau*) und 1 mg/ml (*schwarz*) (F) für jeden Zeitabschnitt. Signifikanzen, verglichen mit unbehandelten Zellen als Kontrollen (*kariert*), sind gekennzeichnet mit \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM. *Methyl Thiazol Tetrazolium* (MTT).



**Abb. 8:** Fotografien mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops zeigen die Zellmorphologie von unbehandelten neuronalen Kontrollzellen (linke Seite) und Neuronen, die für 24 Stunden mit 1 mg/ml Propofol behandelt wurden (rechte Seite). 40-fache Vergrößerung.

### 3.2 Alleinige Sevofluranexposition

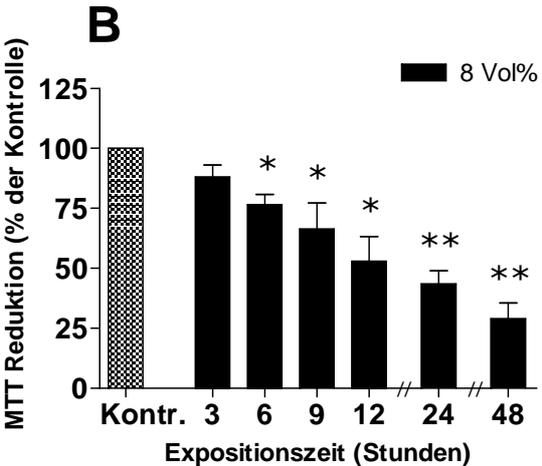
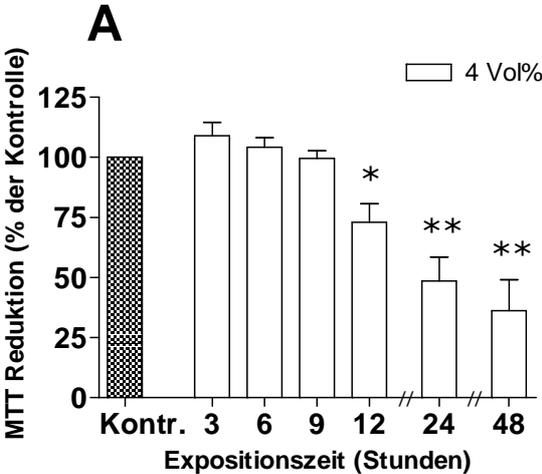
In den ersten 9 Stunden der Exposition mit Sevofluran in der Konzentration von 4 Vol% waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des quantitativ ermittelten Zellüberlebens messbar. Nach einer Expositionsdauer von 12, 24 und 48 Stunden kam es im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem deutlichen Abfall der Überlebensrate ( $73,0 \pm 7,7\%$ ,  $p=0,0246$ ;  $48,6 \pm 9,9\%$ ,  $p=0,0066$  und  $36,2 \pm 12,9\%$ ,  $p=0,0078$ ) (Abb. 9A). Bei insgesamt fünf Versuchsdurchgängen betrug das mittlere Zellalter  $17,6 \pm 1,6$  DIV.

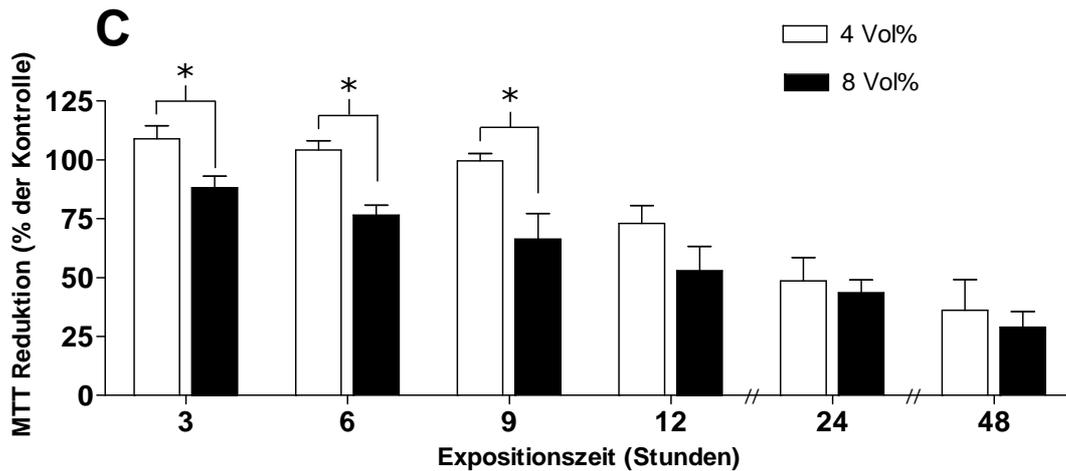
Bei einer Sevoflurankonzentration von 8 Vol% und eine Expositionsdauer von 3 Stunden zeigten sich keine statistischen Signifikanzen. Ab einer Inkubationszeit von 6 Stunden war ein messbarer Abfall der ermittelten Viabilitätswerte erkennbar: Diese betragen nach 6 Stunden  $76,5 \pm 4,3\%$  ( $p=0,0028$ ), nach 9 Stunden  $66,4 \pm 10,9\%$  ( $p=0,0363$ ), nach 12 Stunden  $53,0 \pm 10,3\%$  ( $p=0,0197$ ), nach 24 Stunden  $43,6 \pm 5,4\%$  ( $p=0,0005$ ) sowie nach 48 Stunden  $29,0 \pm 6,5\%$  ( $p=0,0004$ ) (Abb. 9B). Bei insgesamt sechs Versuchsdurchgängen betrug das mittlere Zellalter  $18,0 \pm 1,5$  DIV.

Bei Vergleich der beiden untersuchten Sevoflurankonzentrationen wurde eine signifikante Reduzierung der Zellviabilitätswerte von 3 bis 9 Stunden durch 8 Vol% Sevofluran deutlich, wohingegen ab einer Expositionsdauer von 12 Stunden keine signifikanten Unterschiede mehr feststellbar waren (Abb. 9C).

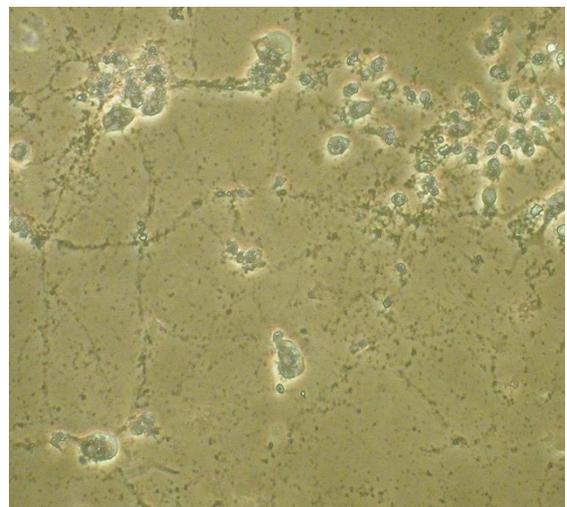
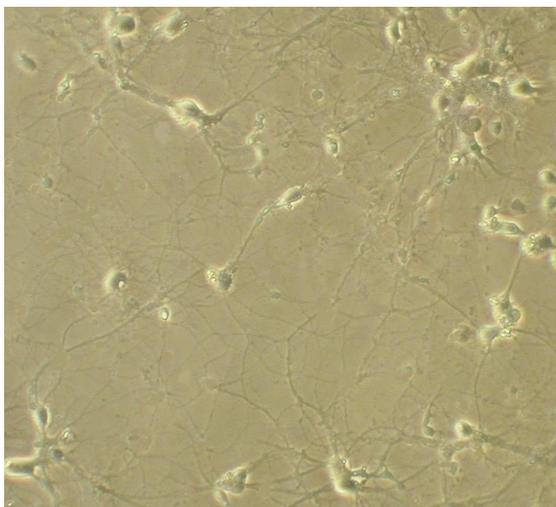
Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden mit Sevofluran in der Konzentration von

8 Vol% belegten Fotografien der behandelten Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie deutliche neurodegenerative Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 10).





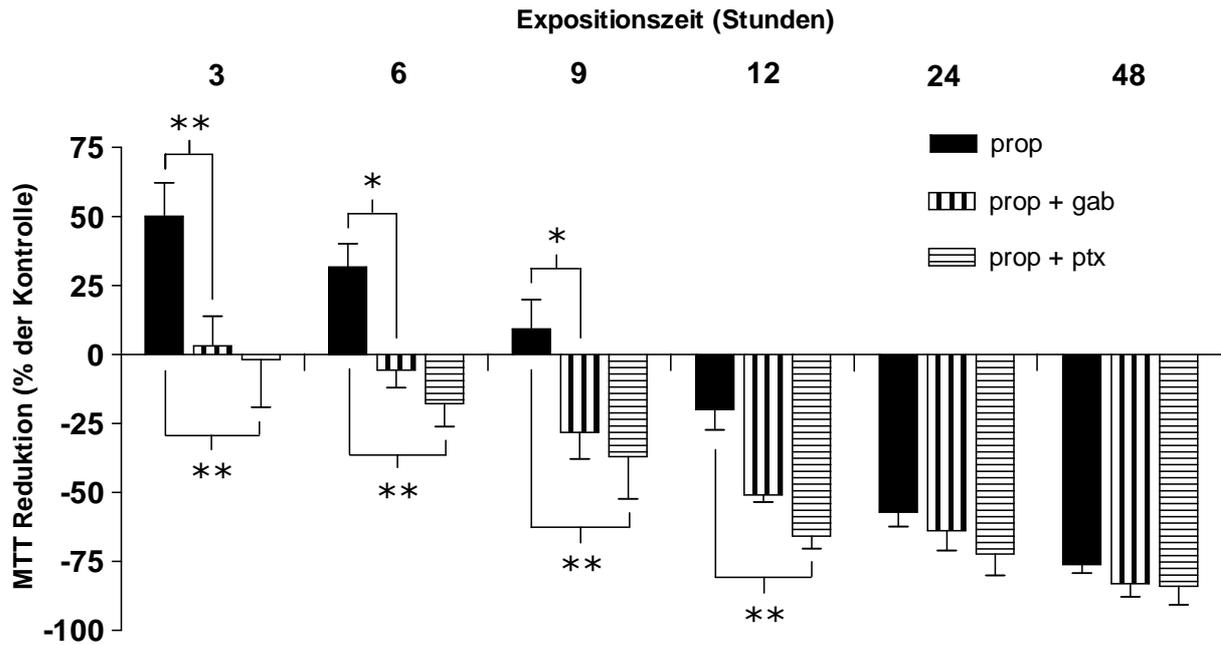
**Abb. 9:** Zellviabilitätswerte von neonatalen primären neuronalen Kulturen der Ratte ermittelt nach 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden Exposition mit Sevofluran in den Konzentrationen 4 Vol% (*weiß*) (**A**) oder 8 Vol% (*schwarz*) (**B**). Gegenüberstellung von Zellviabilitätswerten bezüglich der Sevofluran Exposition von 4 Vol% (*weiß*) und 8 Vol% (*schwarz*) für jeden Zeitabschnitt (**C**). Signifikanzen, verglichen mit unbehandelten Zellen als Kontrollen (*kariert*) (**A**, **B**) oder zwischen den beiden Versuchsgruppen (**C**), sind gekennzeichnet mit \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM. *Methyl Thiazol Tetrazolium* (MTT).



**Abb. 10:** Fotografien mithilfe eines Phasenkontrastmikroskops zeigen die Zellmorphologie von unbehandelten neuronalen Kontrollzellen (linke Seite) und Neuronen, die für 24 Stunden mit 8 Vol% Sevofluran behandelt wurden. 40-fache Vergrößerung.

### 3.3 Addition von GABA-Rezeptor-Antagonisten bei Propofolexposition

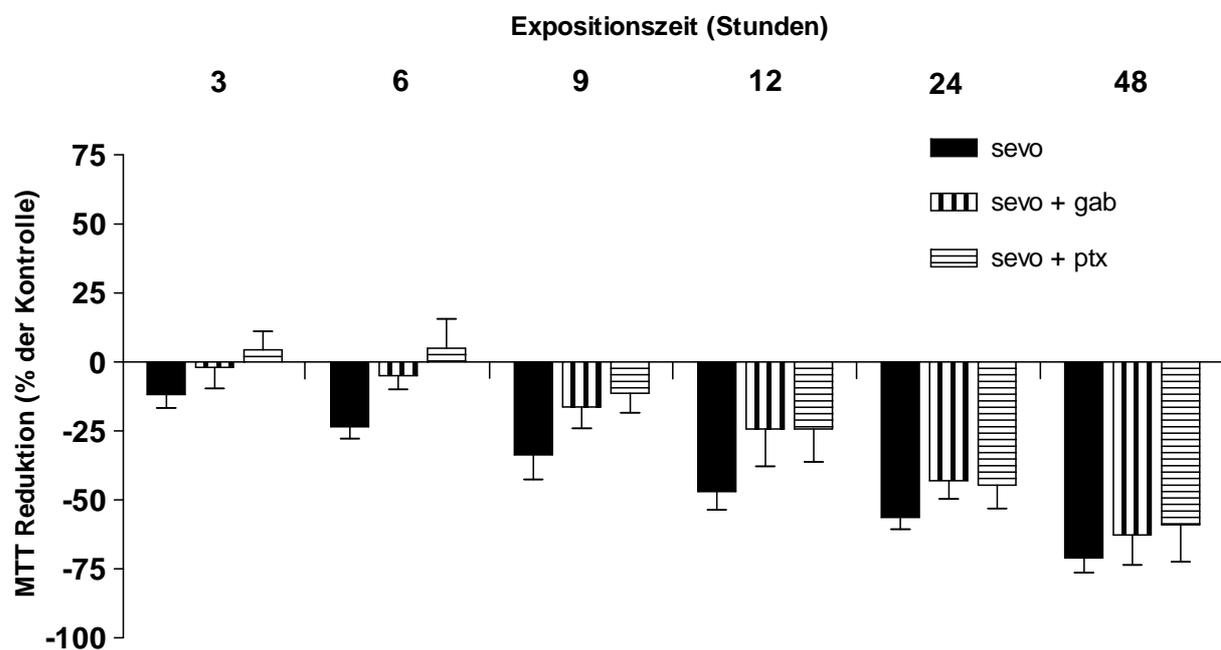
Nach 3, 6, 9 und 12 Stunden konnten signifikante Unterschiede hinsichtlich der Zellviabilität von Propofol-behandelten Neuronen, welche mit Gabazine (komp. GABA<sub>A</sub>-RA) oder mit Picrotoxin (nicht-komp. GABA<sub>A</sub>-RA) koexponiert waren, im Vergleich zu allein mit Propofol behandelten Zellen gezeigt werden (Abb. 11). Der Propofol-bedingte Anstieg des Zellüberlebens nach 3 und 6 Stunden (Abb. 7) wurde unter Addition von Gabazine (von +50,1 auf +3,2 %;  $p < 0,01$  nach 3 Stunden und von +31,8 % auf -5,6 %;  $p < 0,05$  nach 6 Stunden) oder Picrotoxin (von +50,1 auf -1,8 %;  $p < 0,01$  nach 3 Stunden und von +31,8 auf -17,8 %;  $p < 0,01$  nach 6 Stunden) vollständig aufgehoben. Bei einer Expositionsdauer von 9 und 12 Stunden konnte ein Rückgang der Zellviabilität verglichen mit der alleinigen Propofolexposition bei Addition von Gabazine (von +9,3 auf -28,2 %;  $p < 0,05$  nach 9 Stunden und von -19,9 auf -50,8 %;  $p > 0,05$  nach 12 Stunden) oder Picrotoxin (von +9,3 auf -37,0 %;  $p < 0,01$  nach 9 Stunden sowie von -19,9 auf -65,8 %;  $p < 0,01$  nach 12 Stunden) gemessen werden. Ab einer Versuchsdauer von 24 Stunden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Zellüberlebens zwischen den Versuchsgruppen, wobei die nach 3 bis 12 Stunden nachweisbare Viabilitätsreduktion durch die GABA<sub>A</sub>-RA in der Tendenz erkennbar blieb (Abb. 11). Bei insgesamt sechs (Gabazine) bzw. fünf (Picrotoxin) Versuchsdurchgängen betrug das mittlere Zellalter  $16,7 \pm 2,3$  DIV (Gabazine) bzw.  $18,4 \pm 1,9$  DIV (Picrotoxin).



**Abb. 11:** Zellviabilitätswerte von neonatalen primären neuronalen Kulturen der Ratte ermittelt nach 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden Exposition mit 1 mg/ml Propofol und den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten Gabazine [0,1 mM] (*längs gestreift*) und Picrotoxin [0,1 mM] (*quer gestreift*). Signifikanzen, verglichen mit Zellen, die nur mit 1 mg/ml Propofol behandelt wurden als Kontrollen (*schwarz*), sind gekennzeichnet mit \* ( $p < 0,05$ ) und \*\* ( $p < 0,01$ ). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert + / - SEM. *Methyl Thiazol Tetrazolium* (MTT), Propofol (prop) Gabazine (gab), Picrotoxin (ptx).

### 3.4 Addition von GABA-Rezeptor-Antagonisten bei Sevofluranexposition

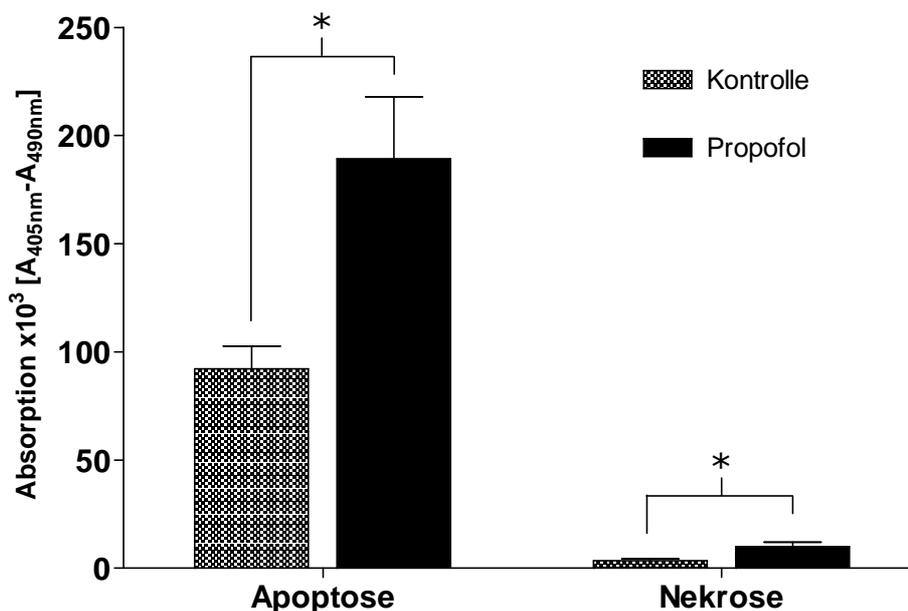
Sowohl bei der Verwendung von Gabazine als auch von Picrotoxin konnte kein signifikanter Einfluss der Rezeptor-Antagonisten auf die Sevofluranwirkung ermittelt werden. Allerdings war zu allen Messzeitpunkten eine Tendenz bezüglich einer Abschwächung des Sevofluran-bedingten Abfalls der Zellviabilitätswerte zu erkennen ( $p > 0,05$ ) (Abb. 12). Bei jeweils drei Versuchsdurchgängen (Gabazine und Picrotoxin) betrug das mittlere Zellalter  $17,0 \pm 2,1$  DIV.



**Abb. 12:** Zellviabilitätswerte von neonatalen primären neuronalen Kulturen der Ratte ermittelt nach 3, 6, 9, 12, 24 und 48 Stunden Exposition mit 8 Vol% Sevofluran und den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten Gabazine [0,1 mM] (*längs gestreift*) und Picrotoxin [0,1 mM] (*quer gestreift*). Signifikanzen, verglichen mit Zellen, die nur mit 8 Vol% Sevofluran behandelt wurden als Kontrollen (*schwarz*), konnten nicht festgestellt werden. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert + / - SEM. Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT), Sevofluran (sevo), Gabazine (gab), Picrotoxin (ptx).

### 3.5 DNA-Fragmentierung nach Propofolexposition

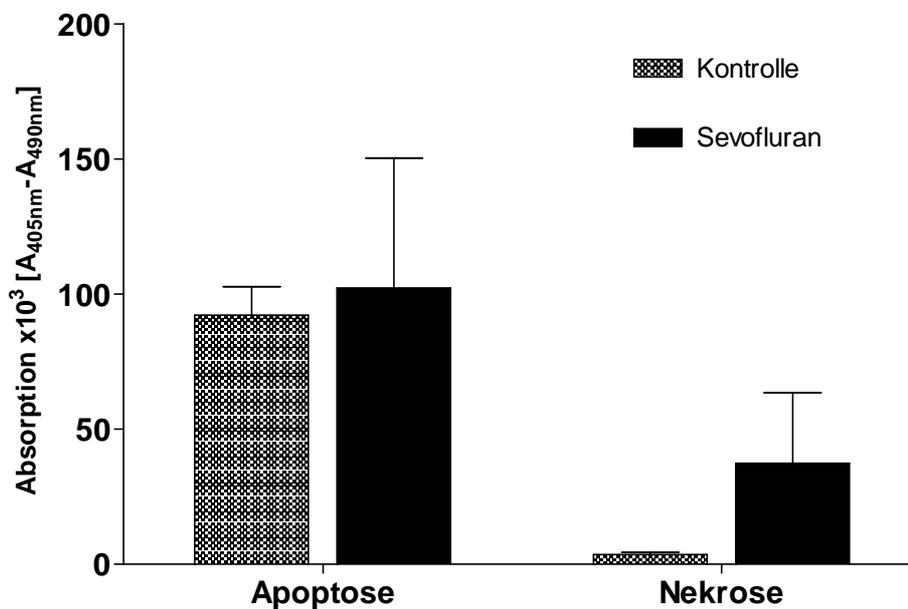
Die Evaluierung der Differenzierung des Zelltods in Apoptose und Nekrose ergab einen signifikanten Unterschied ( $p=0,0431$ ) bezüglich der Absorption und damit der Menge an detektierten apoptotischen Oligonukleosomen (Zelllysate) nach 24-stündiger Exposition mit Propofol in der Konzentration 1 mg/ml ( $189,3\pm 28,7$ ) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ( $92,3\pm 14,8$ ). Die Detektion nekrotischer Oligonukleosomen (Zellüberstand) ergab ebenfalls eine statistische Signifikanz ( $p=0,0499$ ) zwischen der Kontrolle ( $3,5\pm 0,9$ ) und den mit Propofol behandelten Zellen ( $10,0\pm 2,0$ ), lag jedoch insgesamt deutlich unter dem Absorptionsniveau der lysierten Zellen (Abb. 13). Somit lässt der ELISA nach Propofolexposition eine signifikante DNA-Fragmentierung hinsichtlich einer stark erhöhten, vorherrschenden Apoptose und einer leicht erhöhten Nekrose erkennen. Bei insgesamt vier Versuchsdurchgängen betrug das mittlere Zellalter  $16,3\pm 1,7$  DIV.



**Abb. 13:** Absorptionswerte von neonatalen primären neuronalen Kulturen der Ratte ermittelt nach 24 Stunden Exposition mit 1 mg/ml Propofol (*schwarz*) unter Verwendung des Cell Death Detection Kit ELISA<sup>PLUS</sup>. Signifikante Unterschiede, verglichen mit unbehandelten Zellen als Kontrollen (*kariert*), sind gekennzeichnet mit \* ( $p < 0,05$ ). Die Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM.

### 3.6 DNA-Fragmentierung nach Sevofluranexposition

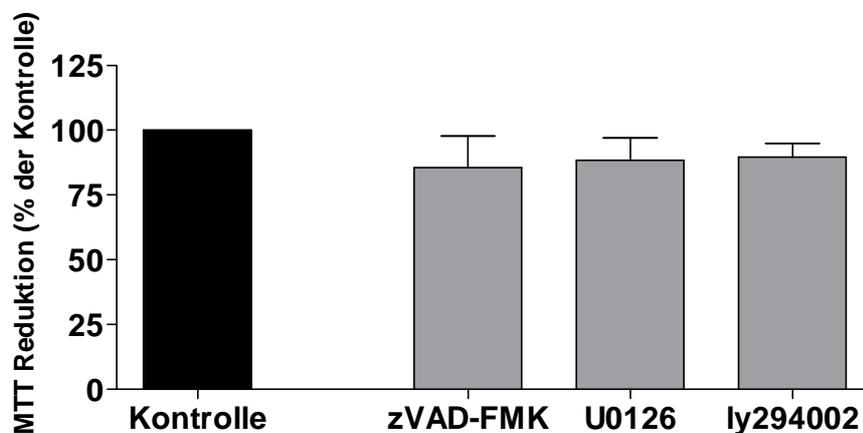
Die Untersuchung zur Spezifizierung des Zelltods mittels ELISA ergab nach 24 Stunden keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Menge an detektierten apoptotischen ( $p=0,8523$ ) und nekrotischen ( $p=0,3256$ ) Oligonukleosomen der mit 8 Vol% Sevofluran behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe: ( $102,3\pm 48,0$  bzw.  $92,3\pm 10,4$ ) und ( $37,3\pm 26,2$  bzw.  $3,5\pm 0,9$ ) (Abb. 14). Nach Sevofluranexposition zeigte sich somit die Tendenz zu einer leicht verstärkt ablaufenden Apoptose und einer deutlicheren, aber ebenfalls nicht signifikanten Steigerung der Nekrose. Bei insgesamt vier Versuchsdurchgängen betrug das mittlere Zellalter  $16,3\pm 1,7$  DIV.



**Abb. 14:** Absorptionswerte von neonatalen primären neuronalen Kulturen der Ratte ermittelt nach 24 Stunden Exposition mit 8 Vol% Sevofluran (*schwarz*) unter Verwendung des Cell Death Detection Kit ELISA<sup>PLUS</sup>. Signifikante Unterschiede, verglichen mit unbehandelten Zellen als Kontrollen (*kariert*), konnten nicht festgestellt werden. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM.

### 3.7 Proapoptotische / antiapoptotische Signalkaskaden bei Propofolexposition

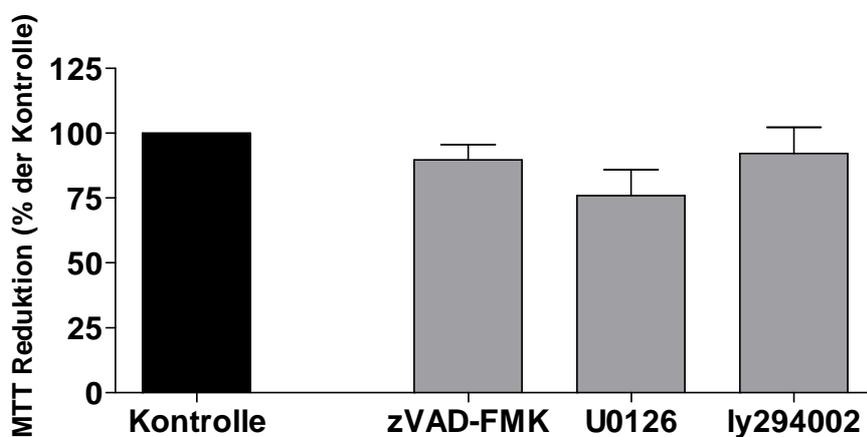
Nach Prä- und Koinkubation der Neuronen mit den drei untersuchten Hemmstoffen proapoptotischer / antiapoptotischer Signalwege: zVAD-FMK (Caspase-Inhibitor), U0126 (MEK-Inhibitor) und Iy294002 (PI3K-Inhibitor) konnte keine statistische Signifikanz hinsichtlich unterschiedlicher Zellviabilitätswerte ermittelt werden. Die Messwerte beziehen sich auf einen Expositionszeitraum von 24 Stunden und eine Propofolkonzentration von 1 mg/ml (Abb. 15). Bei jeweils fünf Versuchsdurchgängen betrug das mittlere Zellalter  $15,2 \pm 1,7$  DIV.



**Abb. 15:** Zellviabilitätswerte von neonatalen primären neuronalen Kulturen der Ratte ermittelt nach 24 Stunden Exposition mit 1 mg/ml Propofol und den Inhibitoren proapoptotischer bzw. antiapoptotischer Signalkaskaden zVAD-FMK [0,04 mM], U0126 [0,01 mM] oder Iy294002 [0,01 mM] (*grau*). Signifikante Unterschiede, verglichen mit Propofol-behandelten Zellen als Kontrollen (*schwarz*), konnten nicht festgestellt werden. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM. *Methyl Thiazol Tetrazolium* (MTT), Caspase-Inhibitor (zVAD-FMK), Inhibitor der mitogenaktivierten Protein-Kinase-Kinase (U0126), Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibitor (Iy294002).

### 3.8 Proapoptotische / antiapoptotische Signalkaskaden bei Sevofluranexposition

Weder mit zVAD-FMK noch mit U0126 oder Iy294002 konnte ein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich veränderter Zellviabilitätswerte nach 24 Stunden gegenüber den gemessenen Vergleichswerten nach Sevofluranexposition der Konzentration 8 Vol% gezeigt werden (Abb. 16). Bei jeweils vier Versuchsdurchgängen betrug das mittlere Zellalter  $16,3 \pm 2,1$  DIV.



**Abb. 16:** Zellviabilitätswerte von neonatalen primären neuronalen Kulturen der Ratte ermittelt nach 24 Stunden Exposition mit 8 Vol% Sevofluran und den Inhibitoren proapoptotischer bzw. antiapoptotischer Signalkaskaden zVAD-FMK [0,04 mM], U0126 [0,01 mM] oder Iy294002 [0,01 mM] (*grau*). Signifikante Unterschiede, verglichen mit Sevofluran-behandelten Zellen als Kontrollen (*schwarz*), konnten nicht festgestellt werden. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert + SEM. *Methyl Thiazol Tetrazolium* (MTT), Caspase-Inhibitor (zVAD-FMK), Inhibitor der mitogenaktivierten Protein-Kinase-Kinase (U0126), Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibitor (Iy294002).

## 4 Diskussion

Die mögliche Gefahr der Neurotoxizitätsinduktion bei Durchführung einer sonst scheinbar komplikationslosen Anästhesie von Früh- und Neugeborenen ist ein kontroverses, in hohem Maße diskutiertes Thema (Anand und Soriano 2004, Olney et al. 2004, Todd 2004). In der vorgelegten Arbeit wurde mittels MTT-Methode versucht, eine Aussage hinsichtlich möglicher Viabilitätsveränderungen bei neonatalen Neuronenkulturen der Ratte durch Propofol oder Sevofluran zu treffen.

Unsere Daten zeigen, dass die Inkubation mit 1 mg/ml Propofol nach drei und sechs Stunden eine signifikante Steigerung der Überlebensrate neuronaler Zellen bedingte, wohingegen ab 12 Stunden ein signifikanter Rückgang der Viabilitätswerte messbar war. Nach 12 Stunden Expositionsdauer mit Sevofluran in der Konzentration 4 Vol%, sowie bereits nach 6 Stunden bei 8 Vol% zeigte sich ein signifikanter Abfall der Zellviabilitätswerte. Die Propofol-bedingte neuroprotektive Wirkung war unter Verwendung der GABA-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben, während die sowohl durch Propofol als auch durch Sevofluran ausgelöste Neurodegeneration nicht beeinflusst wurde. Die Evaluation der Art des vorherrschenden Degenerationsvorganges unter Anwendung eines DNA-Fragmentierungs-ELISAs ließ auf eine signifikante Propofol-bedingte Erhöhung der Apoptose- und Nekroserate sowie auf eine nur tendenziell erkennbare Nekrosesteigerung durch Sevofluran schließen. Bei den verwendeten Caspase- und Proteinkinase-Inhibitoren konnte keine signifikante Zellviabilitätsänderung nachgewiesen werden.

### 4.1 Anästhetika mit neurodegenerativem Potential

Auch wenn von neuroprotektiven Effekten durch Anästhetika bei Hypoxie- und Ischämie-bedingten Nervenschädigungen im reifen Gehirn berichtet wurde (Head und Patel 2007, Himmelseher und Durieux 2005), beschreibt eine Reihe von Studien einen neurodegenerativen Einfluss GABA-agonistisch und / oder NMDA-antagonistisch wirkender Anästhetika im unreifen Gehirn (Bittigau et al. 2002, Mellon et al. 2007, Fredriksson et al. 2007, Jevtovic-Todorovic et al. 2003). Diese Empfindlichkeit besitzt ihre größte Ausprägung in dem als „Phase des rapiden Gehirnwachstums“

bezeichneten, umschriebenen Zeitraum der Hirnentwicklung. Im Gegensatz zu dem Gehirn von Nagetieren, bei denen diese Periode die ersten drei postnatalen Wochen umfasst, zeigt sich bei Betrachtung des menschlichen Gehirns eine im dritten Trimester beginnende und bis zum Alter von zwei Jahren reichende temporäre Ausweitung (Dobbing und Sands 1979, Fredriksson et al. 2007, Ikonomidou et al. 2000). Ein Großteil der in diesem Bereich publizierten Studien befasste sich mit neurodegenerativen Effekten des NMDA-blockierenden Anästhetikums Ketamin, dessen Anwendung in der pädiatrischen Medizin in den letzten Jahren rückläufig ist (Mellon et al. 2007). Eine ausgeprägte Neurodegeneration nach Ketamin und anderen NMDA-Rezeptor-Antagonisten wurden an Gehirnen neonataler Ratten (Ikonomidou et al. 1999) und Mäusen (Young et al. 2005) gezeigt. Des Weiteren konnte bei Ketamin-Applikation in nicht-apoptotischen Dosen eine Beeinträchtigung der dendritischen Aussprossung GABAerger Rattenneuronen nachgewiesen werden (Vutskits et al. 2006). Die 2007 publizierte Studie von Fredriksson et al. weist interessanterweise zudem auf eine Potenzierung des Ketamin-abhängigen Unterganges neonataler Nervenzellen durch zusätzliche Verabreichung GABAerger Substanzen (z. B. Barbiturate, Propofol) hin (Fredriksson et al. 2007). Ein weiteres über die Inhibition des NMDA-Rezeptors wirkendes Anästhetikum, das Lachgas ( $N_2O$ ), konnte bei unterschiedlichen in vivo Modellen mit Verhaltensänderungen und neurodegenerativen Effekten in Verbindung gebracht werden (Jevtovic-Todorovic et al. 2000, Jevtovic-Todorovic et al. 1998). Auch Stoffe mit überwiegend  $GABA_A$ -agonistischen Eigenschaften wie Propofol, Barbiturate und Benzodiazepine verfügen über ein, in zahlreichen Studien belegtes, neurotoxisches Potential (Bittigau et al. 2002, Gascon et al. 2007, Young et al. 2005). Bei GABAergen Neuronen, als Bestandteil von Nervenzellkulturen der Ratte, konnte im Gegensatz zu Gliazellen eine signifikante Vulnerabilität gegenüber Propofol nachgewiesen werden (Honegger und Matthieu 1996). Zusätzlich wurde 2005 von Vutskits et al. publiziert, dass in einem in-vitro Rattenmodell bereits klinisch relevante Propofolkonzentrationen die dendritische Differenzierung GABAerger Interneuronen beeinflussen können, wohingegen dieses Phänomen unter Midazolamgabe nicht zur Ausprägung kam (Vutskits et al. 2005).

## 4.2 Propofol

### 4.2.1 Propofolwirkung bei primären, neonatalen Neuronenkulturen der Ratte

In der vorgelegten Arbeit konnte kein signifikanter Einfluss des Hypnotikums Propofol bei einer Konzentration von 0,01 mg/ml bezüglich möglicher Viabilitätsänderungen festgestellt werden, wohingegen sich bei höheren Konzentrationen [0,1 mg/ml] zuerst ein signifikanter Rückgang der Zellüberlebensrate bei Langzeitexposition (48 Stunden) zeigte. Bei der höchsten getesteten Konzentration von 1 mg/ml konnte zwischen einer frühzeitigen, 3 bis 6 Stunden dauernden, signifikanten Erhöhung und einem, im Vergleich zur geringeren Konzentration von 0,1 mg/ml, stärker ausgeprägten und bereits ab 12 Stunden einsetzenden Absinken der Zellviabilität unterschieden werden. Der signifikante, potentiell neuroprotektive Effekt bei 1 mg/ml Propofol bei 3 Stunden war deutlich stärker ausgeprägt als der nach 6 Stunden. Im Zusammenhang mit einer Ischämie-bedingten Zellschädigung konnte die protektive Wirkung des Anästhetikums bereits in einigen Studien gezeigt werden: So berichteten Young et al. 1997, dass die Infarktgröße bei mit Propofol anästhesierten im Vergleich zu Isofluran-anästhesierten Ratten signifikant kleiner war (Young et al. 1997). Gelb und Kollegen zeigten 2002, dass eine über einen Zeitraum von vier Stunden dauernde Propofolgabe, welche sofort oder eine Stunde nach einer fokalen Ischämie begonnen wurde, das Infarktausmaß signifikant verkleinerte (Gelb et al. 2002). Dieser Effekt des Hypnotikums wird mit seiner Fähigkeit, als Radikalfänger zu wirken, dem Senken der Glutamatfreisetzung und der Potenzierung der GABA<sub>A</sub>-bedingten Inhibition der synaptischen Übermittlung in Zusammenhang gebracht (Kawaguchi et al. 2005).

Bei unseren hier vorgestellten Versuchsreihen in der Zellkultur wurden allerdings keine ischämischen Bedingungen erzeugt, so dass sich der zugrunde liegende Schaden bzw. der potentielle Schutz des Anästhetikums erst über die genaue Betrachtung des Versuchsablaufs erklären lässt. Zu Versuchsbeginn kommt es aufgrund des standardisiert durchgeführten Austausches des auf der Kultur befindlichen Nährmediums mit der Propofol / NBM-Lösung (bzw. der reinen NBM-Lösung bei der Kontrollgruppe) zu einer Änderung des extrazellulären Milieus auf der Zellkulturplatte. Diese schlagartige Veränderung der chemischen Zusammensetzung resultiert in einem begrenzten Zelluntergang (Arden und Betenbaugh 2006). Zur Vermeidung dieser Kausalität wird bei einem Mediumwechsel im Rahmen der Zellfütterung empfohlen, nur

die Hälfte des Mediums zu wechseln (Arden und Betenbaugh 2004), wobei dies durch die Notwendigkeit der Einhaltung einer genauen Wirkstoffkonzentration bei Versuchsbeginn nicht realisierbar ist. Diese versuchsbedingte leichte Neurodegeneration, welche im Vergleich zur Kontrollgruppe durch Propofol [1 mg/ml] in einem frühen Expositionszeitraum (bis 6 Stunden) abgeschwächt wurde, erklärt auch den positiven Nachweis von DNA-Histon-Komplexen (Apoptose) im DNA-Fragmentierungs-ELISA.

Die ab 48 Stunden [0,1 mg/ml] bzw. ab 12 Stunden [1 mg/ml] ersichtliche, potentiell neurodegenerative Wirkung von Propofol lässt auf eine deutliche Empfindlichkeit der gewonnenen Neuronenkultur in dieser Phase des Gehirnwachstums gegenüber einer hohen Konzentration des Anästhetikums Propofol bei Langzeitexposition schließen. Bereits 1994 konnte nach Propofolgabe ein Anstieg der zytosolischen freien  $Ca^{2+}$ -Konzentration und einhergehende Veränderungen in der Organisation des Aktin-Zytoskeletts bei menschlichen Gliazellen und Rattenneuronen nachgewiesen werden (Jensen et al. 1994). 1996 zeigten Honegger und Matthieu, dass vor allem GABAerge Neuronen von Ratten eine hohe Vulnerabilität gegenüber der Langzeitexposition von Propofol besitzen (Honegger und Matthieu 1996). In späteren Studien wurde diese neurotoxische Wirkkomponente vor allem bei kortikalen Neuronen neugeborener Ratten bestätigt (Spahr-Schopfer et al. 2000).

#### **4.2.2 Einfluss von GABA-Rezeptor-Antagonisten auf die Propofolwirkung**

Unter Verwendung der GABA-Rezeptor-Antagonisten Gabazine und Picrotoxin mit Propofol kam es in unserer Untersuchung zu einem signifikanten Rückgang der ermittelten Zellviabilitätswerte bis 9 (Gabazine) bzw. bis 12 Stunden (Picrotoxin), was u. a. zu einer kompletten Aufhebung des Propofol-bedingten neuroprotektiven Effekts nach 3 und 6 Stunden führte. Die Blockade des ligandengesteuerten Chloridionenkanals mittels  $GABA_A$ -Rezeptor-Antagonist sowie die damit einhergehende Unterbindung der Propofol-bedingten Polaritätsänderung resultierte in einem kurzfristig (bis 12 Stunden) gesteigerten Toxizitätspotential von Propofol. Dies lässt sich unter Beachtung der  $GABA_A$ -Rezeptor-Antagonisten-bedingten Blockierung der unphysiologisch langen Stimulation von unreifen Neuronen via  $GABA_A$ -Agonist (Propofol) erklären, wodurch eine Verstärkung der exzitatorischen Komponente der GABA-Wirkung während der Entwicklungsphase möglicherweise verhindert wird

(Khazipov 2004). Allerdings müssten weitergehende Versuche mittels Patch-Clamp-Technik angeschlossen werden, um eine definitive Aussage hinsichtlich der entwicklungsbedingten Regulation des neuronalen GABA<sub>A</sub>-Rezeptors in den untersuchten Kulturen machen zu können. Unabhängig davon lässt die fehlende Beeinflussung der Propofol-bedingten Neurodegeneration nach 24 und 48 Stunden die Dominanz eines GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-unabhängigen Wirkmechanismus vermuten. So könnte eventuell ein Propofol-bedingter potentieller Agonismus am Glycin- oder Kainat-Rezeptor (Yamakura et al. 2001) auch für die in mehreren Studien nachgewiesenen Propofoleigenschaften verantwortlich sein: ein Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration und damit einhergehende Veränderungen der Aktinorganisation (Jensen et al. 1994) oder der vermehrten Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) und Blockierung der Makrophagenfunktion (Chen et al. 2003).

#### **4.2.3 Evaluation des Propofol-bedingten Zelltods**

In der vorliegenden Arbeit sprechen die Ergebnisse des durchgeführten DNA-Fragmentierungs-ELISAs für das Überwiegen einer apoptotischen Zelldegeneration und befinden sich damit in Übereinstimmung mit dem gegenwärtigen Forschungsstand. Mithilfe einer Fluor-Jade Anfärbung von Mäuseuronen konnte bei einer hohen Propofolkonzentration allein oder in Koexposition mit Ketamin eine Steigerung der Apoptoserate detektiert werden (Fredriksson et al. 2007). Eine signifikante neuronale Apoptose bei Mäusejungtieren konnte bei intraperitonealer Applikation von 50 mg Propofol pro kg Körpergewicht (KG) ausgelöst werden. Dies entspricht einem Viertel der für die OP-Fähigkeit in diesem Tiermodell benötigten Narkotikumdosis (Cattano et al. 2008). Eine exzessive Inhibition bei reifen Neuronen bzw. eine resultierende Exzitation unreifer Neuronen durch die Propofol-bedingte GABA-Potenzierung als Auslöser der apoptotischen Neurodegeneration scheint im Hinblick auf die in den Versuchen gezeigte GABA<sub>A</sub>-Unabhängigkeit wenig wahrscheinlich.

Die im Anschluss durchgeführten Versuche zur Spezifizierung des ablaufenden apoptotischen Signaltransduktionsweges ergaben keine signifikanten Ergebnisse. So konnte trotz irreversibler Hemmung der Caspasen durch die Addition von zVAD-FMK (Lavrik et al. 2005) keine Steigerung der Anzahl lebender Zellen erzielt werden. Ein schützender Effekt vor apoptotischer Degeneration durch die Aktivierung von extrazellulär regulierten Kinasen 1/2 und der Phosphoinositid-3-Kinase wurde

hinreichend beschrieben (Buckley et al. 1999, Honda et al. 2000). Sowohl der eingesetzte Inhibitor der ERK1/2 als auch jener der PI3K führten zu einer Degenerationsteigerung in einem Modell Hypoxie-induzierter Apoptose bei Gehirnschnitten neonataler Ratten (Hirai et al. 2004). In Kulturen unreifer Oligodendrozyten wirkte Östrogen einer Hypoxie-induzierten Inaktivierung der ERK1/2 und PI3K entgegen und reduzierte somit signifikant die Apoptoserate (Gerstner et al. 2007). In der vorliegenden Arbeit führte die Blockierung des extrinsischen antiapoptotischen Signalweges mittels U0126 (ERK1/2-Inhibitor) und Iy294002 (PI3K-Inhibitor) nicht zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber den zuvor detektierten, ablaufenden apoptotischen Degenerationsvorgängen. Zur Festigung der These des, mithilfe des DNA-Fragmentierungs-ELISAs identifizierten, vorherrschenden apoptotischen Zellunterganges sind immunhistochemische oder immunocytochemische Nachweise unter Verwendung von Antikörpern anzuraten.

### **4.3 Sevofluran**

#### **4.3.1 Sevofluranwirkung bei primären, neonatalen Neuronenkulturen der Ratte**

Die Untersuchung von möglichen zeit- und dosisabhängigen Effekten des Anästhetikums Sevofluran auf primäre neuronale Zellkulturen der Ratte war ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit. Dies stellt eine Erweiterung der Datenlage hinsichtlich einer möglichen Beeinflussung des sich entwickelnden Gehirns durch volatile Anästhetika dar, welche bisher stark auf Studien mit Halothan, Isofluran und Lachgas beschränkt ist. Nach Gewinnung und Kultivierung von hippocampalen Schnittkulturen aus sieben Tage alten Rattenjungtieren konnte die stärkste Ausprägung neurodegenerativer Effekte bereits bei einer Isoflurankonzentration von 1,5 Vol% und einer Expositionszeit von nur fünf Stunden beobachtet werden (Wise-Faberowski et al. 2005). Eine auf alleinige Isofluran- oder Kombinations-Anästhesie mit Midazolam und Lachgas folgende Neurodegeneration konnte bereits an sieben Tage alten Ratten nachgewiesen werden (Jevtovic-Todorovic et al. 2003). Studien und Fallberichte zeugen von möglichen eleptiformen EEG-Veränderungen sowie kurzzeitigen, postoperativen Verhaltensänderungen, z. B. vermehrten Wutanfällen, Schlafstörungen und Appetitlosigkeit nach einer Sevoflurananästhesie bei Kleinkindern (Conreux et al. 2001,

Vakkuri et al. 2001, Keaney et al. 2004, Kain et al. 2005, Stargatt et al. 2006). Anhand eines experimentellen Tiermodells gewonnene Daten zur präklinischen Untersuchung der Sevofluran-Effekte an unreifen Neuronen existieren bis jetzt nicht (Loepke und Soriano 2008).

Eine durch die Versuche ableitbare Aussage dieser Arbeit ist, dass eine Sevofluran-Exposition bei unserem verwendeten in vitro Tiermodell eine neuronale Degeneration zur Folge hat. Dies wird durch die ermittelten, einer Zeitabhängigkeit folgenden, signifikant reduzierten Zellviabilitätswerte nach 12 Stunden bei 4 Vol% Sevofluran bzw. bereits nach 6 Stunden bei 8 Vol% Sevofluran deutlich. Zusätzlich lassen die Daten eine klare Konzentrationsabhängigkeit bezüglich des Auftretens potentiell neurodegenerativer Effekte erkennen. So induzierte die höhere Sevoflurankonzentration von 8 Vol% im Vergleich zu den untersuchten 4 Vol% im Verhältnis zur Kontrollgruppe eine deutlich stärker ausgeprägte Neurodegeneration.

#### **4.3.2 Einfluss von GABA-Rezeptor-Antagonisten auf die Sevofluranwirkung**

Als einer der wichtigsten Mechanismen der anästhetischen Wirkungsentfaltung von Sevofluran und den anderen volatilen Anästhetika ist die Interaktion mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor anzusehen (Campagna et al. 2003, Rudolph und Antkowiak 2004). Obwohl Sevofluran die inhibitorische, postsynaptische Öffnungswahrscheinlichkeit an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren verstärkt, scheint dies durch die nur tendenziell nachweisbare Abschwächung der neurodegenerativen Wirkung durch die GABA-RA in unseren durchgeführten Versuchen nicht der vorherrschende Mechanismus zu sein. Ob die gezeigte Neurodegeneration über weitere, mit der Wirkung volatiler Anästhetika assoziierter Rezeptoren (z. B. Acetylcholin-, Serotonin-, Glycin- und Glutamat-Rezeptoren) vermittelt wird (Campagna et al. 2003, Rudolph und Antkowiak 2004) oder eine Interferenz mit zytoplasmatischen Signalproteinen, wie Proteinkinase C (Hemmings und Adamo 1994, Slater et al. 1993) wahrscheinlich ist, wurde nicht geklärt und sollte Bestandteil weiterer Studien sein.

#### **4.3.3 Evaluation des Sevofluran-bedingten Zelltods**

Die Apoptose war in diversen Modellen, die sich mit Neurodegeneration durch volatile Anästhetika beschäftigten, der zugrunde liegende Mechanismus der Schädigung. So

kam es vor allem bei Mäusen und Ratten nach alleiniger Isofluran-Exposition in der Konzentration von 0,75 bis 1,5 Vol% nach 4 bis 6 Stunden zu einer nachweisbaren Apoptose von Neuronen (Ma et al. 2007, Yon et al. 2005, Young et al. 2005). In einer von Loepke und Soriano 2008 veröffentlichten Übersichtsarbeit wird deutlich, dass die Gewichtung der Untersuchungshäufigkeit von Wirkstoffen stark zu Gunsten der traditionell verwendeten volatilen Anästhetika ausfällt: Von den 30 zusammengetragenen präklinischen Studien über Anästhetika-induzierte Effekte auf die neuronale Struktur bei neonatalen Tieren betrafen 18 Studien das Anästhetikum Isofluran, während weitere 6 Halothan-, 4 Lachgas- und 2 Xenon-Effekte untersuchten. Es bleibt festzuhalten, dass obwohl Sevofluran in der Kinderanästhesie der meist genutzte volatile Wirkstoff zur Narkoseeinleitung ist, keine tierexperimentellen Daten hinsichtlich der Beobachtung neuronaler Strukturen und neurokognitiven Verhaltens nach Sevoflurangabe existieren (Loepke und Soriano 2008). In der vorliegenden Arbeit zeichnet sich, ausgehend von den Ergebnissen des DNA-Fragmentierungs-ELISAs, das Vorherrschen eines tendenziell, jedoch nicht signifikanten, nekrotischen Degenerationsvorganges ab. Eine Blockierung des extrinsischen apoptotischen Signalweges mittels zVAD-FMK konnte den Sevofluran-bedingten Zelluntergang nach 24 Stunden Exposition nicht verhindern oder abschwächen. Der Versuch einer intrinsischen Inhibition der ERK1/2 oder der PI3K zeigte keinen Apoptose-verstärkenden Effekt. Auch wenn eine Aktivierung sowohl des extrinsischen als auch des intrinsischen apoptotischen Signalweges in einem in vivo-Tiermodell durch Isofluran gezeigt werden konnte (Yon et al. 2005), war dies hier nach Sevofluran-Exposition nicht möglich. Weiterführende Versuche, unter Verwendung weiterer etablierter Techniken wie der direkten Detektion der Caspase-3-Aktivierung mithilfe von Western Blot oder Immunhistochemie (Ma et al. 2007, Olney et al. 2002), wären sinnvoll.

#### **4.4 Kritische Bewertung der verwendeten Methodik**

Der Vorteil primärer neuronaler Kulturen besteht in dem guten quantitativen und langfristigen Überleben auf Platten ausgesäeter Zellen in serumfreiem B27 / Neurobasal-Medium (Brewer 1995). Folglich benutzten wir primäre neuronale Kulturen embryonaler Ratten, um den Fokus der Studie auf die Erforschung eines Anästhetika-bedingten potentiell neurodegenerativen Einflusses bei sich entwickelnden Neuronen zu richten.

#### **4.4.1 Beurteilung der verwendeten Propofolkonzentrationen**

In einer klinischen Studie wurden nach einer Narkoseeinleitung mit Propofol (2 mg/kg KG) und einer Erhaltungsdosis von 8 mg/kg Körpergewicht pro Stunde für 15 Minuten Blutplasmakonzentrationen von ca. 2,2 µg/ml nach 5 Minuten sowie Liquorkonzentrationen von ungefähr 35 ng/ml nach 15 Minuten gemessen (Engdahl et al. 1998). Die gewählte Propofolkonzentration von 1 mg/ml scheint somit in Bezug auf die ermittelten Werte sehr hoch gewählt. Hierbei sei zum einen ausdrücklich darauf hingewiesen, dass eine Ungenauigkeit hinsichtlich eines Dosisvergleichs zwischen humanem und Nagetiergewebe sowie zwischen in vivo und in vitro Studien besteht und zum anderen bedacht werden muss, dass keine Daten bezüglich der potentiellen Kumulation und der damit verbundenen lokalen Konzentration im humanen Hirngewebe bei Langzeitapplikation existieren (Loepke und Soriano 2008). Eine klinische Relevanz von Untersuchungen mit hohen Propofolkonzentrationen von bis zu 1 mg/ml kann folglich nicht vollständig ausgeschlossen werden.

#### **4.4.2 Beurteilung der verwendeten Sevoflurankonzentrationen**

Sowohl die Exposition mit 4 Vol% als auch die mit 8 Vol% Sevofluran verursachten im untersuchten Tiermodell eine detektierbare Neurodegeneration. Studiendaten belegen, dass Ratten im Allgemeinen eine höhere *minimum alveolar concentration* (MAC) benötigen, um ein definiertes Anästhesie-Niveau aufrecht zu erhalten (Barbry et al. 2007). Zudem ist der MAC-Wert von Sevofluran altersabhängig: Er variiert zwischen 2,0 Vol% bei Erwachsenen und 3,3 Vol% bei Neugeborenen (Hobbhahn und Funk 1996) bzw. zwischen 2,95 Vol% bei 30 Tage alten Ratten und 3,74 Vol% bei drei Tage alten Ratten (Orliaguet et al. 2001). Somit wirkt vor allem die gewählte Konzentration von 8 Vol% Sevofluran hoch angesetzt, wobei bedacht werden muss, dass während der klinischen Anästhesie-Einleitung auch bei Kindern Sevoflurankonzentrationen von bis zu 8 Vol% erreicht und kurzzeitig aufrechterhalten werden (Ho et al. 2004). Letztendlich muss festgehalten werden, dass mit den gewonnenen in-vitro-Daten die Möglichkeit einer Zellschädigung bei Sevofluranexposition in Kinderanästhesie-relevanten Konzentrationen bei in-vivo-Modellen nicht ausgeschlossen werden kann.

#### 4.4.3 Extrapolation der klinischen Relevanz aus den Versuchsdaten

Verständlicherweise existieren unterschiedliche Meinungen hinsichtlich der klinischen Relevanz der durch experimentelle Studien belegten Anästhetika-bedingten Neurotoxizität im sich entwickelnden Gehirn. Eine der wichtigsten Überlegungen ist, inwiefern Wirkstoffeffekte zwischen verschiedenen Spezies vergleichbar sind (Berde und Cairns 2000). In diesem Kontext seien neueste Untersuchungen erwähnt, nach denen bereits subklinische Dosen aktuell verwendeter Anästhetika auch bei Schweinen und Affen eine neuronale Apoptose induzieren können (Rizzi et al. 2008, Slikker et al. 2007). Die Tatsache, dass in den meisten Studien relativ hohe Anästhetikakonzentrationen Voraussetzung für messbare neurotoxische Effekte waren, stellt einen weiteren oft angebrachten Kritikpunkt dar (Anand und Soriano 2004). Unterstützt wird dies durch Hinweise, nach denen eine über Stunden dauernde Narkose bei Nagetieren mit einer bis zu Wochen reichenden Dauer beim Menschen äquivalent sei (Clancy et al. 2001, Clancy et al. 2007). In einem gewissen Maße lassen sich durch Ergebnisse anderer Studien diese Vorbehalte abschwächen. So konnte gezeigt werden, dass bereits eine einmalige Exposition mit Ketamin und / oder Midazolam in subklinischen Dosen während der Synaptogenese eine zwei- bis vierfache Erhöhung der Apoptoserate bei Mäuseuronen zur Folge hatte (Young et al. 2005). Die in einer Reihe von in-vitro-Untersuchungen bestätigte Erkenntnis, dass unabhängig von der zellulären Apoptoseinduktion bereits eine Beeinflussung der Entwicklung neuronaler Netzwerke durch die Störung des dendritischen Wachstums beobachtet werden konnte, lässt den Einfluss anästhetischer Stoffe auf das ZNS erkennen (Vutskits et al. 2005, 2006). Beträchtliche Unterschiede in den für eine Narkoseeinleitung erforderlichen Dosen bei verschiedenen Spezies verdeutlichen zudem die Komplexität der Untersuchungen zu Anästhetika-induzierter Neurotoxizität während der Phase des rapiden Gehirnwachstums. Indirekte Vergleiche von Blutplasmakonzentrationen und Effekten von Ketamin zwischen Mäusen und humanen Neugeborenen lassen auf die Notwendigkeit einer deutlich höheren Dosierung von Anästhetika bei Nagetieren schließen (Young et al. 2005, Weber et al. 2004) und machen damit die Grenzen einer unbedenklichen Anästhetika-Maximaldosis weiterhin schwer kalkulierbar.

## 4.5 Ausblick

In der Vergangenheit zeigten Untersuchungen, dass im Vergleich zu anderen pädiatrischen Altersklassen bei Neugeborenen eine 10-fach erhöhte perioperative Morbidität und Mortalität besteht (Cohen et al. 1990). Jedes Jahr wird eine große Anzahl an Früh- und Neugeborenen im Rahmen von chirurgischen Eingriffen und bildgebenden Verfahren anästhesiert (Loepke und Soriano 2008). Nicht zuletzt aus diesen Hintergründen lässt sich die Brisanz der vielfach auch kontrovers diskutierten Anästhetika-induzierten Neurotoxizität ableiten. Basierend auf den neueren Erkenntnissen über die entwicklungspezifische Rolle der Neurotransmitter GABA und Glutamat für die Entwicklung und Differenzierung neuronaler Netzwerke besteht kein Zweifel über die Wichtigkeit experimenteller und klinischer Forschung in diesem Gebiet. Vielfältige Studien beweisen die Notwendigkeit von Anästhetika- und Analgetikagaben bei Früh- und Neugeborenen in der perioperativen Phase (Anand 1993, Ruda et al. 2000, Bouwmeester et al. 2001). Somit erscheint es ratsam, dass die klinische Praxis der Anwendung von Anästhetika bei Früh- und Neugeborenen derzeit nicht verändert werden sollte, bis weiterführende klinische Untersuchungen diesbezüglich vorliegen. Eine Weiterführung der Forschung auf diesem Gebiet sollte vorangetrieben werden, um die zugrunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen neurodegenerativer Vorgänge besser verstehen zu können und um zu überprüfen, ob die perinatale Exposition mit anästhetischen Substanzen tatsächlich zu Störungen der neuronalen Entwicklung beim Menschen führt.

## 5 Zusammenfassung

Die Verbindung zwischen der Notwendigkeit von Anästhesien bei Früh- und Neugeborenen und dem in neonatalen Tierexperimenten festgestellten neurodegenerativen Potential einzelner Anästhetika bietet Anlass zur eingehenden Untersuchung der ursächlichen Zusammenhänge. Auch wenn Propofol und Sevofluran aus klinischer Sicht als sichere Medikamente eingeschätzt werden, so ist der Erkenntnisprozess bezüglich neurodegenerativer Effekte von Anästhetika noch nicht abgeschlossen. Deshalb war das Ziel dieser Arbeit die Untersuchung Propofol- und Sevofluran-bedingter Effekte auf primäre embryonale Neuronenkulturen der Ratte hinsichtlich eines möglichen Einflusses auf die Zellviabilität. Des Weiteren sollte der Einfluss von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA)-Antagonisten auf diese Effekte überprüft und eine potentielle Anästhetika-bedingte Zellschädigung mithilfe eines *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) zum Nachweis der Fragmentierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) sowie durch Inhibitoren der apoptotischen / antiapoptischen Signaltransduktion spezifiziert werden.

Am 18. Embryonaltag (E18) wurden primäre kortikale Neuronen aus Wistar-Ratten gewonnen und kultiviert. Zur Testung möglicher Substanzeffekte wurden die Zellen einer Exposition mit Propofol in den Konzentrationen 0,01 mg/ml, 0,1 mg/ml und 1 mg/ml bzw. über eine Modular Incubator Chamber mit Sevofluran in den Konzentrationen 4 Volumen-Prozent (Vol%) und 8 Vol% für 3, 6, 9, 12, 24, 48 Stunden ausgesetzt. Die Zellviabilität wurde mithilfe des *methyl thiazol tetrazolium* (MTT) Tests bestimmt und mit Werten der Kontrollgruppe verglichen. Die anschließenden Versuchsreihen wurden unter Verwendung von Propofol und Sevofluran in den Konzentrationen 1 mg/ml bzw. 8 Vol% durchgeführt. Um im Rahmen der Wirkungsentfaltung der Anästhetika eine mögliche Rolle von GABA-Rezeptoren zu evaluieren, wurden unbehandelte Neuronen mit den GABA-Rezeptor-Antagonisten Gabazine und Picrotoxin prä- und anschließend mit dem jeweils zu untersuchenden Anästhetikum koinkubiert. Die mit der MTT-Methode ermittelte Zellebensfähigkeit wurde mit der von Zellen nach alleiniger Anästhetika-Exposition verglichen. Mittels eines ELISAs wurde eine Anästhetika-bedingte Fragmentierung der neuronalen DNA überprüft und zwischen einem apoptotischen und nekrotischen Degenerationsvorgang

unterschieden. Die Untersuchung des vorherrschenden Signaltransduktionsweges erfolgte unter Prä- und Koinkubation mit dem jeweiligen Anästhetikum und spezifischen Inhibitoren der Caspasen (zVAD-FMK), der mitogenaktivierten Protein-Kinase-Kinasen (MEK1/2) sowie der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) in den Konzentrationen 0,4 mM (zVAD-FMK) und 0,1 mM (MEK1/2 und PI3K).

Eine Konzentration von 0,1 mg/ml Propofol zeigte ab 48 Stunden einen signifikanten Rückgang der Viabilitätswerte. Bei der höchsten Propofolkonzentration von 1 mg/ml war eine signifikante Steigerung der Überlebensrate neuronaler Zellen nach drei und sechs Stunden Expositionsdauer nachzuweisen, wohingegen die ermittelten Viabilitätswerte ab 12 Stunden Propofolexposition signifikant erniedrigt waren. Bei der Inkubation mit Sevofluran in der Konzentration von 4 Vol% zeigte sich ein signifikanter Abfall der Zellviabilitätswerte nach 12 Stunden, der bei 8 Vol% Sevofluran bereits ab 6 Stunden eintrat. Unter Verwendung der GABA-Rezeptor-Antagonisten zeigte sich eine Aufhebung der Propofol-bedingten neuroprotektiven Wirkung, während die sowohl durch Propofol als auch durch Sevofluran ausgelöste Neurodegeneration nicht beeinflusst wurde. Die Evaluation der Art des vorherrschenden Degenerationsvorganges unter Anwendung eines DNA-Fragmentierungs-ELISAs ließ auf eine signifikante Propofol-bedingte Erhöhung der Apoptose- und Nekroserate sowie eine nur tendenziell erkennbare Nekrosesteigerung durch Sevofluran schließen, wohingegen bei den verwendeten Caspase- und Proteinkinase-Inhibitoren keine signifikante Zellviabilitätsänderung nachgewiesen werden konnte.

Somit konnten in der vorliegenden Arbeit konzentrations- und expositionszeitabhängige Effekte der beiden untersuchten Anästhetika Propofol und Sevofluran auf das sich entwickelnde Gehirn bei Ratten nachgewiesen werden. Aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse und der breiten Verwendung dieser Anästhetika in der pädiatrischen Anästhesiologie sind weitere Untersuchungen zur Spezifizierung neurodegenerativer Effekte erforderlich, um durch eine Erweiterung des Verständnisses der Wirkmechanismen die Entwicklung maximal sicherer anästhesiologischer Behandlungsprotokolle gewährleisten zu können.

## 6 Literaturverzeichnis

- Akaike A, Tamura Y, Sato Y, Yokota T (1993) Protective effects of a vitamin B12 analog, methylcobalamin, against glutamate cytotoxicity in cultured cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 241(1):1-6.
- Anand KJ, Aynsley-Green A (1988) Measuring the severity of surgical stress in newborn infants. *J Pediatr Surg* 23(4):297-305.
- Anand KJ, Coskun V, Thrivikraman KV, Nemeroff CB, Plotsky PM (1999) Long-term behavioral effects of repetitive pain in neonatal rat pups. *Physiol Behav* 66(4):627-37.
- Anand KJ, Hickey PR (1987) Pain and its effects in the human neonate and fetus. *N Engl J Med* 317(21):1321-9.
- Anand KJ, Sippel WG, Aynsley-Green A (1987) Randomised trial of fentanyl anaesthesia in preterm babies undergoing surgery: effects on the stress response. *Lancet* 1(8524):62-6.
- Anand KJ, Soriano SG (2004) Anesthetic agents and the immature brain: are these toxic or therapeutic? *Anesthesiology* 101(2):527-30.
- Anand KJ (1993) Relationships between stress responses and clinical outcome in newborns, infants, and children. *Crit Care Med* 21(9 Suppl):S358-9.
- Arden N, Betenbaugh MJ (2004) Life and death in mammalian cell culture: strategies for apoptotic inhibition. *Trends Biotechnol* 22(4):174-80.
- Arden N, Betenbaugh MJ (2006) Regulating apoptosis in mammalian cell cultures. *Cytotechnology* 50(1-3):77-92.

- Barbry T, Le Guen M, De Castro V, Coriat P, Riou B, Vivien B (2007) Minimum alveolar concentration of halogenated volatile anaesthetics in left ventricular hypertrophy and congestive heart failure in rats. *Br J Anaesth* 99(6):787-93.
- Behrens CJ, van den Boom LP, Heinemann U (2007) Effects of the GABA(A) receptor antagonists bicuculline and gabazine on stimulus-induced sharp wave-ripple complexes in adult rat hippocampus in vitro. *Eur J Neurosci* 25(7):2170-81.
- Ben-Ari Y (2002) Excitatory actions of GABA during development: the nature of the nurture. *Nat Rev Neurosci* 3(9):728-39.
- Berde C, Cairns B (2000) Developmental pharmacology across species: promise and problems. *Anesth Analg* 91(1):1-5.
- Berns M, Toennesen M, Koehne P, Altmann R, Obladen M (2009) Ibuprofen augments bilirubin toxicity in rat cortical neuronal culture. *Pediatr Res*. 65(4):392-6.
- Bhutta AT, Anand KJ (2002) Vulnerability of the developing brain. Neuronal mechanisms. *Clin Perinatol* 29(3):357-72.
- Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajalu S, Dzierko M, Pesditschek S, Mai I, Dikranian K, Olney JW, Ikonomidou C (2002) Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(23):15089-94.
- Bittigau P, Sifringer M, Ikonomidou C (2003) Antiepileptic drugs and apoptosis in the developing brain. *Ann N Y Acad Sci* 993:103-14; discussion 123-4.
- Björnström K, Sjölander A, Schippert A, Eintrei C (2002) A tyrosine kinase regulates propofol-induced modulation of the  $\beta$ -subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor and release of intracellular calcium in cortical rat neurons. *Acta Physiol Scand* 175(3):227-35.
- Borner C, Monney L (1999) Apoptosis without caspases: an inefficient molecular guillotine? *Cell Death Differ* 6(6):497-507.

- Bouwmeester NJ, Anand KJ, van Dijk M, Hop WC, Boomsma F, Tibboel D (2001) Hormonal and metabolic stress responses after major surgery in children aged 0-3 years: a double-blind, randomized trial comparing the effects of continuous versus intermittent morphine. *Br J Anaesth* 87(3):390-9.
- Bredesen DE (2000) Apoptosis: overview and signal transduction pathways. *J Neurotrauma* 17(10):801-10.
- Brewer GJ (1995) Serum-free B27/neurobasal medium supports differentiated growth of neurons from the striatum, substantia nigra, septum, cerebral cortex, cerebellum, and dentate gyrus. *J Neurosci Res* 42(5):674-83.
- Buckley S, Driscoll B, Barsky L, Weinberg K, Anderson K, Warburton D (1999) ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *Am J Physiol* 227(1 Pt 1):L159-66.
- Bundgaard H, von Oettingen G, Larsen KM, Landsfeldt U, Jensen KA, Nielsen E, Cold GE (1998) Effects of sevoflurane on intracranial pressure, cerebral blood flow and cerebral metabolism. A dose-response study in patients subjected to craniotomy for cerebral tumours. *Acta Anaesthesiol Scand* 42(6):621-7.
- Campagna JA, Miller KW, Forman SA (2003) Mechanisms of actions of inhaled anesthetics. *N Engl J Med* 348(21):2110-24.
- Carpenter RL, Eger EI 2<sup>nd</sup>, Johnson BH, Unadkat JD, Sheiner LB (1986) Pharmacokinetics of inhaled anesthetics in humans: measurements during and after the simultaneous administration of enflurane, halothane, isoflurane, methoxyflurane, and nitrous oxide. *Anesth Analg* 65(6):575-82.
- Cattano D, Young C, Straiko MM, Olney JW (2008) Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg* 106(6):1712-4.

- Chalmers-Redman RM, Fraser AD, Ju WY, Wadia J, Tatton NA, Tatton WG (1997) Mechanisms of nerve cell death: apoptosis or necrosis after cerebral ischaemia. *Int Rev Neurobiol* 40:1-25.
- Chen L, Durkin KA, Casida JE (2006) Structural model for gamma-aminobutyric acid receptor noncompetitive antagonist binding: widely diverse structures fit the same site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(13):5185-90.
- Chen M, Wang J (2002) Initiator caspases in apoptosis signaling pathways. *Apoptosis* 7(4):313-9.
- Chen RM, Wu CH, Chang HC, Wu GJ, Lin YL, Sheu JR, Chen TL (2003) Propofol suppresses macrophage functions and modulates mitochondrial membrane potential and cellular adenosine triphosphate synthesis. *Anesthesiology* 98(5):1178-85.
- Clancy B, Darlington RB, Finlay BL (2001) Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105(1):7-17.
- Clancy B, Finlay BL, Darlington RB, Anand KJ (2007) Extrapolating brain development from experimental species to humans. *Neurotoxicology* 28(5):931-7.
- Cohen MM, Cameron CB, Duncan PG (1990) Pediatric anesthesia morbidity and mortality in the perioperative period. *Anesth Analg* 70(2):160-7.
- Conreux F, Best O, Preckel MP, Lhopitault C, Beydon L, Pouplard F, Granry JC (2001) [Electroencephalographic effects of sevoflurane in pediatric anesthesia: a prospective study of 20 cases]. *Ann Fr Anesth Reanim* 20(5):438-45.
- Conzen P, Nuscheler M (1996) [New inhalation anesthetics]. *Anaesthesist* 45(8):674-93
- Davidson A, Soriano S (2004) Does anaesthesia harm the developing brain-evidence or speculation? *Paediatr Anaesth* 14(3):199-200.

- De Hert SG, ten Broecke PW, Mertens E, Van Sommeren EW, De Blier IG, Stockmann BA, Rodrigus IE (2002) Sevoflurane but not propofol preserves myocardial function in coronary surgery patients. *Anesthesiology* 97(1):42-9.
- Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22(52):8543-67.
- Dilger JP (2002) The effects of general anesthesia on ligand-gated ion channels. *Br J Anaesth* 89(1):41-51.
- Dobbing J, Sands J (1979) Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3(1):79-83.
- Dobbing J, Sands J (1973) Quantitative growth and development of human brain. *Arch Dis Child* 48(10):757-67.
- Duncia JV, Santella JB 3rd, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Fietze WE, Rankin FW, Sun JH, Earl RA, Tabaka AC, Teleha CA, Blom KF, Favata MF, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Horiuchi K, Copeland RA, Scherle PA, Trzaskos JM, Magolda RL, Trainor GL, Wexler RR, Hobbs FW, Olson RE (1998) MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett* 8(20):2839-44.
- Dupont JL, Crepel F, Delhay-Bouchaud N (1976) Influence of bicuculline and picrotoxin on reversal properties of excitatory synaptic potentials in cerebellar Purkinje cells of the rat. *Brain Res* 173(3):577-80.
- Engdahl O, Abrahams M et, Bjornsson A, Vegfors M, Norlander B, Ahlner J, Eintrei C (1998) Cerebrospinal fluid concentrations of propofol during anaesthesia in humans. *Br J Anaesth* 81(6):957-9.

Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273(29):18623-32.

Franks NP, Dickinson R, deSousa SLM, Hall AC, Lieb WR (1998) How does Xenon produce anaesthesia? *Nature* 396:324.

Franks NP, Lieb WR (1994) Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367:607-614.

Fredriksson A, Ponten E, Gordh T, Eriksson P (2007) 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* 107(3):427-36.

Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA (1998) Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem* 273(49):32608-13

Gardoni F, Di Luca M (2006) New targets for pharmacological intervention in the glutamatergic synapse. *Eur J Pharmacol* 545(1):2-10.

Gascon E, Klauser P, Kiss JZ, Vutskits L (2007) Potentially toxic effects of anaesthetics on the developing central nervous system. *Eur J Anaesthesiol* 24(3):213-24.

Gelb AW, Bayona NA, Wilson JX, Cechetto DF (2002). Propofol anesthesia compared to awake reduces infarct size in rats. *Anesthesiology* 96(5):1183-90.

Gerstner B, Sifringer M, Dzierko M, Schuller A, Lee J, Simons S, Obladen M, Volpe JJ, Rosenberg PA, Felderhoff-Mueser U (2007) Estradiol attenuates hyperoxia-induced cell death in the developing white matter. *Ann Neurol* 61(6):562-73.

- Glen JB (1980) Animal studies of the anaesthetic activity of ICI 35 868. *Br J Anaesth* 52(8): 731-42.
- Grasshoff C, Antkowiak B (2004) Propofol and sevoflurane depress spinal neurons in vitro via different molecular targets. *Anesthesiology* 101(5):1167-76.
- Hapfelmeier G, Schneck H, Kochs E (2001) Sevoflurane potentiates and blocks GABA-induced currents through recombinant alpha1beta2gamma2 GABAA receptors: implications for an enhanced GABAergic transmission. *Eur J Anaesthesiol* 18(6):377-83.
- Head BP, Patel P (2007) Anesthetics and brain protection. *Curr Opin Anaesthesiol* 20(5):395-9.
- Helling K, Scherer H (2005) [Vertigo attacks -- current therapy]. *Laryngorhinootologie* 84(11):838-40.
- Hemmings HC Jr., Adamo AI (1994) Effects of halothane and propofol on purified brain protein kinase C activation. *Anesthesiology* 81(1):147-55.
- Herlenius E, Lagercrantz H (2004) Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Exp Neurol* 190 Suppl 1:S8-21.
- Himmelseher S, Durieux ME (2005) Revising a dogma: ketamine for patients with neurological injury? *Anesth Analg* 101(2):524-34, table of contents.
- Hirai K, Hayashi T, Chan PH, Zeng J, Yang GY, Basus VJ, James TL, Litt L (2004) PI3K inhibition in neonatal rat brain slices during and after hypoxia reduces phospho-Akt and increases cytosolic cytochrome c and apoptosis. *Brain Res Mol Brain Res* 124(1):51-61.
- Ho KY, Chua WL, Lim SS, Ng AS (2004) A comparison between single- and double breath vital capacity inhalation induction with 8% sevoflurane in children. *Paediatr Anaesth* 14(6):457-61.

- Hobbhahn J, Funk W (1996) [Sevoflurane in pediatric anesthesia]. *Anaesthesist* 45 Suppl 1:S22-7.
- Hobbs AJ, Bush GJ, Downham DY (1988) Peri-operative dreaming and awareness in children. *Anaesthesia* 43(7):560-2.
- Holdenrieder S, Stief J, Bergner A, Gamarra F, Mitlewski A, Nagel D, Huber RM, Stieber P (2004) Nucleosomes indicate the in vitro radiosensitivity of irradiated bronchoepithelial and lung cancer cells. *Tumour Biol* 25(5-6):321-6.
- Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, Shimohama S (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res* 60(3):321-7.
- Honegger P, Matthieu JM (1996) Selective toxicity of the general anesthetic propofol for GABAergic neurons in rat brain cell cultures. *J Neurosci Res* 45(5):631-6.
- Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovská V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2000) Ethanol induced apoptic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287:1056-1060.
- Ikonomidou C, Bittigau P, Koch C, Genz K, Hoerster F, Felderhoff-Mueser U, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2001) Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 62(4):401-5.
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovská V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283:70-74.
- Jensen AG, Lindroth M, Sjolander A, Eintrei C (1994) Propofol induces changes in the cytosolic free calcium concentration and the cytoskeletal organization of cultured human glial cells and primary embryonic rat brain cells. *Anesthesiology* 81(5):1220-9.

- Jevtovic-Todorovic V, Benshoff N, Olney JW (2000) Ketamine potentiates cerebrocortical damage induced by the common anaesthetic agent nitrous oxide in adult rats. *Br J Pharmacol* 130(7):1692-8.
- Jevtovic-Todorovic V, Hartman RE, Izumi Y, Benshoff ND, Dikranian K, Zorumski CF, Olney JW, Wozniak DF (2003). Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 23(3): 876-82.
- Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM, Mennerick S, Powell S, Dikranian K, Benshoff N, Zorumski CF, Olney JW (1998) Nitrous oxide (laughing gas) is an NMDA antagonist, neuroprotectant, and neurotoxin. *Nat Med* 4:460-463.
- Johnston GA (1996) GABA<sub>A</sub> receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci* 17(9):319-23.
- Julier K, da Silva R, Garcia C, Bestmann L, Frascarolo P, Zollinger A, Chassot PG, Schmid ER, Turina MI, von Segesser LK, Pasch T, Spahn DR, Zaugg M (2003) Preconditioning by sevoflurane decreases biochemical markers for myocardial and renal dysfunction in coronary artery bypass graft surgery: a double-blinded, placebo-controlled, multicenter study. *Anesthesiology* 98(6):1315-27.
- Kain ZN, Caldwell-Andrews AA, Maranets I, McClain B, Gall D, Mayes LC, Feng R, Zhang H (2004) Preoperative anxiety and emergence delirium and postoperative maladaptive behavior. *Anesth Analg* 99(6):1648-54, table of contents.
- Kawaguchi M, Furuya H, Patel PM (2005). Neuroprotective effects of anesthetic agents. *J Anesth* 19(2):150-6.
- Keaney A, Diviney D, Harte S, Lyons B (2004) Postoperative behavioral changes following anesthesia with sevoflurane. *Pediatr Anaesth* 14(10):866-70.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26(4):239-57.

- Khazipov R, Khalilov I, Tyzio R, Morozova E, Ben-Ari Y, Holmes GL (2004) Developmental changes in GABAergic actions and seizure susceptibility in the rat hippocampus. *Eur J Neurosci* 19(3):590-600.
- Kuan CJ, Roth KA, Flavell RA, Rakic P (2000) Mechanisms of programmed cell death in the developing brain. *Trends Neurosci* 23(7):291-7.
- Kudoh A, Matsuki A (2000) Sevofluran stimulates inositol 1,4,5-trisphosphate in skeletal muscle. *Anaesth Analg* 91(2):440-5.
- Langley MS, Heel RC (1988) Propofol. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and use as an intravenous anaesthetic. *Drugs* 35(4):334-72.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH (2005) Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 115(10):2665-72.
- Lipton SA, Gu Z, Nakamura T (2007) Inflammatory mediators leading to protein misfolding and uncompetitive/fast off-rate drug therapy for neurodegenerative disorders. *Int Rev Neurobiol* 82:1-27.
- Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C Francis D, Freedman A, Sharma S, Pearson D, Plotsky PM, Meaney MJ (1997) Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science* 277(5332):1659:62.
- Lodge D, Anis NA (1982) Effects of phencyclidine on excitatory amino acid activation of spinal interneurons in the cat. *Eur J Pharmacol* 77:203-204.
- Loepke AW, Soriano SG (2008) An assessment of the effects of general anesthetics on developing brain structure and neurocognitive function. *Anesth Analg* 106(6):1681-707.

- Lundholt BK, Scudder KM, Pagliaro L (2003) A simple technique for reducing edge effect in cell-based assays. *J Biomol Screen* 8(5):566-70.
- Ma D, Williamson P, Januszewski A, Nogaro MC, Hossain M, Ong LP, Shu Y, Franks NP, Maze M (2007) Xenon mitigates isoflurane-induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain. *Anesthesiology* 106(4):746-53.
- Mellon RD, Simone AF, Rappaport BA (2007) Use of anesthetic agents in neonates and young children. *Anesth Analg* 104(3):509-20.
- Mennerick S, Jevtovic-Todorovic V, Todorovic SM, Shen W, Olney JW, Zorumski CF (1998) Effect of nitrous oxide on excitatory and inhibitory synaptic transmission in hippocampal cultures. *J Neurosci* 18:9716-26.
- Miles R (1999) Neurobiology. A homeostatic switch. *Nature* 397(6716):215-6.
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63
- Motsch J, Roggenbach J (2004) Propofol-Infusionssyndrom. *Anaesthesist* 53:1009-24.
- Olney JW, Farber NB, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V; Ikonomidou (2000a) Environmental agents that have the potential to trigger massive apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Environ Health Perspect* 108 Suppl 3:383-8.
- Olney JW, Ishimaru MJ, Bittigau P, Ikonomidou C (2000b) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Apoptosis* 5(6):515-21.
- Olney JW, Sharpe LG, Feigin RD (1972) Glutamate-induced brain damage in infant primates. *J Neuropathol Exp Neurol* 31(3):464-88.

- Olney JW, Tenkova T, Dikranian K, Muglia LJ, Jermakowicz WJ, D'Sa C, Roth KA (2002) Ethanol-induced caspase-3 activation in the in vivo developing mouse brain. *Neurobiol Dis* 9(2):205-19.
- Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V; Farber NB, Bittigau P, Ikonomidou (2002) Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol* 12(4):488-98.
- Olney JW, Young C, Wozniak DF, Ikonomidou C, Jevtovic-Todorovic V (2004) Anesthesia-induced developmental neuroapoptosis. Does it happen in humans? *Anesthesiology* 101(2):273-5.
- Orliaguet G, Vivien B, Langeron O, Bouhemad B, Coriat P, Riou B (2001) Minimum alveolar concentration of volatile anesthetics in rats during postnatal maturation. *Anesthesiology* 95(3):734-9.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002a) Delevopmental neurotransmitters? *Neuron* 36(6):989-91.
- Owens DF, Kriegstein AR (2002b) Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 3(9):715-27.
- Patapoutian A, Reichhardt LF (2001) Trk receptors: mediators of neurotrophin action. *Curr Opin Neurobiol* 11(3):272-80.
- Represa A, Ben-Ari Y (2005) Trophic actions of GABA on neuronal development. *Trends Neurosci* 28(6):278-83.
- Rizzi S, Carter LB, Ori C, Jevtovic-Todorovic V (2008) Clinical anesthesia causes permanent damage to the fetal guinea pig brain. *Brain Pathol* 18(2):198-210.
- Rosenberg H, Davis M, James D, Pollock N, Stowell K (2007) Malignant hyperthermia. *Orphanet J Rare Dis* 2:21.

- Rosser AE, Tyers P, Borg M, Dunnett SB, Svendsen CN (1997) Co-expression of MAP 2 and GFAP in cells developing from rat EGF responsive precursor cells. *Brain Res Dev Brain Res* 98(2):291-95.
- Ruda MA, Ling QD, Hohmann AG, Peng YB, Tachibana T (2000) Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation. *Science* 289(5479):628-31.
- Rudolph U, Antkowiak B (2004) Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. *Nat Rev Neurosci* 5(9):709-20.
- Slater SJ, Cox KJ, Lombardi JV, Ho C, Kelly MB, Rubin E, Stubbs CD (1993) Inhibition of protein kinase C by alcohols and anaesthetics. *Nature* 364(6432):82-4.
- Slikker W Jr., Zou X, Hotchkiss CE, Divine RL, Sadovova N, Twaddle NC, Doerge DR, Scallet AC, Patterson TA, Hanig JP, Paule MG, Wang C (2007) Ketamine-induced neuronal cell death in the perinatal rhesus monkey. *Toxicol Sci* 98(1):145-58.
- Soriano SG, Anand KJ, Rovnaghi CR, Hickey PR (2005) Of mice and men: should we extrapolate rodent experimental data to the care of human neonates? *Anesthesiology* 102(4):866-8; author reply 868-9.
- Spahr-Schopfer I, Vutskits L, Toni N, Buchs PA, Parisi L, Muller D (2000) Differential neurotoxic effects of propofol on dissociated cortical cells and organotypic hippocampal cultures. *Anesthesiology* 92(5):1408-17.
- Stargatt R, Davidson AJ, Huang GH, Czarnecki C, Gibson MA, Stewart SA, Jansen K (2006) A cohort study of the incidence and risk factors for negative behavior changes in children after general anesthesia. *Pediatr Anaesth* 16(8):846-59.
- Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B, McKay R (2000) Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 20(19):7377-83.

- TerRiet MF, DeSouza GJ, Jacobs JS Young D, Lewis MC, Herrington C, Gold MI (2000) Which is most pungent: isoflurane, sevoflurane or desflurane? *Br J Anaesth* 85(2):305-7.
- Todd MM (2004) Anesthetic neurotoxicity: the collision between laboratory neuroscience and clinical medicine. *Anesthesiology* 101(2):272-3.
- Toller WG, Kersten JR, Pagel PS, Hettrick DA, Warltier DC (1999) Sevoflurane reduces myocardial infarct size and decreases the time threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Anesthesiology* 91(5):1437-46.
- Toner CC, Connelly K, Whelpton R, Bains S, Michael-Titus AT, McLaughlin DP, Stamford JA (2001) Effects of sevoflurane on dopamine, glutamate and aspartate release in an in vitro model of cerebral ischaemia. *Br J Anaesth* 86(4):550-4.
- Ueno S, Bracamontes J, Zorumski C, Weiss DS, Steinbach JH (1997) Bicuculline and gabazine are allosteric inhibitors of channel opening of the GABAA receptor. *J Neurosci* 17(2):625-34.
- Vakkuri A, Yli-Hankala A, Sarkela M, Lindgren L, Mennander S, Korttila K, Saarnivaara L, Jantti V (2001) Sevoflurane mask induction of anaesthesia is associated with epileptiform EEG in children. *Acta Anaesthesiol Scand* 45(7):805-11.
- Van Gruchten S, Van Den Broeck W (2002) Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31(4):214-31.
- Van Lingen RA, Simons SH, Anderson BJ, Tibboel D (2002) The effects of analgesia in the vulnerable infant during the perinatal period. *Clin Perinatol* 29(3):511-34.
- Vasile B, Rasulo F, Candiani A, Latronico N (2003) The pathophysiology of propofol infusion syndrome: a simple name for a complex syndrome. *Intensive Care Med* 29(9):1417-25.

- Vento M, Asensi M, Sastre J, Garcia-Sala F, Pallardo FV, Vina J (2001) Resuscitation with room air instead of 100% oxygen prevents oxidative stress in moderately asphyxiated term neonates. *Pediatrics* 107(4):642-7.
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269(7):5241-8.
- Vutskits L, Gascon E, Tassonyi E, Kiss JZ (2005) Clinically relevant concentrations of propofol but not midazolam alter in vitro dendritic development of isolated gamma-aminobutyric acid-positive interneurons. *Anesthesiology* 102(5):970-6.
- Vutskits L, Gascon E, Tassonyi E, Kiss JZ (2006) Effect of ketamine on dendritic arbour development and survival of immature GABAergic neurons in vitro. *Toxicol Sci* 91(2):540-9.
- Waters KA, Machaalani R (2004) NMDA receptors in the developing brain and effects of noxious insults. *Neurosignals* 13(4):162-74.
- Weber F, Wulf H, Gruber M, Biallas R (2004) S-ketamine and s-norketamine plasma concentrations after nasal and i.v. administration in anesthetized children. *Paediatr Anaesth* 14(12):983-8.
- Werner C, Mollenberg O, Kochs E, Schulte J am Esch (1995) Sevoflurane improves neurological outcome after incomplete cerebral ischaemia in rats. *Br J Anaesth* 75(6):756-60.
- Wise-Faberowski L, Zhang H, Ing R, Pearlstein RD, Warner DS (2005) Isoflurane induced neuronal degeneration: an evaluation in organotypic hippocampal slice cultures. *Anesth Analg* 101(3):651-7, table of contents.

- Wong JK, Le HH, Zsarnovszky A, Belcher SM (2003) Estrogens and ICI182,780 (Faslodex) modulate mitosis and cell death in immature cerebellar neurons via rapid activation of p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *J Neurosci* 23(12):4984-95.
- Wyllie AH, Kerr JF, Currie AF (1980) Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 68:251-306.
- Yamakura T, Bertaccini E, Trudell JR, Harris RA (2001) Anesthetics and ion channels: molecular models and sites of action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:23-51.
- Yao R, Cooper GM (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* 267(5206):2003-6.
- Yeung JY, Canning KJ, Zhu G, Pennefather P, MacDonald JF, Orser BA (2003) Tonically activated GABA<sub>A</sub> receptors in hippocampal neurons are high-affinity, low-conductance sensors for extracellular GABA. *Mol Pharmacol* 63(1):2-8.
- Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V (2005) Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 135(3):815-27.
- Yoon KW, Covey DF, Rothman SM (1993) Multiple mechanisms of picrotoxin block of GABA-induced currents in rat hippocampal neurons. *J Physiol* 464:423-39.
- Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, Tenkova T, Wang H, Labruyere J, Olney JW (2005) Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol* 146(2):189-97.
- Young Y, Menon DK, Tisavipat N, Matta BF, Jones JG (1997). Propofol neuroprotection in a rat model of ischaemia reperfusion injury. *Eur J Anaesthesiol* 14(3):320-6.

Zhang X, Shan P, Sasidhar M, Chupp GL, Flavell RA, Choi AM, Lee PJ (2003)  
Reactive oxygen species and extracellular signal-regulated kinase 1/2 mitogen  
activated protein kinase mediate hyperoxia-induced cell death in lung epithelium.  
*Am J Respir Cell Mol Biol* 28(3):305-15.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

%	<b>Prozent</b>
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
<b>Abb.</b>	<b>Abbildung</b>
ANOVA	<i>ANalysis Of VAriance</i>
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	AdenosinTriPhosphat
<b>B27</b>	<b>B27-Supplement</b>
bzw.	beziehungsweise
<b>ca.</b>	<b>circa</b>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
<b>DIV</b>	<b><i>Days In Vitro</i></b>
DNA	<i>DesoxyriboNucleine Acid</i> / Desoxyribonukleinsäure
D-PBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
<b>E</b>	<b>Embryonaltag</b>
EDTA	<i>EthyleneDiamineTetraacetic Acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ERK	Extrazellulär Regulierte Kinase
etc.	et cetera
<b>GABA</b>	<b><i>Gamma-Amino Butyric Acid</i> / γ-Aminobuttersäure</b>
GABA <sub>A/C</sub>	ionotrope GABA-Rezeptoren A bzw. C

GABA-RA	GABA-Rezeptor-Antagonist(en)
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
<b>HCl</b>	<b>Salzsäure</b>
h	Stunde
<b>K<sup>+</sup></b>	<b>Kalium-Ion</b>
KCC2	K <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> Kotransporter
KG	KörperGewicht
kg	Kilogramm
<b>l</b>	<b>Liter</b>
L-Glut.	L-Glutamin
LDH	LactatDeHydrogenase
ly294002	2-(4-Morpholinyl)-8-Phenyl-1(4H)-Benzopyran-4-onhydrochlorid
<b>MAC</b>	<b><i>Minimum Alveolar Concentration</i></b>
MAPK	MitogenAktivierte Protein-Kinase
MAP3K	MAPK-Kinase-Kinase
MEK	Mitogenaktivierte Protein-Kinase-Kinase
MIC	<i>Modular Incubator Chamber</i>
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid / <i>Methyl Thiazol Tetrazolium</i>
<b>N<sub>2</sub>O</b>	<b>Lachgas</b>
NADH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NBM	NeuroBasal™ Medium + B27 [2 %] + L-Glut. [1 %] + P/S [1 %]
NF	NeuroFilament
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat / <i>N-Methyl-D-aspartic Acid</i>

<b>P/S</b>	<b>Penicillin/Streptomycin</b>
PI3K	PhosphoInositid-3-Kinase
PIP2	PhosphatidylInositol-4,5-biPhosphat
PIP3	PhosphatidylInositol-3,4,5-triPhosphat
<b>Ras</b>	<b>Rat sarcoma</b>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	RaumTemperatur
<b>SDS</b>	<b><i>Sodium Dodecyl Sulfate</i></b>
SEM	<i>Standard Error of the Mean / Standardfehler des Mittelwertes</i>
sog.	sogenannte(r)
<b>TNF</b>	<b>TumorNekroseFaktor</b>
Trk	Tyrosinkinase
<b>u. a.</b>	<b>unter anderem</b>
U0126	1,4-Diamino-2,3-Dicyano-1,4-bis[2-Aminophenylthio]Butadien
<b>Vol%</b>	<b>Volumen-Prozent</b>
<b>z. B.</b>	<b>zum Beispiel</b>
ZNS	Zentrales NervenSystem
zVAD-FMK	Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-FluoroMethylKeton

## 8 Abbildungsverzeichnis

### Strukturformeln:

Abb. 2: Propofol.....	5
Abb. 3: Sevofluran.....	6
Abb. 5: Reduktionsschritt von MTT zu Formazan.....	20

### Fotografien:

Abb. 4: Ausschnitt aus Zellkulturplatten-Well mit adhärenenten Neuronen.....	19
Abb. 6: Modular Incubator Chamber für Sevofluran-Versuche.....	21
Abb. 8: Neuronen nach Propofol-Exposition und unbehandelte Kontrollzellen.....	28
Abb. 10: Neuronen nach Sevofluran-Exposition und unbehandelte Kontrollzellen.....	30

### Diagramme:

Abb. 1: „Phase des rapiden Gehirnwachstums“.....	4
Abb. 7: Propofol [0,01 mg/ml] [0,1 mg/ml] [1 mg/ml].....	26
Abb. 9: Sevofluran [4 Vol%] [8 Vol%].....	29
Abb. 11: Propofol [1 mg/ml] + GABA-RA.....	32
Abb. 12: Sevofluran [8 Vol%] + GABA-RA.....	33
Abb. 13: Propofol [1 mg/ml] Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> .....	34
Abb. 14: Sevofluran [8 Vol%] Cell Death Detection ELISA <sup>PLUS</sup> .....	35
Abb. 15: Propofol [1 mg/ml] + zVAD-FMK / U0126 / Iy294002.....	36
Abb. 16: Sevofluran [8 Vol%] + zVAD-FMK / U0126 / Iy294002.....	37

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Berns M\*, Seeberg L\*, Schmidt M, Kerner T (2009) High dose of propofol triggers a short term GABA<sub>A</sub>-receptor mediated neuroprotection on primary neuronal cultures of embryonic rats. Akzeptiert im *J Int Med Res*.

\*geteilte Erstautorenschaft.

Berns M\*, Zacharias R\*, Seeberg L, Schmidt M, Kerner T (2009) Effects of sevoflurane on primary neuronal cultures of embryonic rats are mediated predominantly by a GABA<sub>A</sub>-receptor independent mechanism. Akzeptiert im *Eur J Anaesthesiol*.

\*geteilte Erstautorenschaft.

### Poster

Seeberg L, Berns M, Schmidt M, Kerner T (2007) Effect of GABA receptor antagonists on Propofol treated neonatal primary neuronal cultures of the rat. Hauptstadtkongress der DGAI für Anästhesiologie und Intensivtherapie (HAI) 2007 in Berlin.

Seeberg L, Berns M, Schmidt M, Kerner T (2007) Effects of Propofol on neonatal primary neuronal cultures of the rat. *European Society of Intensive Care medicine (ESICM) 20<sup>th</sup> Annual Congress 2007* in Berlin.

## **Lebenslauf**

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

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denen bedanken, deren Unterstützung und Ratschläge mich in allen Phasen der Erstellung der vorliegenden Arbeit begleitet haben:

Mein herzlicher Dank gilt PD Dr. med. Thoralf Kerner für die Überlassung des Dissertationsthemas, die lehrreichen Gespräche und die geduldige Unterstützung innerhalb der letzten drei Jahre.

Ganz besonderer Dank geht an Dr. med. Monika Berns für die gewissenhafte Betreuung, freundliche Unterstützung und kompetente Beratung während des gesamten Projektes.

Ebenso möchte ich mich für die intensive Betreuung in der Anfangszeit durch Dr. med Maren Schmidt bedanken, welche enthusiastisch und mit hoher Aufopferungsgabe durch Dr. med. Robert Zacharias fortgeführt wurde.

Für ihre Hilfe in technischen Fragen, die freundschaftliche Zusammenarbeit und die zahlreichen Aufmunterungen während der Arbeit im Labor seien insbesondere Marco Sifringer und Evelyn Strauss erwähnt.

Für seine unersetzbare Hilfe bei der Korrektur bedanke ich mich bei Werner Schaller sowie im Speziellen bei meiner Freundin Stefanie Schaller für ihre fortwährende Motivation und Anteilnahme.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken, die mich während der gesamten beruflichen Ausbildung zu jeder Zeit unterstützten und zugleich für die nötige Ablenkung sorgten.

## **Erklärung an Eides Statt**

Hiermit erkläre ich, Lucas Seeberg, an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema:

### **Untersuchungen zur Wirkung von Propofol und Sevofluran auf embryonale neuronale Zellkulturen der Ratte,**

von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 01.05.2009

Datum

Lucas Seeberg

Unterschrift