

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

DISSERTATION

Neurodegenerative Effekte von Propofol auf das unreife Gehirn der Ratte

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von
Mirjam Weise
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. T. Kerner

2. Prof. Dr. med. C. Bühner

3. Prof. Dr. med. U. X. Kaisers

Datum der Promotion: 29.01.2010

Inhaltsverzeichnis

<u>1. EINLEITUNG</u>	6
1.1 Kinderanästhesie	6
1.1.1 Besonderheiten der Narkose bei Neugeborenen und Kindern.....	6
1.1.2 Anatomische und physiologische Besonderheiten in der Kinderanästhesie	7
1.1.2.1 <i>Der Respirationstrakt</i>	7
1.1.2.2 <i>Das Herz-Kreislauf-System</i>	8
1.1.2.3 <i>Die Temperaturregulation</i>	9
1.1.2.4 <i>Der Energiestoffwechsel und das Flüssigkeitsgleichgewicht</i>	9
1.1.3 Pharmakologische Besonderheiten in der Kinderanästhesie	10
1.1.3.1 <i>Die Aufnahme von Pharmaka</i>	10
1.1.3.2 <i>Die Verteilung von Pharmaka</i>	10
1.1.3.3 <i>Der Metabolismus von Pharmaka</i>	11
1.1.4 Die Wirkungsmechanismen von Anästhetika	11
1.1.5 Die Neurotoxizität von Anästhetika	12
1.2 Die Vulnerabilität des sich entwickelnden Gehirns	13
1.2.1 Die Phase des rapiden Hirnwachstums	13
1.2.2 Nekrose.....	14
1.2.3 Apoptose.....	15
1.2.3.1 <i>Apoptose im sich entwickelnden Gehirn</i>	15
1.2.3.2 <i>Morphologie der Apoptose</i>	16
1.2.3.3 <i>Regulation der Apoptose</i>	17
1.2.3.4 <i>Apoptose bei Erkrankungen des Nervensystems</i>	18
1.3 Propofol	18
1.3.1 Entwicklung und Zulassung der Substanz	18
1.3.2 Pharmakokinetik.....	19
1.3.3 Wirkungsmechanismus	19
1.3.3.1 <i>Der γ-Aminobuttersäure-Rezeptor (GABA_A-Rezeptor)</i>	20
1.3.3.2 <i>Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor)</i>	22
1.3.3.3 <i>Der nicotinsche Acetylcholin-Rezeptor</i>	23
1.3.3.4 <i>Der Glycin-Rezeptor</i>	24

1.3.4 Wirkungen	24
1.3.5 Nebenwirkungen	24
1.4 Erythropoietin	26
1.4.1 Der Erythropoietinrezeptor	26
1.4.2 Erythropoietin im Gehirn	26
1.4.3 Neuroprotektive Wirkung von Erythropoietin	27
1.5 Fragestellung der Arbeit	27
<u>2. MATERIAL UND METHODEN</u>	30
2.1 Tierversuche: Tiere, Injektionen, ethische Richtlinien	30
2.2 Durchgeführte Versuche	31
2.2.1 Dosisfindung	31
2.2.2 Dosisabhängigkeit.....	32
2.2.3 Altersabhängigkeit.....	32
2.2.4 Einfluss von Erythropoietin auf die Wirkung von Propofol.....	33
2.3 Perfusion und Gewebepräparation	34
2.4 Einbettung und Schnitte für die De Olmos Kupfer-Silberfärbung.....	35
2.5 De Olmos Kupfer-Silberfärbung.....	36
2.6 Einbettung und Schnitte für die TUNEL-Färbung.....	38
2.7 TUNEL-Färbung	39
2.8 Morphometrie.....	39
2.9 Statistische Auswertung	41
<u>3. ERGEBNISSE</u>	42
3.1 Dosisfindung.....	42
3.2 Neurotoxische Effekte von Propofol im unreifen Gehirn der Ratte.....	42
3.3 Dosisabhängigkeit der neurotoxischen Effekte.....	45
3.4 Altersabhängigkeit der neurotoxischen Effekte	49
3.5 Reduktion der neurotoxischen Wirkung von Propofol durch die Gabe von Erythropoietin.....	50

<u>4. DISKUSSION</u>	54
4.1 Zusammenfassung der neurotoxischen und neuroprotektiven Effekte von Propofol	54
4.2 Apoptose oder Nekrose?	55
4.3 Dosisabhängigkeit der Wirkung von Propofol	56
4.4 Altersabhängigkeit der neurodegenerativen Wirkung von Propofol	58
4.5 Neurodegenerative Wirkung von Propofol im Vergleich zu anderen Anästhetika	59
4.6 Neuroprotektive Wirkung von Erythropoietin	60
4.7 Die Übertragbarkeit des Tiermodells und Schlussfolgerungen	62
<u>5. ZUSAMMENFASSUNG</u>	64
<u>6. LITERATUR</u>	66
<u>7. VERZEICHNISSE</u>	74
7.1 Abbildungsverzeichnis	74
7.2 Tabellenverzeichnis	76
7.3 Abkürzungsverzeichnis	77
<u>8. ANHANG</u>	79
8.1 Lebenslauf	79
8.2 Publikationen und Kongressbeiträge	80
8.3 Danksagung	80
8.4 Eidesstattliche Erklärung	81

1. Einleitung

1.1 Kinderanästhesie

1.1.1 Besonderheiten der Narkose bei Neugeborenen und Kindern

Die Größe ist der auffälligste äußerliche Unterschied zwischen Kindern und Erwachsenen, Kinder sind jedoch nicht nur ein verkleinertes Abbild der Erwachsenen [1, 2, 3]. Zwischen Kindern und Erwachsenen bestehen wichtige anatomische, physiologische, biochemische und psychologische Unterschiede, welche umso ausgeprägter sind, je kleiner das Kind ist. Deshalb gibt es verschiedene Besonderheiten in der Kinderanästhesie [1, 2, 3].

Die Allgemeinanästhesie ist für Kinder das am häufigsten verwendete Verfahren. In der Kinderanästhesie werden bei einer Anpassung der Dosis im Wesentlichen die gleichen Narkosemittel und Adjuvantien wie bei Erwachsenen eingesetzt. Typischerweise können N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorantagonisten (NMDA-Antagonisten) wie Ketamin oder Lachgas und/oder γ -Aminobuttersäure-Rezeptoragonisten (GABA_A -Agonisten) wie Benzodiazepine, Barbiturate, Isofluran oder Propofol benutzt werden. Ein häufig benutztes Verfahren ist hierbei wegen ihrer einfachen Handhabung und guten Steuerbarkeit die Inhalationsnarkose. Aber auch die totale intravenöse Anästhesie (TIVA), z.B. Propofol mit Remifentanyl, wird zunehmend bei Kindern eingesetzt [1]. Bei den intravenösen Narkoseformen sind die für die Inhalationsanästhesie mit älteren Substanzen typischen Probleme wie Laryngo- und Bronchospasmus deutlich seltener [3].

Bei Propofol entsprechen die hypnotischen und sedierenden Wirkungen bei Kindern grundsätzlich denen bei Erwachsenen. Unterschiede bestehen jedoch in der Dosis-Wirkungs-Beziehung. Pharmakokinetisch besteht bei Kindern ein relativ hohes Verteilungsvolumen und eine hohe Clearance, welche den höheren Dosisbedarf von Kindern im Vergleich zu Erwachsenen (ca. 50%) erklären [1]. Sowohl für die Einleitung als auch für die Aufrechterhaltung werden bei Kindern höhere Propofoldosen pro Kilogramm Körpergewicht (kgKG) als bei Erwachsenen benötigt [2].

Insbesondere Früh- und Neugeborene zeigen ein deutlich erhöhtes Narkoserisiko [4, 5, 6]. Bei der Anästhesie von Neugeborenen ergab sich eine zehnfach erhöhte

perioperative Morbidität und Mortalität, da die unreifen Organsysteme von Neonaten, insbesondere die Herzfunktion, sehr empfindlich auf den kardiodepressiven Effekt von Anästhetika reagieren [4]. In einer prospektiven Untersuchung in Frankreich, veröffentlicht 1988, zeigten sich bei Säuglingen 19 anästhesiebedingte Herzstillstände pro 10.000 Narkosen und bei Kindern unter 15 Jahren 2,1 Herzstillstände pro 10.000 Narkosen [5]. In einem brasilianischen Lehrkrankenhaus wurde die Altersverteilung von perioperativen Herzstillständen bei 53.718 Anästhesien zwischen April 1996 und März 2005 untersucht. Bei Neugeborenen zeigte sich eine signifikant erhöhte Inzidenz, mit 177,33 perioperativen Herzstillständen pro 10.000 Anästhesien. Bereits im Säuglingsalter kommt es zu einer deutlichen Reduktion auf 55,13 perioperative Herzstillstände pro 10.000 Narkosen. Bei Erwachsenen kommt es nach einer Abnahme mit zunehmendem Alter dann wieder zu einer Zunahme der anästhesiebedingten Herzstillstände. So ergaben sich bei 18-35 jährigen Patienten 18,34 perioperative Herzstillstände pro 10.000 Anästhesien und bei den 51-64 jährigen Patienten 54 perioperative Herzstillstände pro 10.000 Narkosen [5]. Häufige Ursachen waren respiratorische Probleme, wie die pulmonale Aspiration oder die Verlegung der Atemwege und die Dämpfung der Herz-Kreislauf-Funktion durch Anästhetika.

1.1.2 Anatomische und physiologische Besonderheiten in der Kinderanästhesie

Zwischen Kindern und Erwachsenen bestehen wichtige anatomische und physiologische Unterschiede, welche beim Neugeborenen besonders ausgeprägt sind.

1.1.2.1 Der Respirationstrakt

Anatomisch zeigen sich ein relativ großer Kopf mit einem kurzen Hals, eine große Zunge und eine enge Stimmritze. Die Trachea ist beim Neugeborenen nur ca. vier Zentimeter lang und hat einen Durchmesser von sechs Millimetern. Der Kehlkopf von Kindern steht höher als bei Erwachsenen und die engste Stelle befindet sich im Bereich des Ringknorpels. Der rechte und der linke Hauptbronchus entspringen beide in einem Winkel von 55° von der Trachea. Neugeborene atmen obligatorisch durch die Nase. Bereits eine geringe Schwellung der Schleimhäute kann zu einer Verlegung der Atemwege führen. Zusätzlich zeigt sich ein unvollständig ausgeprägter Hustenreflex, so dass eine erhöhte Aspirationsgefahr besteht [1, 2, 3].

Auch in den physiologischen Regulationen unterscheidet sich das Neugeborene vom Erwachsenen. In der ersten Lebenswoche zum Beispiel wird die Atmung bei Hypoxie nur gesteigert, wenn die Körpertemperatur im Normbereich liegt. Die Lungenvolumina von Kleinkindern entsprechen auf die Körperoberfläche bezogen denen der Erwachsenen. Die Totalkapazität des Neugeborenen beträgt etwa 160 ml. Die Vitalkapazität des Neugeborenen beträgt beim Schreien etwa 120 ml, dies entspricht bezogen auf das Körpergewicht der des Erwachsenen [7]. Die funktionelle Residualkapazität ist beim Neugeborenen 80 ml. Bezogen auf das Körpergewicht ist die funktionelle Residualkapazität beim Neugeborenen kleiner als beim Erwachsenen [7]. Aufgrund der geringen Volumina muss in der Kinderanästhesie spezielles Zubehör mit einem kleinstmöglichen Totraum verwendet werden. Die alveoläre Ventilation ist bei Neugeborenen wegen des höheren Stoffwechsels zweimal so hoch wie beim Erwachsenen. Die Atemfrequenz von Neugeborenen beträgt 40-60 Atemzüge pro Minute. Eine Steigerung der Atmung wird durch eine höhere Atemfrequenz und nicht so sehr durch eine vertiefte Atmung erreicht. Die funktionelle Residualkapazität ist bei Neugeborenen als Puffer gegenüber Schwankungen der Atemgas- und Anästhetikakonzentration weniger effektiv als beim Erwachsenen, da das Verhältnis von alveolärer Ventilation zu funktioneller Residualkapazität beim Neugeborenen 5:1 und beim Erwachsenen 1,5:1 beträgt [1, 2, 3].

1.1.2.2 Das Herz-Kreislauf-System

Beim Neugeborenen werden kurz nach der Geburt der Ductus Botalli und das Foramen ovale verschlossen, so dass anatomisch der Kreislauf wie bei Erwachsenen entsteht. Bei dem Auftreten einer Azidose oder eines Sauerstoffmangels in der Neugeborenenzeit kann es zu einer Erhöhung des Widerstandes im Lungenkreislauf kommen, wodurch sich die fetalen Kurzschlüsse wieder eröffnen können. Der Kreislauf des Neugeborenen ist bereits von sich aus zentralisiert, so dass über diesen Mechanismus Blutverluste kaum kompensiert werden können. Bei einer hohen Herzfrequenz (120/min) und einem geringen Schlagvolumen (4-5 ml) besteht ein ausgeprägter Sympathikotonus. Das Herz des Neugeborenen ist nur sehr wenig dehnbar, so dass eine Steigerung des Herzzeitvolumens hauptsächlich über eine Steigerung der Herzfrequenz erfolgt. Mit zunehmendem Alter nimmt die Herzfrequenz ab. Der arterielle Blutdruck liegt beim Neugeborenen systolisch zwischen 60 und 80 mmHg und diastolisch zwischen 40 und 50 mmHg. Eine Hypoxie führt zu einer

Gefäßkonstriktion mit einer Abnahme der Durchblutung von Haut und Gastrointestinaltrakt. Das Blutvolumen beträgt etwa 80-85 ml / kg Körpergewicht und ist damit relativ höher als beim Erwachsenen. Während der Narkose besteht eine enge Korrelation zwischen dem systolischen Blutdruck und dem zirkulierenden Blutvolumen. Bei Neugeborenen führen bereits geringe Blutverluste zu einem Volumenmangel, der lebensbedrohlich werden kann. Der Blutdruck fällt proportional zum Blutverlust [1, 2, 3].

1.1.2.3 Die Temperaturregulation

Die Temperaturregulation ist beim Neugeborenen noch nicht vollständig ausgebildet. Aufgrund der großen Körperoberfläche bezogen auf das Körpergewicht kühlt es in einer kalten Umgebung rasch aus. Durch Strahlung und Konvektion kommt es zu Wärmeverlusten. Bei Kältereizen kommt es zwar zu einer Vasokonstriktion, aber effektives Kältezittern und schützendes subkutanes Fettgewebe fehlen. Durch den Abbau von braunem Fettgewebe kann eine Thermogenese stattfinden, hierbei steigt jedoch der Sauerstoffverbrauch, so dass es bei andauernden Kältereizen zu einer metabolischen Azidose kommen kann. Während der Narkose sollte die Körpertemperatur im Normbereich gehalten werden [1, 2].

1.1.2.4 Der Energiestoffwechsel und das Flüssigkeitsgleichgewicht

Der basale Stoffwechsel von Kindern ist höher als der von Erwachsenen. Hauptenergiequellen sind Kohlenhydrate und Fett. Da die Energievorräte des Neugeborenen sehr gering sind, werden Fasten und eine ungenügende Flüssigkeitszufuhr schlechter toleriert als bei Erwachsenen. Es sollte auf eine ausgeglichene Bilanz geachtet werden.

Der Wassergehalt von Neugeborenen und Kleinkindern ist relativ größer als der von Erwachsenen und die Fähigkeit der Nieren, den Urin zu konzentrieren oder Wasser zu konservieren, ist stark begrenzt. Flüssigkeitsverluste führen rasch zur Dehydrierung und werden schlecht toleriert. Andererseits kann eine übertriebene Flüssigkeitszufuhr in Abhängigkeit von der Infusion zu einer Überwässerung, einem Natriumüberschuss und zu Ödemen führen [1, 2].

1.1.3 Pharmakologische Besonderheiten in der Kinderanästhesie

Früh- und Neugeborene reagieren anders auf Pharmaka als Erwachsene, da es Unterschiede in der Absorption, der Verteilung und dem Metabolismus gibt.

1.1.3.1 Die Aufnahme von Pharmaka

Die Absorption von oral zugeführten Substanzen kann bei Früh- und Neugeborenen aufgrund unzureichender Transportmechanismen verzögert werden. Die Aufnahme von Inhalationsanästhetika verläuft bei Früh- und Neugeborenen deutlich schneller als bei Erwachsenen, da das Verhältnis von alveolärer Ventilation zu funktioneller Residualkapazität beim Neugeborenen mit 5:1 deutlich höher ist als bei Erwachsenen, wo es 1,5:1 beträgt [1]. Nach einer intramuskulären Injektion kann die Absorption eines Medikamentes hingegen aufgrund einer verminderten Muskeldurchblutung und/oder einer geringeren Muskelmasse verzögert sein [1].

1.1.3.2 Die Verteilung von Pharmaka

Bei Neugeborenen ist der Serum-Albumingehalt mit 3,5 g / 100 ml geringer als der des Erwachsenen mit 4,5 g / 100 ml [1]. Dadurch kommt es zu einer verminderten Proteinbindung und einer Steigerung der Serumkonzentration der freien bzw. aktiven Form des Pharmakons. Eine weitere Ursache für die geringere Proteinbindung ist ein Neugeborenenikterus, bei welchem das Pharmakon durch das erhöhte Bilirubin aus seiner Albuminbindung verdrängt wird. Zusätzlich führt das Vorhandensein von fetalem Albumin mit einer geringeren Affinität zu einer verminderten Proteinbindung [1]. Erst im Alter von einem Jahr entspricht die Proteinbindung von Pharmaka derjenigen der Erwachsenen.

Außerdem besteht beim Neugeborenen eine andere Zusammensetzung der Körperkompartimente. Das Verhältnis von Extrazellulärvolumen zu Gesamtkörperwasser ist zum Zeitpunkt der Geburt am höchsten und nimmt im weiteren Verlauf der Kindheit ab. Je größer das Verteilungsvolumen ist, desto größer ist die erforderliche Dosis eines Pharmakons. Die Körperoberfläche korreliert eng mit dem Extrazellulärvolumen [1].

Auch die Membranpermeabilität des Neugeborenen entspricht nicht der eines Erwachsenen, so ist zum Beispiel die Blut-Hirn-Schranke noch nicht vollständig

ausgebildet und nicht-ionisierte, lipophile Substanzen können verstärkt ins Gehirn eindringen und dort kumulieren [1].

1.1.3.3 Der Metabolismus von Pharmaka

Stoffwechselwege, welche beim Früh- und Neugeborenen nur unzureichend ausgebildet sind, führen zu einer verlängerten Halbwertszeit bestimmter Medikamente. Dies gilt insbesondere für oxidative und reduktive Prozesse. Die Reifungsprozesse der Leberfunktionen sind erst nach einigen Wochen bis Monaten abgeschlossen. Auch eine verzögerte renale Elimination kann die Wirkung von Medikamenten verlängern. Die Reifungsprozesse der glomerulären Filtration und der tubulären Sekretion sind nach 30 Tagen bzw. sechs Monaten abgeschlossen [1].

1.1.4 Die Wirkungsmechanismen von Anästhetika

Die genauen Wirkungsmechanismen von Anästhetika sind noch nicht vollständig verstanden. Um 1900 bemerkten Meyer und Overton einen Zusammenhang zwischen der anästhetischen Potenz und der Löslichkeit in Öl. Daraufhin wurde die Lipidtheorie entwickelt, welche besagte, dass Allgemeinanästhetika durch einen unspezifischen Mechanismus zu strukturellen Veränderungen in der Lipiddoppelschicht von Zellen führen. Da aber zum Beispiel optische Isomere verschiedener Anästhetika eine unterschiedliche Potenz zeigen, suchte man nach anderen, spezifischeren Wirkungsmechanismen. Es konnte in *in vitro* Studien gezeigt werden, dass Allgemeinanästhetika auf zahlreiche verschiedene Ionenkanäle wirken. Einen kleinen Überblick verschafft die Abbildung 1.1 [8].

Welche Wirkungsmechanismen für die erwünschten und welche für die unerwünschten Wirkungen zuständig sind, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden [8].

Eine entscheidende Rolle scheinen jedoch dem NMDA-Antagonismus (Ketamin, Lachgas) und dem GABA_A-Agonismus (Benzodiazepine, Barbiturate, Isofluran und Propofol) zuzukommen.

	GABA _A receptor	Glycine receptor	nACh (muscle) receptor	nACh (neuro) receptor	5-HT ₃ receptor	AMPA receptor	Kainate receptor	NMDA receptor
Etomidate	●	○	○	○	○			
Propofol	●	●	○	○	○	○	○	○
Barbiturates	●	○	○	○	○	○	○	○
Ketamine	○	○	○	○	○	○	○	○
Isoflurane	●	●	○	○	●	○	●	○
Sevoflurane	●	●	○	○				
Nitrous oxide	○	○	○	○	○	○	○	○

Abb. 1.1: Effekte von Anästhetika auf Liganden-gesteuerte Ionenkanäle

Dunkelgrün: signifikante Verstärkung, violett: signifikante Hemmung, hellgrün und hellviolett: leichte Verstärkung bzw. Hemmung, leeres Feld: kein Effekt unabhängig von der Konzentration;

GABA_A-receptor (γ-Aminobuttersäure-Rezeptor), nACh receptor (nicotinische Acetylcholin-Rezeptor), 5-HT₃ receptor (Serotonin-Rezeptor), AMPA receptor (α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure), NMDA receptor (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor);

(nach Rudolph und Antkowiak 2004 [8])

1.1.5 Die Neurotoxizität von Anästhetika

Zur Narkose wird häufig eine Kombination von NMDA-Antagonisten (Ketamin, Lachgas) und GABA_A-Agonisten (Benzodiazepine, Barbiturate, Isofluran und Propofol) benutzt. Verschiedene tierexperimentelle Untersuchungen z.B. mit Ethanol konnten zeigen, dass die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren und/oder die Blockade von NMDA-Rezeptoren im sich entwickelnden Rattengehirn während der Synaptogenese die apoptotische Neurodegeneration massiv erhöhen können [9, 10, 11].

GABA_A-Agonisten und NMDA-Antagonisten werden als Antikonvulsiva, Sedativa oder Anästhetika auch in der Geburtshilfe und der Pädiatrie benutzt. Aufgrund aktueller Forschungsergebnisse zur Neurotoxizität von Anästhetika wird die Sicherheit der aktuell in der Kinderanästhesie benutzten Medikamente in Bezug auf die Wirkung auf das zentrale Nervensystem diskutiert. Die Frage, die aktuell diskutiert wird, lautet: Führen Medikamente mit einer GABA_A-agonistischen oder einer NMDA-antagonistischen Wirkung auch zu einer erhöhten apoptotischen Neurodegeneration [9, 11, 12]?

1.2 Die Vulnerabilität des sich entwickelnden Gehirns

Das Gehirn von Säugetieren durchläuft verschiedene Entwicklungsphasen mit einer unterschiedlichen Vulnerabilität gegenüber verschiedenen endogenen und exogenen Noxen.

1.2.1 Die Phase des rapiden Hirnwachstums

Das Maximum der entwicklungsabhängigen Vulnerabilität liegt etwa in der Phase des rapiden Hirnwachstums (*brain growth spurt*) [13]. In dieser Phase des stärksten Hirnwachstums finden Migrations- und Differenzierungsvorgänge von Nerven- und Gliazellen sowie die Bildung von Synapsen und die physiologische Eliminierung von überschüssig angelegten Neuronen durch Apoptose statt [10, 14, 15].

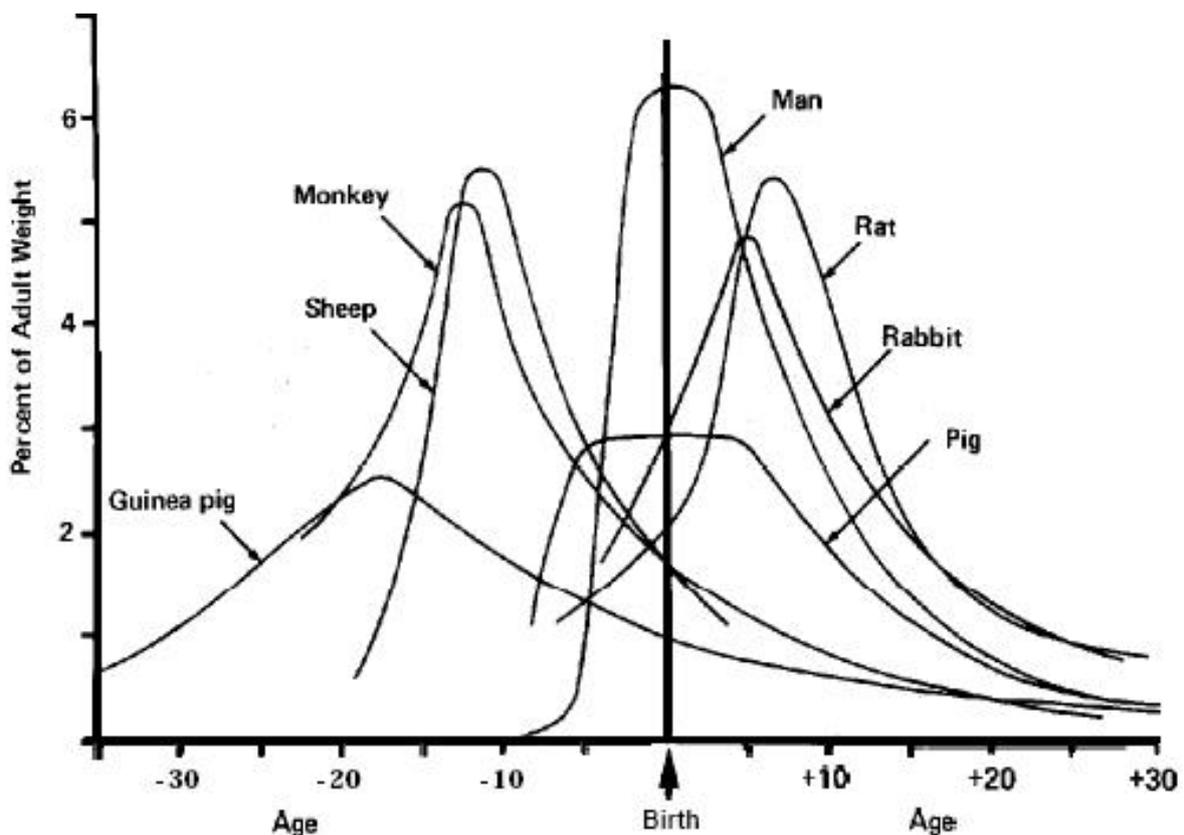


Abb. 1.2: Die Periode des rapiden Hirnwachstums „Brain growth spurt period“

Beim Menschen (1 Einheit = 1 Monat), beim Affen (1 Einheit = 4 Tage), beim Schwein (1 Einheit = 1 Woche), bei der Ratte (1 Einheit = 1 Tag), beim Schaf (1 Einheit = 5 Tage), beim Meerschwein (1 Einheit = 1 Tag) und beim Kaninchen (1 Einheit = 2 Tage) (nach Dobbing und Sands 1979 [13])

Der wichtige Unterschied zwischen den verschiedenen Spezies liegt im Zeitpunkt der Geburt bezogen auf diese Hirnwachstumsphase. In der Abbildung 1.2 werden die Hirnwachstumsphasen verschiedener Spezies verglichen. Beim Menschen beginnt die rapide Hirnwachstumsphase im letzten Trimenon der Schwangerschaft ab der 23. Schwangerschaftswoche, und endet mit dem Beginn des dritten Lebensjahres des Kindes. Bei der Ratte ist diese Phase postnatal. Sie beginnt mit der Geburt und umfasst die ersten drei Lebenswochen. Die maximale Geschwindigkeit des Hirnwachstums liegt bei der Ratte zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag [13].

In der Phase des rapiden Hirnwachstums reagiert das sich entwickelnde Gehirn sehr empfindlich auf externe Noxen. In verschiedenen Studien wird eine pathologisch erhöhte Neurodegeneration durch unterschiedliche Substanzen, unter anderem Alkoholkonsum der Mutter in der Schwangerschaft, Traumata, Hypoxie sowie Medikamente wie Anästhetika und Antiepileptika, beschrieben [9, 11, 16, 17, 18]. Beim fetalen Alkoholsyndrom führt der Alkoholkonsum der Mutter in der Schwangerschaft während der Synaptogenese (*brain growth spurt*) zu einer verstärkten apoptotischen Neurodegeneration mit einer verminderten Hirnmasse und neurologisch bedingten Verhaltensstörungen [11, 16, 19]. Innerhalb des *brain growth spurt* sind zu verschiedenen Zeitpunkten unterschiedliche Nervenzellpopulationen von der Neurodegeneration betroffen, so dass es zu verschiedenen neurologisch bedingten Verhaltensstörungen kommen kann [9]. Bei einer Verletzung des unreifen Gehirns (z.B. Ischämie, Trauma, Medikamente) muss zwischen der akuten Schädigung, welche sofort auftritt, und einem sekundären oder verzögerten Zelltod, welcher meist apoptotischer Natur ist, unterschieden werden. Dieser tritt Stunden bis Tage nach der Verletzung auf und bestimmt letztlich die Langzeitprognose der neurologischen Entwicklung [14]. Im Model des Schädel-Hirn-Traumas bei Ratten zeigte sich eine altersabhängige Neurodegeneration, welche zwischen dem dritten und siebten postnatalen Tag am höchsten war [20]. Auch die Empfindlichkeit gegenüber externen Noxen ist innerhalb der rapiden Hirnwachstumsphase unterschiedlich. Sie ist zum Beispiel bei der Ratte bei antiepileptischen Medikamenten und Hypoxie/Ischämie um den siebten Tag am höchsten [17, 18].

1.2.2 Nekrose

Die Nekrose stellt den pathologischen Untergang einzelner oder mehrerer Zellen dar. Schädigende Einflüsse wie Sauerstoffmangel, Gifte oder Bakterien können unter

Umständen zu diesem Zelluntergang führen. Durch die Nekrose kommt es zu einer Freisetzung intrazellulärer Substanzen. Der exzitotoxische Zelltod führt zu einem rapiden, unkontrollierten Anschwellen von Dendriten, Zellkörpern und intrazytoplasmatischen Organellen und dann zu einer Kernfragmentation und Lyse der Zelle. Die freigesetzten Überreste der Zelle lösen einen Entzündungsvorgang aus [21]. Ultrastrukturell zeigen sich deutlich unterschiedliche Abläufe zwischen dem exzitotoxischen und dem apoptotischen Zelltod [10].

1.2.3 Apoptose

Diese Form des sogenannten aktiven oder programmierten Zelltodes wurde 1972 von Kerr, Wyllie und Currie beschrieben [22]. Bei der Apoptose wird der Zelluntergang von der betreffenden Zelle selbst aktiv durchgeführt. Die Apoptose ist ein weitverbreiteter Prozess in der Natur, welcher sowohl physiologisch in der Entwicklung als auch bei pathologischen Veränderungen auftritt [23, 25, 26].

1.2.3.1 Apoptose im sich entwickelnden Gehirn

Die Apoptose nimmt in der Entwicklung des zentralen Nervensystems eine wichtige Rolle ein und führt zur physiologischen Elimination von überschüssig angelegten Nervenzellen [26, 27].

Neuronen und Gliazellen werden im Überschuss produziert und im Rahmen der Hirnreifung ungefähr auf die Hälfte ihrer Ausgangszahl reduziert [23, 27]. Der aktive Zelltod betrifft alle Stufen der neuronalen Reifung. Am häufigsten sind jedoch reife Neuronen betroffen, die bereits über Verbindungen zu afferenten und efferenten Zellen verfügen [15].

Ziel der Apoptose in der Hirnentwicklung ist ein möglichst optimales Verhältnis zwischen präsynaptischen Neuronen und Zielzellen [28]. Präsynaptische Neurone konkurrieren untereinander um trophische Faktoren, wie z.B. den *nerve growth factor* (NGF) und den *insulin-like growth factors* (IGF) von den Zielzellen. Schaffen sie es nicht, die Zielzelle zur Bildung von ausreichend trophischen Substanzen anzuregen, so sterben sie den aktiven, programmierten Zelltod [24, 25, 26]. Auch die Aktivität der Neuronen, humorale Faktoren und die trophische Unterstützung durch die Gliazellen spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle des Überlebens von Nervenzellen [23].

1.2.3.2 Morphologie der Apoptose

Zellen, die physiologisch aktiv untergehen, schrumpfen zunächst bei noch intakter Zellintegrität und die Zellkontakte lösen sich. Die ultrastrukturelle Untersuchung der apoptotischen Neurodegeneration zeigt die ersten Veränderungen im Nukleoplasma. Die ursprünglich homogene Masse verklumpt sich, und es bilden sich Chromatinkugeln, welche entlang der Kernmembran kondensieren. Der Kern schrumpft (Karyopyknose) und die nukleäre Desoxyribonukleinsäure (DNA) wird fragmentiert. Die Kernmembran zerfällt, so dass sich Zytoplasma und Nukleoplasma vermischen. Die Chromatinkugeln verteilen sich in der ganzen Zelle. Die Organellen des Zytoplasmas sind weitgehend unbeeinträchtigt von diesen Vorgängen. Es kommt lediglich zu einem leichten Anschwellen der Mitochondrien. Zuletzt schnürt die Zelle Fragmente ab (*apoptotic bodies*), welche anschließend phagozytiert werden, ohne dass es dabei zu einer wesentlichen inflammatorischen Reaktion kommt [10]. Anhand dieser morphologischen Kriterien kann man die Apoptose von der Nekrose abgrenzen [14]. Um die neuropathologischen Veränderungen einzuordnen, ist die Elektronenmikroskopie am zuverlässigsten [10].

Die Apoptose kann zum einen durch einen extrinsischen, Rezeptor-vermittelten Weg und zum anderen über einen intrinsischen, mitochondrialen Weg in Gang gesetzt werden [23].

Der extrinsische Weg wird durch die Aktivierung von Todesrezeptoren z.B. der Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF) in Gang gesetzt. Nach der Bindung von spezifischen Liganden kommt es zur Aktivierung eines intrazellulären Signalkomplexes, der die autoproteolytische Aktivierung einer Kaskade von Caspasen ermöglicht.

Der intrinsische Weg kann durch verschiedene Mechanismen, wie die Induktion von Strangbrüchen der DNA bei radioaktiver Bestrahlung, Entzug von Wachstumsfaktoren oder die Zellschädigung durch freie Radikale im Rahmen von oxidativem Stress aktiviert werden. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien, welches mit anderen Faktoren und der Procaspase 9 das sogenannte Apoptosom bildet, welches die Effektor-Caspase 3 aktiviert. Diese führt zu einer Fragmentation der nukleären DNA [29].

Abbildung 1.3 zeigt schematisch die molekularen Interaktionen während des extrinsischen und des intrinsischen Wegs der Apoptose.

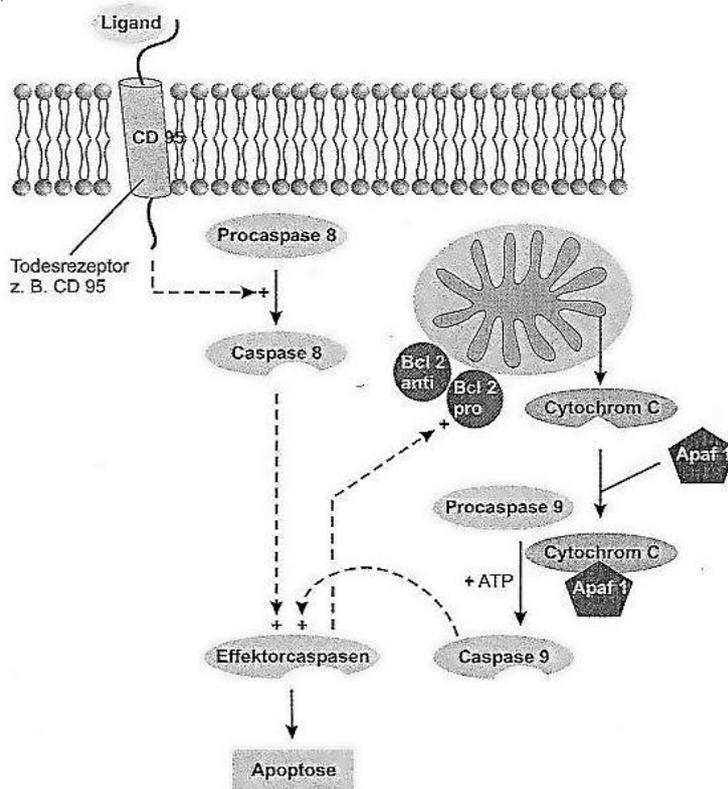


Abb. 1.3: Die molekularen Interaktionen während der Apoptose mit der Darstellung des intrinsischen und des extrinsischen Wegs (nach Linnemann und Kühl 2004 [21])

CD 95 (Todesrezeptor der Tumornekrosisfaktor-Familie), Bcl (*B-cell lymphoma*), Apaf (*Apoptosis Protease Activating Factor*), ATP (Adenosintriphosphat)

1.2.3.3 Regulation der Apoptose

Abgesehen von der eigentlichen apoptotischen Signaltransduktion gibt es viele verschiedene Apoptose-regulierende Elemente (z.B. Mitglieder der Bcl-Familie (*B-cell lymphoma-Familie*), Wachstumsfaktoren etc.). Diese regulierenden Elemente können sowohl proapoptotisch als auch antiapoptotisch wirken. Bcl-2 wirkt zum Beispiel antiapoptotisch [21]. Die Expression von Bcl-2 ist während der Entwicklung im zentralen Nervensystem hoch und wird nach der Geburt reduziert [24].

Neutropine, Caspaseinhibitoren und Wachstumsfaktoren des hämatopoetischen Systems können durch die Inhibition der Caspase 9 oder durch die Hemmung der Cytochrom C-Ausschüttung aus den Mitochondrien antiapoptotisch wirken. Zu diesen Wachstumsfaktoren zählt unter anderem auch Erythropoetin [31, 32]. Auch für β -Ostradiol konnte in verschiedenen Studien ein neuroprotektiver Effekt nachgewiesen werden [17].

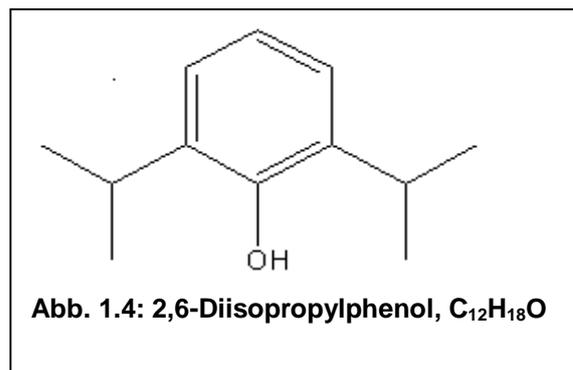
1.2.3.4 Apoptose bei Erkrankungen des Nervensystems

Die Apoptose ist auch in viele Erkrankungen des Nervensystems involviert, dazu zählen unter anderem Hypoxie, Ischämie, HIV-Enzephalopathie, cerebelläre Ataxie, Amyotrophe Lateralsklerose sowie Morbus Parkinson und Alzheimer [23, 24, 25]. Beispiele für eine zu geringe Apoptoseaktivität sind kongenitale Fehlbildungen, wie die Myelomeningozele und Tumorerkrankungen [33].

1.3 Propofol

1.3.1 Entwicklung und Zulassung der Substanz

Propofol ist ein 2,6-Diisopropylphenol, das als 1% und 2%-Emulsion erhältlich ist und aufgrund seiner Wasserunlöslichkeit in 10% Sojabohnenöl, 2,25% Glycerol und 1,2% Ei-Phosphatiden gelöst wird [34]. Es wird als intravenöses Allgemeinanästhetikum zur Einleitung und Aufrechterhaltung einer Narkose, zur Sedierung bei Eingriffen in Lokal- oder Regionalanästhesie und zur Sedierung von beatmeten Patienten im Rahmen der Intensivbehandlung verwendet [35].



Propofol wirkt hypnotisch, aber nicht analgetisch, so dass es im Rahmen einer Allgemeinanästhesie in der Regel mit einem Analgetikum kombiniert wird. Das Medikament Propofol zeichnet sich durch einen raschen Wirkungseintritt, einen dosisabhängigen hypnotischen Effekt und ein schnelles Aufwachen selbst nach einem langen Einsatz aus [36].

Propofol wurde 1977 klinisch eingeführt [37] und ist seit 1988 unter dem Markennamen Disoprivan in der Bundesrepublik Deutschland zugelassen [38]. In Deutschland ist Propofol nicht zur Narkose bei Kindern unter einem Monat zugelassen und eine Narkosedauer von 60 Minuten sollte bei Kindern nur in Ausnahmefällen und bei zwingender Indikation überschritten werden [35]. Da Propofol die Plazenta passiert und die Sicherheit der Anwendung in der Schwangerschaft nicht belegt ist, sollte es laut Fachinformation während dieser Zeit nur, wenn es unbedingt erforderlich ist,

angewendet werden. Außerdem geht Propofol in geringen Mengen in die Muttermilch über, so dass das Stillen für 24 Stunden nach der Anwendung unterbrochen und die Muttermilch verworfen werden soll [35]. Aber trotz dieser offiziellen Einschränkungen wird Propofol zur Anästhesie von Schwangeren, Früh- und Neugeborenen verwendet.

1.3.2 Pharmakokinetik

Propofol ist stark lipophil und zu 97% an Plasmaeiweiße gebunden [35]. Diese hohe Lipophilie bedingt die schnelle Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke und damit den schnellen Wirkungsbeginn sowie die rasche Umverteilung und damit verbunden die ebenso rasche Beendigung der hypnotischen Wirkung [34]. Die Pharmakokinetik lässt sich am besten über ein 3-Kompartimentmodell beschreiben. Initial kommt es zu einer schnellen Umverteilung aus dem Blut ins Gewebe (α -Phase, Halbwertszeit beim Erwachsenen: 1,8-4,1 min) [35]. Durch die unterschiedlich starke Durchblutung der verschiedenen Gewebe kommt es zu organspezifischen Konzentrationen. Da das Gehirn mit einem großen Anteil des Herzzeitvolumens durchblutet wird, kommt es dort zu einem raschen Anstieg der Wirkstoffkonzentration [34]. In der Eliminations- oder β -Phase erfolgt der Spiegelabfall langsamer. Die errechnete Halbwertszeit für diese Phase beträgt beim Erwachsenen 34-64 min [35]. Diese Phase ist gekennzeichnet durch die hepatische Metabolisierung (Glucuronidierung und Hydroxylierung) [39]. Die inaktiven Metabolite werden renal ausgeschieden [35]. Die totale Clearance beträgt beim Erwachsenen 2 l/min [35]. Schließlich kommt bei einem längeren Beobachtungszeitraum in der dritten Phase das tiefe Kompartiment zum Tragen. In dieser γ -Phase kommt es zu einem langsamen Rückfluten des Propofols aus den langsam perfundierten Geweben wie dem Fett ins Blut [34]. Die Halbwertszeit dieser Phase beträgt beim Erwachsenen 184-382 min [35]. Der pH-Wert der Lösung liegt bei 7-8,5, was die wiederholt beschriebenen Dysästhesien bei der intravenösen Bolus-Applikation erklärt [34].

1.3.3 Wirkungsmechanismus

Die Wirkungsweise des Propofols ist komplex und noch nicht genau geklärt. Es gibt zahlreiche Untersuchungen und Veröffentlichungen, die sich mit den verschiedenen

Wirkmechanismen und den möglichen Rezeptoren beschäftigen. Abbildung 1.5 zeigt die wichtigsten Rezeptoren, über welche Propofol hauptsächlich wirkt.

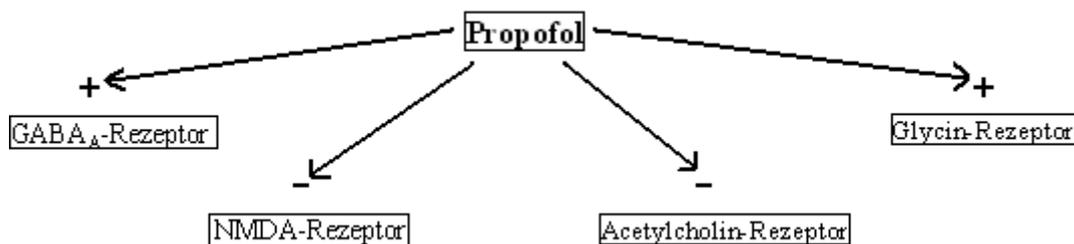


Abb. 1.5: Übersicht über wichtige Wirkungen von Propofol

GABA_A-Rezeptor (γ -Aminobuttersäure-Rezeptor), NMDA-Rezeptor (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor), + entspricht Agonist, - entspricht Antagonist

1.3.3.1 Der γ -Aminobuttersäure-Rezeptor (GABA_A-Rezeptor)

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist neben Glycin im adulten Gehirn der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter, aber im unreifen Gehirn hat GABA auch exzitatorische Funktionen und beeinflusst die neuronale Migration und Differenzierung [4, 40]. Es sind GABA_A-, GABA_B- und GABA_C-Rezeptoren beschrieben. Propofol wirkt im Gehirn als GABA_A-Agonist.

Der GABA_A-Rezeptor (Abbildung 1.6) ist ein Heteropentamer, dessen fünf Untereinheiten (sieben Klassen homologer Untereinheiten sind bekannt) um einen zentralen Kanal angeordnet sind. Er ist ein ligandengesteuerter Chloridkanal [41, 42]. Die Art der Kombination der Untereinheiten ist regional im Gehirn unterschiedlich und ändert sich im Laufe der Hirnentwicklung [43]. Ab der zweiten Lebenswoche [44] führt die Aktivierung des GABA_A-Rezeptors zu einem Einstrom von Chloridionen ins Cytosol und damit zur Hyperpolarisation der Zellmembran, welche die Schwelle zur Auslösung eines Aktionspotentials heraufsetzt [41, 42].

Die unterschiedlichen Wirkungen von Propofol konnten zum Teil spezifischen Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors zugeordnet werden. Durch Untersuchungen mit *knock-in* und *knock-out* Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Sedierung hauptsächlich über die direkte Aktivierung der β_2 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors vermittelt wird, während der hypnotische Effekt zum größten Teil über die β_3 -Untereinheit erzielt wird. Die immobilisierende Wirkung von Propofol wird im Rückenmark fast exklusiv über eine Reaktion mit den β_3 -GABA_A-Rezeptoren erreicht [8,

30]. Die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren im sich entwickelnden Rattengehirn während der Synaptogenese triggert die apoptotische Neurodegeneration [10].

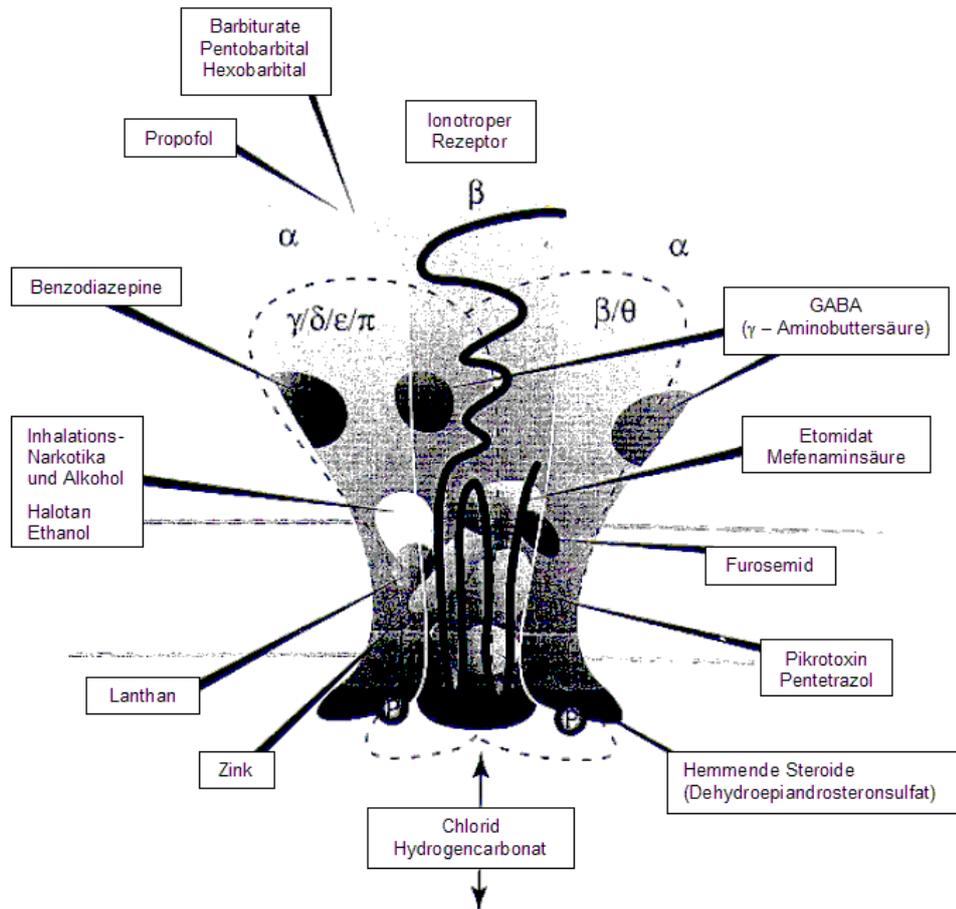


Abb. 1.6: Schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors und der Angriffsstellen verschiedener Medikamente (nach Bowery und Whiting 2002 [45])

Der GABA_B-Rezeptor ist metabotrop und besteht aus einem Transmembranprotein mit sieben Transmembransegmenten. Über ein G-Protein wird die Signaltransduktion vermittelt. Postsynaptisch kommt es zu einer Aktivierung von ligandengesteuerten Kaliumkanälen und damit zur Auslösung eines inhibitorischen, postsynaptischen Potentials. Präsynaptisch kommt es zusätzlich zur Aktivierung von ligandengesteuerten Kaliumkanälen zu einem Verschließen von ligandengesteuerten Calciumkanälen. Baclofen wirkt agonistisch am GABA_B-Rezeptor [46].

Der GABA_C-Rezeptor ist ionotrop und hat die dieselbe Struktur wie GABA_A-Rezeptoren. Allerdings sind GABA_C-Rezeptoren ausschließlich aus ρ-Untereinheiten aufgebaut. Die Bezeichnung wird kontrovers diskutiert, zum Teil werden sie auch als GABA-Rezeptor-Subtypen bezeichnet. Im Unterschied zu den GABA_A-Rezeptoren sind sie fast insensitive gegenüber Benzodiazepinen und Barbituraten. Die Aktivierung und die Deaktivierung erfolgt bei GABA_C-Rezeptoren deutlich langsamer als bei GABA_A-Rezeptoren [47].

1.3.3.2 Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor)

Der NMDA-Rezeptor ist ein ionotroper, tetramerer Glutamatrezeptor. Die schematische Darstellung ist in Abbildung 1.7 zu sehen. Dieser Rezeptor ist ein heterooligomeres Proteinkomplex aus sieben möglichen homologen Untereinheiten (NR1, NR2 A-D, NR3 A-B). Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Propofol wirkt im Gehirn als NMDA-Antagonist.

Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren erfordert neben der Bindung von Glutamat eine zusätzliche Depolarisation der postsynaptischen Plasmamembran sowie die gleichzeitige Bindung von Glycin. Wenn diese Bedingungen erfüllt sind, kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und der Öffnung eines Ionenkanals. Natrium- und Calciumionen können in die Zelle einströmen und führen damit zur Erregung der Nervenzellmembran [41, 42].

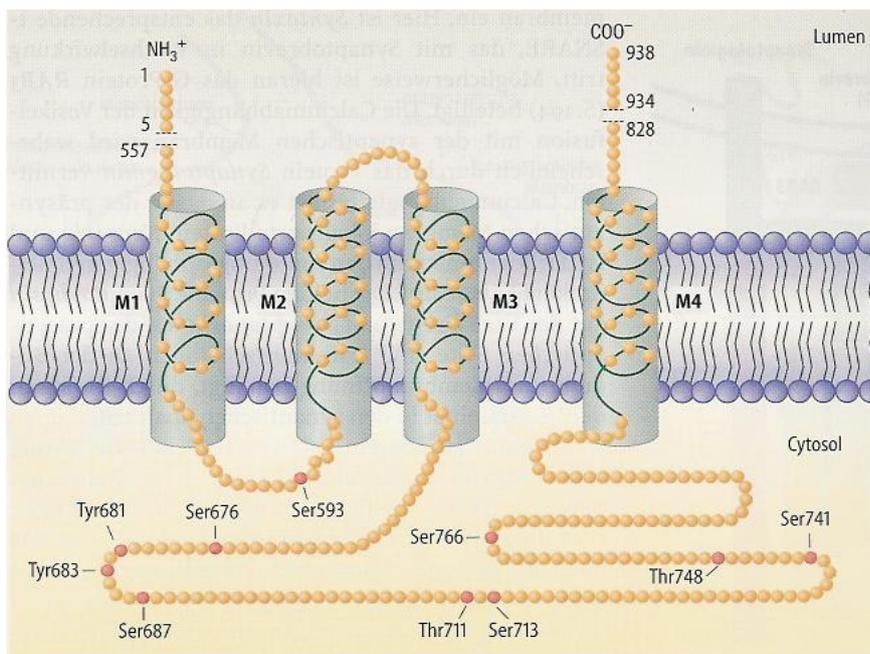


Abb. 1.7: Darstellung des Glutamat (NMDA)-Rezeptors (nach Löffler und Petrides 2007 [42])

NH₃ (Ammoniak), Ser (Serin), Tyr (Tyrosin), Thr (Threonin), CoO (Cobaltoxid); M1-M4 (Transmembrandomänen)

NMDA-Rezeptoren sind an der Gehirnentwicklung, der synaptischen Plastizität und der Gedächtnisbildung entscheidend beteiligt [42]. Es besteht eine entwicklungsabhängige Regulation der Untereinheiten des NMDA-Rezeptors, was zu unterschiedlichen Antworten des Rezeptors führt. Neonatale NMDA-Untereinheiten setzen sich zu einem großen Prozentsatz aus NR2B und NR2D Untereinheiten zusammen [4]. Während der

Synaptogenese führt eine exzessive Stimulation von NMDA-Rezeptoren zu einer verstärkten exzitotoxischen Neurodegeneration, während eine mangelnde Stimulation von NMDA-Rezeptoren zu einer apoptotischen Neurodegeneration führt [18]. Die NMDA-Rezeptoren reagieren in der Phase des rapiden Hirnwachstums hypersensitiv und verändern in dieser Phase ihr Verteilungsmuster und ihre Sensitivität [18]. Die exzitotoxische Läsion, welche durch die direkte Applikation von NMDA in das Striatum der sieben Tage alten Ratte produziert wurde, ist 21-fach höher als bei der erwachsenen Ratte [48]. Durch eine Blockade der NMDA-Rezeptoren für einige Stunden während der Synaptogenese kann die apoptotische Neurodegeneration massiv erhöht werden [10, 12, 48]. Eine chronische NMDA-Rezeptor-Blockade im unreifen Neuron aktiviert apoptotische Vorgänge und führt zu einem neuronalen Untergang [4].

1.3.3.3 Der nicotinische Acetylcholin-Rezeptor

Der nicotinische Acetylcholin-Rezeptor ist ein Glykoprotein aus vier verschiedenen Untereinheiten ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$), welche zu einem transmembranösen Pentamer ($\alpha_2, \beta, \gamma, \delta$) assoziiert sind. Jede Untereinheit besteht aus vier hydrophoben membrandurchdringenden Domänen (M1-M4). Die Abbildung 1.8 zeigt den molekularen Aufbau des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors.

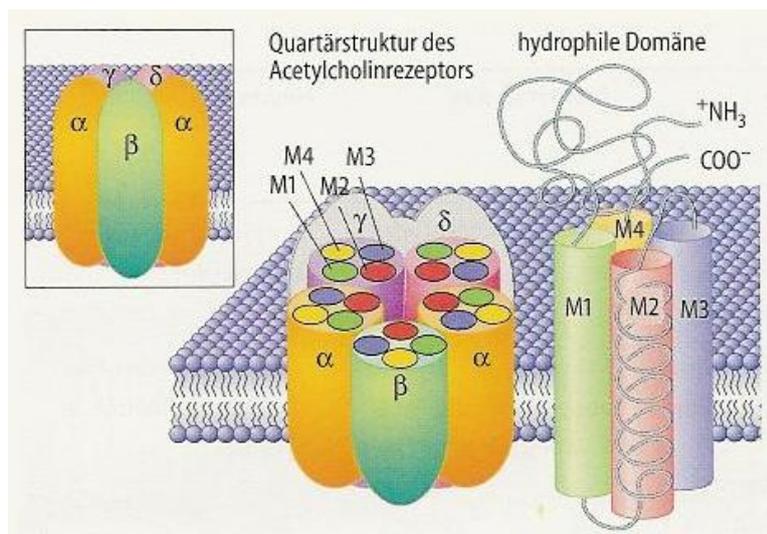


Abb. 1.8: Molekularer Aufbau des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors (nach Löffler und Petrides 2007 [42])

Der Rezeptor besteht aus 5 Untereinheiten, die als Zylinder dargestellt sind ($\alpha, \beta, \gamma, \delta$). Jede Untereinheit besteht aus vier hydrophoben Helices M1-M4.

Propofol wirkt als leichter Acetylcholin-Rezeptor-Antagonist [8]. Sieben verschiedene α -Untereinheiten ($\alpha 1$ - $\alpha 7$) führen zur Assoziation verschiedener Acetylcholin-Rezeptor-Isoformen im Nervensystem und im Muskel. Die Bindung von Acetylcholin an den Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung und damit zur Öffnung eines Natriumkanals. Es kommt zur Depolarisation der postsynaptischen Membran [42].

1.3.3.4 Der Glycin-Rezeptor

Glycin ist der wesentliche inhibitorische Transmitter im Rückenmark und im Stammhirn. Der Glycin-Rezeptor ist ein Neurotransmitter regulierter Chloridionenkanal. Propofol wirkt als Glycin-Rezeptor-Agonist [8].

Der Rezeptor wird von einem Pentamer mit vier Transmembransegmenten gebildet. Die Aktivierung des Glycin-Rezeptors führt zu einem Einstrom von Chloridionen ins Cytosol und damit zur Hyperpolarisation der Zellmembran [42].

1.3.4 Wirkungen

Die Hauptwirkung von Propofol ist der dosisabhängige hypnotische Effekt. Vorteile bei einer Narkose mit diesem Medikament sind die gute Steuerbarkeit [38], das angenehme Einschlafen und Aufwachen, sowie das seltenere Auftreten von postanästhetischer Übelkeit und Erbrechen [39]. Des Weiteren führt Propofol zur Abnahme des zerebralen Sauerstoffverbrauchs, reduziert den intrakraniellen Druck und hat eine antikonvulsive Wirkung [36]. In der Literatur wird außerdem beschrieben, dass dieses Medikament ein wirkungsvolles Antioxidant ist, antiinflammatorische Eigenschaften besitzt [36] und den intraokulären Druck senkt [49, 50].

Diese Wirkungen von Propofol führen dazu, dass es nicht nur wie oben beschrieben als intravenöses Allgemeinanästhetikum und zur Sedierung eingesetzt wird, sondern zunehmend auch beim Management von Schädel-Hirn-Trauma, beim Status epilepticus, beim Delirium tremens, beim Status asthmaticus und bei kritisch kranken septischen Patienten [36].

1.3.5 Nebenwirkungen

Häufige Nebenwirkungen von Propofol sind die Atemdepressionen bis hin zur Apnoe und die dosisabhängige Senkung des Blutdrucks durch einen verminderten peripheren

Gefäßwiderstand [34, 35, 39]. Während der Injektion kann es durch die Reizung der Venenwand lokal zu Schmerzen kommen [35, 39].

In Einzelfällen kann es auch zu Euphorie, Hypertonie, Flush, Singultus, Bradykardie, Tachykardie, Arrhythmien, Asystolie, Kältegefühl und Hyperventilation kommen [35]. Während der Narkoseeinleitung werden häufig leichte Exzitationssymptome (Spontanbewegungen, Muskelzuckungen) beobachtet [35]. Selten zeigen sich epileptiforme Anfälle einschließlich Opisthotonus [35]. In einer klinischen Studie zeigten sich bei 0,2% aller Patienten Hautveränderungen im Sinne einer allergischen Reaktion [51]. In Einzelfällen kam es zu schweren anaphylaktischen Reaktionen mit Quincke-Ödem und Bronchospasmus [35].

Beim prolongierten Einsatz von Propofol kommt es regelmäßig zum Anstieg der Triglyzeride, welcher durch die notwendige Trägersubstanz verursacht wird [34, 36]. Eine ausgeprägte Hypertriglyzeridämie kann zu Cholestase, Hypothyreose und letztlich auch zum nephrotischen Syndrom führen [36].

In einigen Fällen wurde vom sogenannten Propofol-Infusionssyndrom berichtet, welches hauptsächlich bei schwer kranken Kindern unter einer Langzeitsedierung mit Propofol beobachtet wurde. Pathophysiologisch vermutet man, dass eine durch Propofol induzierte Hemmung der Fettsäureoxidation und eine Störung der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien durch die Entkoppelung der Atmungskette zu einem intrazellulären Energiedefizit mit einer Laktatazidose und Muskelnekrose führt. Weitere Symptome sind kardiovaskuläre Störungen mit Blockierung der Atrioventrikuläre-Überleitung und ein akutes Nierenversagen, so dass ein großer Teil der Betroffenen verstirbt [52]. Es existieren verschiedene Theorien zur Auslösung des Propofol-Infusionssyndroms. Wesentlicher Faktor ist die hochdosierte und langfristige Applikation von Propofol. Da hauptsächlich Kinder betroffen sind, wird diskutiert, dass Kinder in der Frühphase der intensivmedizinischen Behandlung häufig keine ausreichende Kalorienzufuhr erhalten und bei entsprechender Disposition die Umstellung auf den Fettabbau das Propofol-Infusionssyndrom auslöst [53]. Propofol sollte bei der längerfristigen Sedierung nur kontrolliert und mit Vorsicht eingesetzt werden, das heißt weniger als 4 mg pro kg und Stunde und maximal über sieben Tage [53]. Bei Kindern und Jugendlichen unter 16 Jahren ist Propofol nicht zur Sedierung im Rahmen einer Intensivbehandlung zugelassen [35].

1.4 Erythropoietin

Erythropoietin ist ein essentieller Wachstums- und Überlebensfaktor für erythroide Vorläuferzellen. Die Bindung an spezifischen Oberflächenrezeptoren führt zu einer Proliferation und Ausreifung von Blutvorläuferzellen. Dieses Hormon ist ein Glykoprotein, welches aus 166 Aminosäuren besteht, an die vier Kohlenhydratketten gebunden sind. Das Gewicht von Erythropoietin beträgt ca. 34 kDa, wovon ca. 60% auf die Aminosäuren fallen und 40% auf die Kohlenhydrate [41, 42]. Die Sekundär- und Tertiärstruktur wird durch fünf Helices mit zwei Disulfidbrücken gebildet. Ein Absinken des O₂-Partialdruckes führt zu einer Steigerung der Erythropoieserate. Bei einer Hypoxie hängt die Bildung von Erythropoietin von HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*) ab [54, 55].

1.4.1 Der Erythropoietinrezeptor

Der Rezeptor setzt sich aus einer extrazellulären Domäne, einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Domäne zusammen und gehört zur Klasse der Typ 1-Superfamilie von Zytokinrezeptoren. Eine Aktivierung des Rezeptors führt zu einer Änderung der Konformation des Rezeptors und zu einer Homodimerisation. Über verschiedene Zwischenschritte kommt es zu einer Phosphorylierung von Tyrosinresten des Rezeptors, welche dann als Bindungsstelle für diverse Signaltransduktionsmoleküle dienen [56].

1.4.2 Erythropoietin im Gehirn

Die Produktion von Erythropoietin und die Expression des Rezeptors konnten auch im menschlichen Gehirn auf Astrozyten und Neuronen gezeigt werden. Die Anzahl und die Verteilung der Erythropoietinrezeptoren und die Menge des Erythropoietin verändert sich im sich entwickelnden menschlichen Gehirn. In der zehnten Woche nach der Konzeption wird Erythropoietin hauptsächlich in der ventrikulären und subventrikulären Zone nachgewiesen. Postnatal sind Astrozyten und Neuronen immunreaktiv auf Erythropoietin und dessen Rezeptor [57]. Ein Sauerstoffmangel führt auch im Gehirn zu einem Anstieg der Erythropoietinkonzentration [31, 58]. Ein fokaler ischämischer Hirnschaden in Mäusen führte zu einer signifikanten Steigerung der Expression von

Erythropoietin und Erythropoietinrezeptoren in Neuronen, Astrozyten und Endothelzellen [59]. Auch beim Menschen führte ein ischämischer Hirninfarkt zu einer verstärkten Expression von Erythropoietin und dessen Rezeptor in Astrozyten und Endothelzellen [54].

1.4.3 Neuroprotektive Wirkung von Erythropoietin

Bei Mäusen und Ratten konnte durch den Verschluss der Arteria cerebri media ein ischämischer Hirninfarkt simuliert werden. Das Volumen dieses Infarktes konnte durch die zusätzliche intraventrikuläre Applikation von Erythropoietin signifikant reduziert werden [59, 60]. Erythropoietin kann nach einer systemischen Applikation, insbesondere bei einer unreifen oder geschädigten Blut-Hirn-Schranke, relevante Konzentrationen im Gehirn erreichen [61]. Ein neuronaler Zelltod durch Hypoxie, Hypoglykämie oder Exzitotoxizität lässt sich durch die systemische Gabe von Erythropoietin deutlich vermindern [31, 32, 62]. Eine bei sieben Tage alten Ratten durch den NMDA-Rezeptor-Antagonisten Dizocilpin (MK 801) induzierte kortikale und thalamische Apoptose konnte durch die systemische Applikation von rekombinantem Erythropoietin reduziert werden [63].

In Deutschland und den USA ist Erythropoietin zur Prophylaxe und Therapie der Frühgeborenenanämie zugelassen und wird über mehrere Monate ohne Nebenwirkungen eingesetzt. Es stellt sich die Frage, ob Erythropoietin prophylaktisch als Neuroprotektivum eingesetzt werden kann.

1.5 Fragestellung der Arbeit

In den letzten Jahrzehnten konnten große Fortschritte in der Neonatologie gemacht werden, so dass ein vermehrtes Überleben von Frühgeborenen und Neugeborenen erreicht werden konnte. Ein Teil dieser Kinder leidet unter neurologischen Auffälligkeiten mit motorischen und kognitiven Defiziten. Radiologische Untersuchungen konnten ein vermindertes Volumen der grauen Substanz zeigen [64, 65].

Verschiedene Ursachen wie zum Beispiel Hypoxie, Ischämie und Infektionen werden diskutiert. Aber auch externe Noxen, wie der Konsum von Ethanol in der Schwangerschaft, können eine weitverbreitete Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn auslösen [16].

Untersuchungsergebnisse von J.W. Olney et al. [9] und Ikonomidou et al. [11] zeigen, dass dafür zwei Mechanismen, die Blockade von NMDA-Rezeptoren und die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren, verantwortlich sind. Die Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren im sich entwickelnden Rattengehirn während der Synaptogenese triggert die apoptotische Neurodegeneration. Auch durch eine Blockade der NMDA-Rezeptoren für einige Stunden während der Synaptogenese kann die apoptotische Neurodegeneration massiv erhöht werden. GABA_A-Agonisten und NMDA-Antagonisten führen zu unterschiedlichen Mustern der apoptotischen Neurodegeneration. Wenn man die verschiedenen Muster übereinander legt, ähnelt das Muster dem, welches durch Ethanol induziert wird [10, 11]. Agentien, welche über diese Mechanismen wirken, führen zu einer dosisabhängigen Neurodegeneration. Stoffe, welche agonistisch oder antagonistisch auf den Dopaminrezeptor oder hemmend auf Acetylcholinrezeptoren wirken, führten zu keiner nennenswerten Neurodegeneration [9, 11].

Die Hirnwachstumsphase des Menschen geht vom sechsten Schwangerschaftsmonat bis zum dritten Lebensjahr nach der Geburt. In dieser Phase reagiert das sich entwickelnde Gehirn sehr empfindlich auf externe Noxen. Während dieser Zeit werden sich entwickelnde Gehirne zum Teil NMDA-Antagonisten und/oder GABA_A-Agonisten ausgesetzt [11, 19]. GABA-Agonisten und/oder NMDA-Antagonisten werden als Antikonvulsiva, Sedativa oder Anästhetika auch in der Pädiatrie benutzt. Da Anästhetika über die beiden Mechanismen wirken stellt sich die Frage, ob eine Behandlung mit diesen Medikamenten während der Hirnwachstumsphase zu einer erhöhten apoptotischen Neurodegeneration führt [9, 11].

Für antiepileptische Medikamente, welche über die Blockierung spannungsabhängiger Natriumkanäle als GABA-Agonisten oder NMDA-Antagonisten wirken, konnte in tierexperimentellen Studien eine dosisabhängige, erhöhte apoptotische Neurodegeneration nachgewiesen werden, wenn diese Medikamente in der Phase des rapiden Hirnwachstums appliziert wurden [17].

Es konnte auch gezeigt werden, dass es nach der Applikation von Midazolam, Lachgas und Isofluran bei sieben Tage alten Ratten zu einem ausgeprägten Verlust von Neuronen sowie persistierenden Gedächtnis- und Lerndefiziten kommt [66]. Die in dieser Untersuchung verwendeten Medikamente haben jedoch in der heutigen Kinderanästhesie nur noch eine untergeordnete Bedeutung. Entgegen den experimentellen Ergebnissen dieser Studie von Jevtovic-Todorovic et al. konnte in einer klinischen Langzeitstudie gezeigt werden, dass Opioide in der Neonatalperiode keine negativen Effekte auf Intelligenz, motorische Funktion und Verhalten haben [67].

In der klinischen Praxis der modernen Kinderanästhesiologie und Kinderintensivmedizin wird häufig eine Kombination von GABA_A-agonistischen und NMDA-antagonistisch wirkenden Medikamenten eingesetzt. Propofol wirkt hierbei sowohl GABA_A-agonistisch als auch NMDA-antagonistisch [8].

In einer experimentellen Studie von Dzierko et al. konnte gezeigt werden, dass die Applikation von rekombinantem Erythropoietin bei sieben Tage alten Ratten, die durch den NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK801 induzierte kortikale und thalamische Apoptose durch die Wiederherstellung neutropin-assoziiertes Signalwege reduzieren kann [63].

Aus den vorliegenden Ergebnissen wissenschaftlicher Untersuchungen ergeben sich für die vorliegende Arbeit folgende Fragen:

- Hat Propofol im sich entwickelnden Gehirn der Ratte neurodegenerative Effekte?
- Ist diese Wirkung von Propofol dosisabhängig?
- Ist diese Wirkung von Propofol altersabhängig?
- Kann die neurodegenerative Wirkung von Propofol durch die Gabe von Erythropoietin beeinflusst werden?

2. Material und Methoden

2.1 Tierversuche: Tiere, Injektionen, ethische Richtlinien

Die Versuche wurden an Wistar-Ratten durchgeführt, welche das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV) lieferte. Die Tierversuche wurden am 02.09.2004 vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (die Genehmigungsnummer: G 0144/04). Die Durchführung erfolgte in Übereinstimmung mit den Richtlinien zu Tierversuchen der Society for Neuroscience (Society for Neuroscience, Policy on Ethics).

Für die Versuche wurden hauptsächlich sechs Tage alte Ratten verwendet, für eine Altersstudie auch 3 und 21 Tage alte Tiere. Pro Versuch wurde ein Wurf verwendet, so dass die Versuchs- und Kontrolltiere Wurfgeschwister waren und gemeinsam unter den gleichen Bedingungen gehalten wurden. Die Tiere wurden vor dem jeweiligen Versuch blind in Versuchs- und Kontrolltiere eingeteilt, gewogen und mit Zahlen markiert. Die zu testenden Substanzen, Propofol und Erythropoietin wurden aufgrund des geringen Körpergewichts der Ratten (ca. 10-15 g am 6. Lebenstag) intraperitoneal injiziert. Zunächst erfolgte eine Dosisfindung mit einer intraperitonealen Einmalgabe verschieden konzentrierter Propofollösungen. Für eine längerfristige Narkose erfolgte eine weitere Dosisfindung mit drei aufeinanderfolgenden Propofolinjektionen zu den Zeitpunkten 0, 90 und 180 Minuten. Für die Propofollösung wurde Propofol Ratiopharm (Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) mit isotoner Kochsalzlösung 0,9% (Braun, Ingelheim, Deutschland) verdünnt. Um die Menge der Versuchstiere zu reduzieren, wurden die Kontrolltiere gemischt mit Kontrolltieren einer weiteren Untersuchung zur neurodegenerativen Wirkung von inhalativen Anästhetika. Deshalb wurde bei den Kontrolltieren keine Scheininjektion durchgeführt.

Alle Jungtiere (Versuchstiere und Kontrolltiere) waren während des gesamten Versuches von der Mutter getrennt. Um eine Hypothermie zu verhindern, befanden sich die Tiere während des Versuches auf einer Wärmeplatte (37,5°C). Nach 120 min bekamen alle Jungtiere eine subkutane PÄD II-Injektion (Fresenius-Kabi, Bad Homburg, Germany) in den Nacken, um eine Hypoglykämie und Hypovolämie zu verhindern. Regelmäßig wurden das Hautkolorit und die Atemfrequenz bestimmt, um so eine Apnoe oder eine Hypoxie zu bemerken. Wenn die Tiere eine Bradyпноe mit einer Atemfrequenz < 40% der Ausgangsfrequenz zeigten, wurde ein Schmerzreiz gesetzt.

Wenn sich daraufhin die Atemfrequenz nicht besserte oder eine Reanimation nötig war, wurden diese Tiere von der weiteren Analyse ausgeschlossen. Erst wenn die Tiere wieder richtig wach waren (ca. sechs Stunden nach Versuchsbeginn), wurden sie zurück zur Mutter gesetzt.

Die zusätzlich mit Erythropoietin beta (Hoffmann-La Roche AG, Deutschland) behandelten Tiere erhielten 15 Minuten vor der ersten Propofolapplikation eine Erythropoietinlösung intraperitoneal injiziert. Dazu wurde Erythropoietin beta mit isotoner Kochsalzlösung 0,9% verdünnt und in verschiedenen Dosierungen verabreicht.

2.2 Durchgeführte Versuche

2.2.1 Dosisfindung

Sechs Tage alten Ratten wurde zur Dosisfindung eine verschieden stark konzentrierte Propofollösung einmalig intraperitoneal appliziert. In der Literatur fanden sich sehr unterschiedliche Angaben zur Dosis, welche jedoch deutlich über den Dosen in der Humanmedizin lagen [68, 69, 70, 71, 72, 73]. Wir entschieden uns zunächst für die einmalige Gabe von 25, 50 oder 75 mg Propofol pro Kilogramm Körpergewicht. Den Kontrolltieren wurde kein Medikament injiziert.

Tabelle 2.1: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Dosisfindung

	Narkose- dauer	Alter Injektionstag	Anzahl Versuchstiere	Anzahl Kontrollen	Färbung
Propofol: 1 x 25 mg/kgKG i.p.	2 h	6 d	4		Silber- färbung
Propofol: 1 x 50 mg/kgKG i.p.	2 h	6 d	5		Silber- färbung
Propofol: 1 x 75 mg/kgKG i.p.	2 h	6 d	3		Silber- färbung
Kontrollen		6 d		4	Silber- färbung

2.2.2 Dosisabhängigkeit

Den Versuchstieren wurde am sechsten Lebenstag repetitiv eine verschieden stark konzentrierte Propofollösung intraperitoneal appliziert. Die Injektion erfolgte nach 0, 90 und 180 Minuten. Den Kontrolltieren wurde kein Medikament injiziert.

Tabelle 2.2: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Dosisabhängigkeit

	Narkose- dauer	Alter Injektionstag	Anzahl Versuchstiere	Anzahl Kontrollen	Färbung
Propofol: 3 x 10 mg/kgKG i.p.	6 h	6 d	7		Silber- färbung
Propofol: 3 x 20 mg/kgKG i.p.	6 h	6 d	7		Silber- färbung
Propofol: 3 x 30 mg/kgKG i.p.	6 h	6 d	24		Silber- färbung
Kontrollen		6 d		10	Silber- färbung

2.2.3 Altersabhängigkeit

Den Ratten wurde im Alter von 3, 6 und 21 Tagen 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Die Injektion erfolgte nach 0, 90 und 180 Minuten. Den Kontrolltieren wurde kein Medikament injiziert.

Tabelle 2.3: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Altersabhängigkeit

	Narkose- dauer	Alter Injektionstag	Anzahl Versuchstiere	Anzahl Kontrollen	Färbung
Propofol: 3 x 30 mg/kgKG i.p.	6 h	3 d	5		TUNEL- Färbung
Kontrollen		3 d		2	TUNEL- Färbung
Propofol: 3 x 30 mg/kgKG i.p.	6 h	6 d	24		Silber- färbung

Kontrollen		6 d		10	Silberfärbung
Propofol: 3 x 30 mg/kgKG i.p.	6 h	21 d	8		Silberfärbung
Kontrollen		21 d		5	Silberfärbung

2.2.4 Einfluss von Erythropoietin auf die Wirkung von Propofol

Um zu untersuchen, ob die Gabe von Erythropoietin zu einer Reduktion der neurodegenerativen Wirkung von Propofol führt, erhielten die Ratten im Alter von sechs Tagen 15 Minuten vor der ersten Propofolapplikation 5.000 oder 20.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht. Danach erhielten die Tiere 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht. Die Vergleichstiere erhielten nur 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht.

Tabelle 2.4: Übersicht über die durchgeführten Experimente zum Einfluss von Erythropoietin auf die Wirkung von Propofol

	Narkosedauer	Alter Injektionstag	Anzahl Versuchstiere Erythropoietin + Propofol	Anzahl Versuchstiere Propofol	Färbung
Propofol: 3 x 30 mg/kgKG i.p.	6 h	6 d		24	Silberfärbung
Erythropoietin: 5.000 IE/kgKG + Propofol: 3 x 30 mg/kgKG i.p.	6 h	6 d	15		Silberfärbung
Erythropoietin: 20.000 IE/kgKG + Propofol: 3 x 30 mg/kgKG i.p.	6 h	6 d	13		Silberfärbung

2.3 Perfusion und Gewebepräparation

Die Perfusion der Versuchstiere erfolgte 24 h nach der ersten Injektion von Propofol bzw. nach dem Versuchsbeginn. Die Tiere wurden gewogen und mit einer Überdosis Chloralhydrat (Braun, Ingelheim, Deutschland) getötet. Dazu wurde ihnen intraperitoneal 0,1 ml Chloralhydrat 10% pro 10 g Körpergewicht verabreicht.

Nach der Eröffnung des Thorax wurde eine stumpfe Butterflykanüle durch die linke Herzkammer in die Aorta vorgeschoben und festgeklemmt. Um den Abfluss der Flüssigkeit zu gewährleisten, wurde der rechte Vorhof eröffnet. Über die Butterflykanüle erfolgte die Gabe von 20 ml 4°C kaltem heparinisierten PBS (phosphate buffered saline) mit Heparin als Bolus. Dafür wurden 100 IE Heparin (Thrombophob 25.000, Heparin-Natrium; Nordmark Arzneimittel GmbH 25436 Uetersen; Germany) auf 100 ml PBS (10-fach Konzentrat: 70 ml monobasisches 1 M Na-Phosphat, NaH_2PO_4 , Sigma S-9638; 330 ml dibasisches 1 M Na-Phosphat, Na_2HPO_4 , Sigma S-0876 St. Louis, MO. USA und 180 g NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Direkt im Anschluss erfolgte die Perfusion mit einem Bolus von 20 ml 4%iger Paraformaldehydlösung in Cacodylatpuffer [2 Liter 10%ige Stammlösung: 100 g Paraformaldehyd (Merck, Darmstadt, Deutschland) wurden in 800 ml auf 60°C erhitztem Aqua bidest. mit 2 Pellets NaOH (Merck, Darmstadt, Deutschland) gelöst, auf Raumtemperatur abgekühlt, auf pH 7,5 titriert und mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt; für die 4%ige Lösung wurden 800 ml der Stammlösung mit 18 g NaCl und 2 g Natrium-Cacodylat (Sigma C-0250 St. Louis, MO. USA) versetzt und auf 2 l aufgefüllt (pH=7,4)]. Abgeschlossen wurde die Perfusion durch eine ca. zehnmütige Tropfinfusion, ebenfalls mit 4°C kaltem Paraformaldehyd in Cacodylatpuffer.

Die fixierten Gehirne wurden vorsichtig aus dem Schädel herauspräpariert und für mindestens drei Tage in der 4% Paraformaldehydlösung in Cacodylatpuffer nachfixiert.



Abb. 2.1: Gehirn einer sechs Tage alten Ratte nach Fixation und Präparation aus dem Schädel

Danach erfolgte der Grobschnitt. Das Gehirn wurde unter Ausschluss des Riechhirns und des Kleinhirns in zwei koronare Teile geteilt und danach noch einmal für mindestens drei Tage in der oben genannten Fixationslösung (4% Paraformaldehydlösung in Cacodylatpuffer) gelagert.

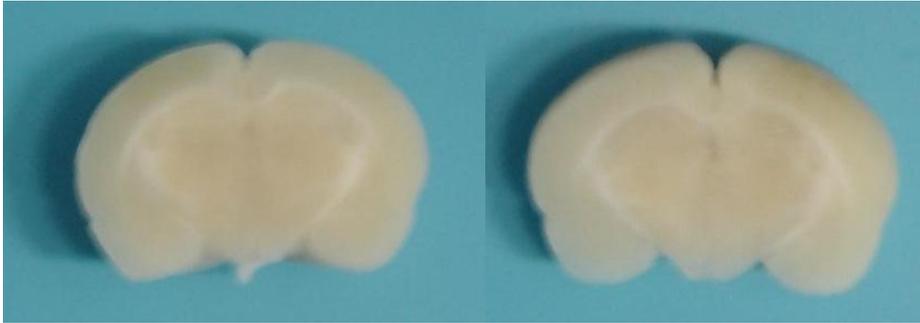


Abb. 2.2: koronare Grobschnitte, links vordere Hirnhälfte, rechts hintere Hirnhälfte

2.4 Einbettung und Schnitte für die De Olmos Kupfer-Silberfärbung

Danach wurden die zwei Hirnhälften zum Trocknen auf Papier gelegt und anschließend in angefrorene Petrischalen überführt, um dann in ca. 40°C warmem, 4%iger Agar (20 g Agar-Puder, Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA; in 500 ml Aqua bidest. aufgekocht) eingebettet zu werden. Nach der Verfestigung des Agar wurden die Präparate in rechteckigen Agar-Blöcken ausgeschnitten.

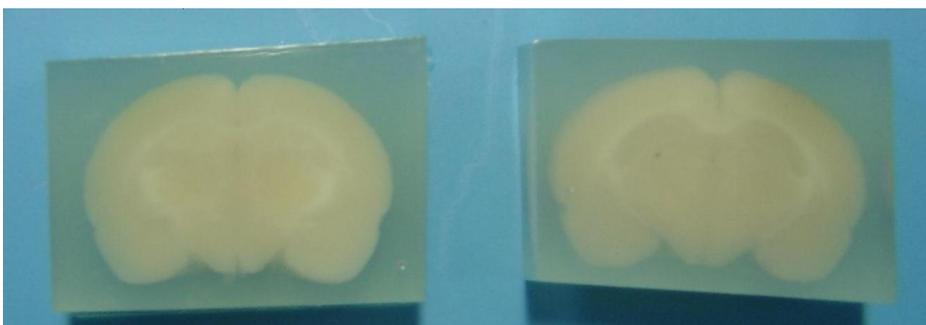


Abb. 2.3: Grobschnitte in Agar-Blöcken, links die vordere Hirnhälfte, rechts die hintere Hirnhälfte

Diese Blöcke wurden auf die Präparierteller des Rotationsvibrators (Leica, VT 1000 S, Nussloch, Deutschland) aufgeklebt, und konnten so koronar in 70µm dünne Scheiben geschnitten werden. Circa jeder fünfte Schnitt wurde für die Silberfärbung ausgewählt und zum Fixieren für mindestens drei Tage in Zellkulturenplatten (24-well-Platten;

Falcon, Beston Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ. USA), die mit 4%iger Paraformaldehydlösung in Cacodylatpuffer gefüllt waren, gelagert. So ergaben sich pro Tier zwölf Hirnschnitte für die Silberfärbung. Die übrigen Schnitte wurden in PBS-Azid (100 ml des zehnfach-Konzentrates mit 0,05 % Na-Azid NaN_3 , Sigma S-8032 St. Louis, MO. USA; versetzt und mit Aqua bidest. auf 1 Liter aufgefüllt) bei 4°C gelagert.

2.5 De Olmos Kupfer-Silberfärbung

Mit der De Olmos Kupfer-Silberfärbung können degenerierte Neurone dunkelbraun bis schwarz angefärbt werden und heben sich so deutlich vom goldgelben Hintergrund ab [74]. Die Silberfärbung wurde erstmalig von C. Golgi beschrieben.

Bei geschädigten Neuronen wird die Zellmembran durchlässig, so dass das Silbersalz mit dem Axoplasma von degenerierenden Neuronen reagieren kann. Die verwendeten Gefäße müssen dazu möglichst frei von Anionen sein. Dies wurde durch Einweichen aller Glasgefäße in rauchender Salpetersäure für 15 min erreicht. Anschließend wurden die Gefäße gründlich mit Aqua bidest. ausgespült.

Mit der De Olmos Kupfer-Silberfärbung allein kann keine Aussage zum Pathomechanismus der neuronalen Degeneration gemacht werden [14]. Da diese Färbung aber kostengünstig und leicht durchzuführen ist, eignet sie sich gut als Screeningmethode. Zum eindeutigen Beweis der Apoptose sind weitere Untersuchungen wie die Caspase-Färbung und die Elektronenmikroskopie notwendig. Inzwischen wurden allerdings auch caspaseunabhängige Apoptoseformen beschrieben [75].

Die Hirnschnitte eines Tieres wurden in eine mit Aqua bidest. gefüllte Petrischale überführt und dreimal in Aqua bidest. gewaschen. Darauf erfolgt die Inkubation mit einer Kupfer-Silberlösung. Für diese Lösung wurden 180 ml Aqua bidest. auf 40°C erwärmt und danach wurden unter Rühren 1,5 g Silbernitrat AgNO_3 (Roth 9370.3; Karlsruhe, Deutschland), 3 ml 0,5%ige Kupfernitratlösung CuNO_3 (Sigma C-6176; St. Louis, MO. USA), 15 ml 0,1%ige Allantoinlösung (Sigma A-7878; St. Louis, MO. USA), 9 ml Boratpuffer (ICN Biomedicals Inc., Ohio, USA), 17 ml Ethanol absolut (Baker 8006, Deventer, Holland) und 9 ml Pyridin (Sigma P-3776; St. Louis, MO. USA) hinzugefügt. Die Lösung wurde gefiltert. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln, erst eine Stunde im Wärmeschrank bei 40°C und dann 48 bis 72 Stunden bei Raumtemperatur. Nach einer zweifachen Reinigung mit reinem Aceton (Baker 8002, Deventer, Holland) erfolgte die Inkubation mit einer Silber-Diamin-Lösung für 35 Minuten. Diese Lösung setzte sich aus

24 g Silbernitrat AgNO_3 , 120 ml Aqua bidest, 60 ml 0,4%ige Natronlauge (NaOH) und 30 ml Ammoniumhydroxid (NH_4OH , Sigma A-6899; St. Louis, MO. USA) zusammen. Unter Agitation wurden die Schnitte in einer ethanolischen Lösung von Formaldehyd und Zitronensäure reduziert. Diese Lösung bestand aus 135 ml Aqua bidest, 15 ml Ethanol absolut, 180 μl 37%ige Formaldehydlösung (Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland) und 10,5 mg Zitronensäure (Sigma C-0759; St. Louis, MO. USA). Die Schnitte wurden dadurch dunkelbraun. Die Schnitte wurden anschließend zweimal mit Aqua bidest. gewaschen, bevor sie einzeln mit einer 0,3%igen Kaliumferrizyanidlösung (0,45 g K_3FeCN_6 , Sigma P-8131; St. Louis, MO. USA in 150 ml Aqua bidest.) gebleicht wurden. Nach diesem Schritt waren die Schnitte bernsteinfarben. Danach wurden die Schnitte wieder zweimal mit Aqua bidest. gewaschen. Die Stabilisierung des Färbeergebnisses erfolgte über exakt eine Minute mit 0,1%iger Natriumthiosulfatlösung (0,2 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, Sigma S-7026; St. Louis, MO. USA in 200 ml Aqua bidest.). Beendet wurde die Färbung mit einem dreimaligen Waschen der Schnitte mit Aqua bidest.

Die Hirnschnitte wurden danach mit Hilfe eines Gelatine-Mediums auf Objektträger aufgebracht. Für das Gelatine-Medium wurden 1,5 g Gelatine (Electron Microscopy Sciences, FT. Washington, USA) in 250 ml Aqua bidest. auf 50°C erhitzt. Nach dem Abkühlen wurden 0,15 g Kalium-Chrom-Sulfat (Sigma P-8131; St. Louis, MO. USA) hinzugefügt und die Lösung mit Aqua bidest. auf 500 ml aufgefüllt. Danach erfolgte die Dehydratation der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe. Zum Abschluss wurden die Präparate mit Hilfe von Permunt Medium (Electron Microscopy Sciences, FT. Washington, USA) mit Deckgläsern (Menzel, Microm, Walldorf, Deutschland) versehen.



Abb. 2.4: coronare Schnitte der vorderen Hirnhälfte auf einem Objektträger, nach der Silberfärbung



Abb. 2.5: coronare Schnitte der hinteren Hirnhälfte auf einem Objektträger, nach der Silberfärbung

2.6 Einbettung und Schnitte für die TUNEL-Färbung

Die Versuchstiere sind wie oben beschrieben 24 Stunden nach der ersten Injektion getötet und transkardial perfundiert worden. Die fixierten Gehirne wurden vorsichtig aus dem Schädel herauspräpariert und für mindestens fünf Tage in der 4%igen Paraformaldehydlösung mit 2% Cacodylatpuffer nachfixiert. Nach dem Grobschnitt wurden die Gehirnhälften noch einmal für mindestens fünf Tage in der Fixationslösung gelagert. Anschließend erfolgte die Paraffineinbettung. Dafür mussten die Gehirne zunächst unter fließendem Leitungswasser für zwei bis drei Stunden bei Raumtemperatur gewaschen werden. Danach erfolgte die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (drei bis vier Stunden bei Raumtemperatur in Ethanol 70%, dann über Nacht bei Raumtemperatur in Ethanol 80%, danach eine Stunde bei 40°C in Ethanol 96% und dann drei Stunden bei 40°C in Ethanol 100%). Anschließend kamen die Gehirne für eine Stunde bei 60°C in ein Ethanol 100% / Chloroform-Gemisch (Mischungsverhältnis 1:1) und abschließend für zwei Stunden bei 40°C in ein Chloroformgemisch. Die eigentliche Imprägnierung mit flüssigem Paraffin begann mit einem Paraffinbad für eine Stunde und dann in einem weiteren Paraffinbad für eine Nacht, jeweils bei 60°C. Am nächsten Tag fand die endgültige Einbettung statt. Dazu wurde reines, flüssiges Paraffin auf 60°C erhitzt, in eine Form gegossen und jeweils eine Gehirnhälfte mit einer vorgewärmten Pinzette in dem flüssigen Paraffin positioniert. Danach konnte man das Paraffin bei Raumtemperatur erstarren lassen und dann die Paraffinblöcke in Form schneiden. Die so präparierten Gehirnhälften konnten am Rotationsmikrotom (Microm HM 360 Ser.-Nr.9790, Walldorf, Deutschland) in zehn µm dicke, koronare Schnitte geschnitten werden. Diese Schnitte wurden auf mit 3-Aminopropyltriethoxysilane beschichtete Objektträger (Super Frost Plus: R. Langenbrinck, Emmerdingen, Deutschland) aufgebracht.

2.7 TUNEL-Färbung

Als Charakteristisch für die Apoptose wurde die Fragmentierung der DNA in Segmente mit ca. 180 Basenpaaren bzw. vielfachen davon durch die Aktivierung von Endonucleasen beschrieben [29, 76]. Von Gavrieli et al. wurde 1992 die TUNEL-Färbung (*terminal transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling*) beschrieben, als eine histologische Methode um *in situ* den programmierten Zelltod darzustellen. Dies geschieht durch Enzyme, die mit den freien 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente reagieren [14, 77]. Eine apoptotische Zelle ist mit der TUNEL-Methode für ca. eine bis drei Stunden nachweisbar. Da es aber auch bei der Nekrose und bei der postmortalen Autolyse zu freien 3'-OH-Enden der DNA kommt, ist die TUNEL-Färbung nicht Apoptose-spezifisch [10, 78].

Zunächst mussten die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffinisiert werden. Die Färbung erfolgte mit dem ApopTag Peroxidase kit (S 7100, Oncor Appligene, Heidelberg). Zunächst fand eine Vorbehandlung der Schnitte mit der Proteinase K statt, und dann wurden die Schnitte mit Equilibrierungspuffer und TdT-Enzym (*terminal deoxynucleotyl Transferase*) für eine Stunde bei 37°C behandelt. Das TdT-Enzym markiert die freien 3'-OH-Enden der DNA, welche in apoptotischen Zellen besonders häufig vorkommen. Durch das TdT-Enzym kann dUTP (deoxy-Uridine-TriPhosphate) an die freien 3'-OH-Enden der DNA-Strangbrüche gebunden werden. Darauf erfolgte für 30 Minuten die Inkubation mit Anti-Digoxigenin-Peroxidase, welche danach bei der Reaktion mit dem DAB-Substrat (3,3'-Diaminobenzidine, Sigma) eine Farbänderung anzeigt. Eine leichte Gegenfärbung des Zytoplasmas wurde mit Methylgrün durchgeführt. Die TUNEL-positiven Zellen erscheinen dunkelbraun.

2.8 Morphometrie

Im infantilen Rattengehirn kommt es physiologisch zu apoptotischen Zelluntergängen. Um das Ausmaß der Apoptose zwischen Kontrolltieren und mit Medikamenten behandelten Tieren vergleichen zu können, ist eine genaue morphometrische Quantifizierung notwendig. Zur Dichtebestimmung der degenerierten Neuronen bei De Olmos und TUNEL gefärbten Hirnschnitten wurde die stereologische Dissektionsmethode (*unibased stereological dissector method*) nach Gundersen [79] verwendet. Zum Auszählen der Hirnschnitte wurde ein Lichtmikroskop (BX60 F-3 Olympus, Japan) mit integriertem Zählgitter im Okular verwendet. Der Zählrahmen war

0,05 mm x 0,05 mm groß und gab so die Ausdehnung in einer Ebene wieder. Die für ein Volumen benötigte dritte Dimension war die Dissektorhöhe (die Dicke der Schnitte). Diese betrug 0,07 mm bei den Schnitten der De Olmos Kupfer-Silberfärbung und 0,01 mm bei den Schnitten der TUNEL-Färbung. Bei jedem Tier wurden in jede auszuwertende Region zufällig vier bis fünf Raster gelegt. Dieser Schritt wurde bei jedem Tier in einem zweiten Hirnschnitt wiederholt, so dass in jeder Region acht bis zehn Raster ausgezählt wurden. Neuronen, die auf dem linken und unteren Rand des Rasters lagen, wurden nicht mitgerechnet. Der Zusatz „*stereological dissector*“ bei der Methode bedeutet, dass die Schnitte mit dem Mikroskop in verschiedenen Ebenen fokussiert wurden. In jeder einzelnen Region wurde die Summe der degenerierten Neuronen ausgezählt und entsprechend der Anzahl der Raster der Mittelwert gebildet. Unter Berücksichtigung der Rastergröße, der Schnittdicke und des Vergrößerungsfaktors konnte so die Anzahl der degenerierten Neuronen pro Kubikmillimeter für jede Region einzeln berechnet werden. Durch die Addition der Dichtewerte der einzelnen Hirnbereiche erhält man einen Gesamtscore für jedes Gehirn. So konnten Kontrolltiere und Versuchstiere mit Hilfe eines Wertes verglichen werden. Mögliche Fehlerquellen bei dieser Methode können durch eine extrem inhomogene Verteilung der zu zählenden Objekte und durch eine Schwellung oder Schrumpfung des Gesamtvolumens entstehen.

Die Auszählung der Präparate erfolgte blind. Die verschiedenen Hirnareale wurden mit Atlanten [80, 81] des sich entwickelnden Gehirnes der Ratte identifiziert. Initial wurden die Ergebnisse durch einen erfahrenen Untersucher kontrolliert.

Die folgenden 17 Hirnregionen wurden ausgewertet:

- frontaler Kortex (Lamina 2 und 4)
- Gyrus cinguli (Lamina 2 und 4)
- parietaler Kortex (Lamina 2 und 4)
- retrosplenialer Kortex (Lamina 2 und 4)
- laterodorsaler, mediodorsaler, ventraler Thalamus
- Nucleus caudatus
- Septum
- Hypothalamus
- Gyrus dentatus
- CA1
- Subiculum

2.9 Statistische Auswertung

Das Endresultat der Auszählung war die numerische Neuronendichte, das heißt die Anzahl der degenerierten Neuronen pro Kubikmillimeter. Für jede Versuchsgruppe wurden die 17 oben genannten Hirnregionen einzeln ausgewertet. Es wurden der arithmetische Mittelwert \pm Standardabweichung berechnet. So konnten die Hirnregionen der verschiedenen Versuchsgruppen auf signifikante Verteilungsunterschiede untersucht werden. Außerdem wurde für jedes Gehirn ein kumulativer Gesamtscore aus der Summe der Dichtewerte aller Hirnregionen eines Tieres gebildet. Für jede Versuchsgruppe wurde auch der Mittelwert \pm Standardabweichung der Gesamtscore errechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mit SPSS (Statistical Package for the Social Sciences). Da die Stichproben unverbunden und nicht normal verteilt waren wurde für alle statistischen Auswertungen der Mann-Whitney-U-Test gewählt, um die Abweichungen der Mittelwerte auf Signifikanz zu überprüfen. Als Signifikanzniveau wurde $P < 0,05$ angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Dosisfindung

Zunächst wurden Versuche zur Dosisfindung durchgeführt. Ziel war es, ein dem klinischen Einsatz äquivalentes Anästhesieniveau zu finden, bei dem die Tiere ausreichend tief schlafen, um Manipulationen zu tolerieren, und bei dem Atmung und Kreislauf stabil bleiben.

Es wurden drei Gruppen mit vier bis fünf Tieren gebildet, welchen 25, 50 oder 75 mg Propofol pro kg Körpergewicht am sechsten Lebenstag (P6) als Einmalgabe intraperitoneal injiziert wurde. Zusätzlich ist eine Kontrollgruppe (n=3) gebildet worden. Es zeigte sich, dass alle Tiere, welche 75 mg Propofol pro kg Körpergewicht erhielten (n=4), während des Versuchs verstarben. In der Gruppe, welche 50 mg Propofol pro kg Körpergewicht erhielten (n=5), verstarben zwei Tiere und die anderen zwei zeigten eine niedrige Atemfrequenz und ein sehr blasses Hautcolorit. Die Tiere, die 25 mg Propofol pro kg Körpergewicht erhielten (n=4), zeigten eine eher flache Narkosetiefe mit einem rosigen Hautcolorit, einer nur minimal verminderten Atemfrequenz und deutlichen Reaktionen auf Schmerzreize.

Aufgrund dieses Ergebnisses entschieden wir uns bei den weiteren Versuchen für eine Dosis von 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht, um ein dem klinischen Einsatz äquivalentes Anästhesieniveau zu erreichen.

3.2 Neurotoxische Effekte von Propofol im unreifen Gehirn der Ratte

Um neurotoxische Effekte von Propofol im sich entwickelnden Rattengehirn zu untersuchen, wurde den Versuchstieren am sechsten Lebenstag (P6) Propofol intraperitoneal injiziert. Die Injektion von 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht erfolgte repetitiv nach 0, 90 und 180 Minuten. Die komplette Dauer der Narkose betrug ca. 6 Stunden. Die mit Propofol behandelten Tiere entwickelten eine tiefe Anästhesie mit nur leichten bis keinen Reaktionen auf Schmerzreize. Die Kontrolltiere erhielten keine Injektion.

Die Präparate wurden nach der Methode von DeOlmos silbergefärbt.

Abbildung 3.1 zeigt histologische Schnitte, insbesondere der Lamina II des parietalen Cortexes aus den Gehirnen sieben Tage alter Ratten. Einzelne degenerierte Neuronen sind als schwarze Punkte zu erkennen. Bei den Kontrolltieren (A) erkennt man einige schwarze Punkte, in den Hirnschnitten der mit 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht

behandelten Tiere (B) erkennt man in der gleichen Hirnregion deutlich mehr degenerative Veränderungen.

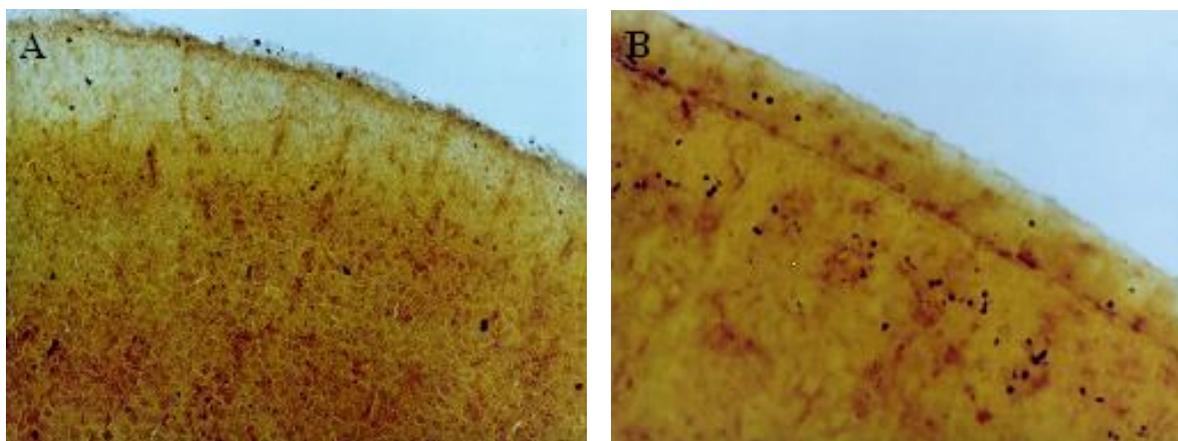


Abb. 3.1: Hirnschnittpräparate, DeOlmos-Färbung, Vergrößerung 100-fach. Die degenerierten Zellen sind als kleine schwarze Punkte zu erkennen. A= Kontrolltiere, B= nach der Gabe von 3 x 30 mg Propofol/kgKG. Gezeigt wird Lamina II des parietalen Cortex.

In der mit Propofol behandelten Gruppe befanden sich 24 Tiere. Bei 20 Ratten traten während des Versuchs und der nachfolgenden Verarbeitung keine Komplikationen auf. Ein Tier entwickelte eine Apnoe und verstarb während der Narkose. Ein Tier entwickelte während der Narkose eine Zyanose, welche auf Schmerzreize rückläufig war. Dieses Tier verstarb jedoch innerhalb der 24 Stunden bis zur Perfusion. Eine Ratte war während der Narkose längerfristig zyanotisch, so dass keine zweite Repetitionsdosis an Propofol verabreicht wurde und das Tier nicht in die Auswertung einbezogen wurde. Bei einem Gehirn gab es Probleme bei der Verarbeitung, so dass die Qualität der Hirnschnitte derart schlecht war, dass eine mikroskopische Auswertung nicht möglich war. Von den 24 Tieren wurden also 20 statistisch ausgewertet. In der Kontrollgruppe befanden sich zehn Jungtiere, mit denen der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt wurde.

In den Hirnschnitten der am sechsten Lebenstag mit 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht behandelten Ratten, fand sich nach 24 Stunden Überlebenszeit eine signifikant erhöhte Anzahl degenerierter Zellen pro mm^3 (Summenscore) im Vergleich zu den Kontrolltieren (Mittelwert \pm Standardabweichung: 24.036,55 \pm 8.133,9 vs. 16.970,1 \pm 4.597,3; U-Test, $p=0,022$). In der Abbildung 3.2 ist der Boxplot mit den Summenscores der Kontrollen und der mit Propofol behandelten Tiere dargestellt.

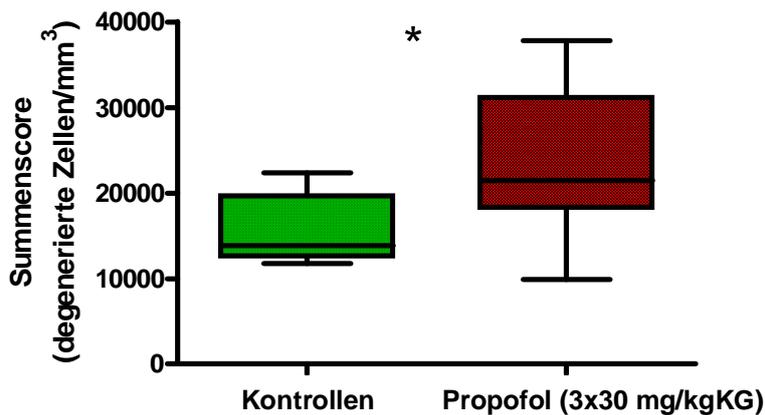


Abb.3.2: Numerische Dichte degenerierter Neuronen pro mm^3 bei sechs Tage alten Ratten (Propofol 3 x 30 mg/kg Körpergewicht) vs. Kontrollen

Bei den am sechsten Lebenstag mit 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht behandelten Ratten (n=20) fand sich nach 24 Stunden Überlebenszeit eine signifikant erhöhte Anzahl degenerierter Zellen pro mm^3 (Summscore) im Vergleich zu den Kontrolltieren (n=10) (Mittelwert \pm Standardabweichung: $24.036,55 \pm 8.133,9$ vs. $16.970,1 \pm 4.597,3$; U-Test, $p=0,022$).

Die unterschiedlichen Ausprägungen in den verschiedenen Hirnregionen sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Signifikant betroffene Hirnregionen sind die Lamina II des Cortex parietale, der mediodorsale und der laterodorsale Thalamus und das Subiculum.

Tabelle 3.1: Neurotoxische Wirkung von Propofol im sich entwickelnden Rattengehirn.

Hirnregion	Numerische Dichte degenerierter Neuronen M (Mittelwert / mm^3) \pm Standardabweichung Versuchsdauer 6 h, Behandlung am 6. Lebenstag	
	Kontrollen (n=10)	Propofol (3 x 30 mg/kgKG) (n=20)
Cortex frontalis, Lamina II	2.942,7 \pm 906,5	4.278,5 \pm 2.876,8
Cortex frontalis, Lamina IV	1.079,3 \pm 372,6	841,4 \pm 428,3
Cortex cingularis, Lamina II	2.000,1 \pm 538,6	2.878,7 \pm 1.359,4
Cortex cingularis, Lamina IV	1.333,3 \pm 291,8	1.333,3 \pm 365,6
Septum	242,9 \pm 213,2	214,3 \pm 156,4
Nucleus caudatus	449,1 \pm 320,2	404,3 \pm 405,2
Cortex parietalis, Lamina II	2.557,1 \pm 1.303,1	4.664,3 \pm 2.537,5 *
Cortex parietalis, Lamina IV	1.110,9 \pm 523,8	904,7 \pm 557,4
Cortex retrosplenialis, Lamina II	928,7 \pm 338,4	785,7 \pm 366,5
Cortex retrosplenialis, Lamina IV	1.142,8 \pm 583,7	1.142,7 \pm 498,2

Thalamus mediodorsalis	194,3 ± 127,5	507,3 ± 657,9 *
Thalamus laterodorsalis	600 ± 436,9	3.234,5 ± 2.706,7 ***
Thalamus ventralis	185,8 ± 157,1	177,2 ± 116,0
Hypothalamus	680 ± 457,5	617,2 ± 441,6
CA 1 Region des Hippocampus	414,4 ± 206,8	385,8 ± 179,9
Gyrus dentatus des Hippocampus	360,1 ± 201,7	314,3 ± 123,7
Subiculum	748,6 ± 469,3	1.352,9 ± 614,5 **
Gesamtscore	16.970,1 ± 4.597,3	24.036,55 ± 8.133,9 *

Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der numerischen Dichte der degenerierten Zellen. In einigen Hirnregionen ist eine signifikante neurotoxische Wirkung von Propofol vorhanden (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$), diese Hirnregionen wurden fett hervorgehoben.

Zusätzlich wurden die Tiere vor der Narkose und 24 Stunden später gewogen. Es zeigte sich bei den mit Propofol behandelten Tieren eine tendenziell geringere Zunahme des Körpergewichtes als bei den Kontrolltieren. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (Mittelwert ± Standardabweichung: 1,41 ± 0,77 vs. 1,74 ± 0,86; U-Test, $p = 0,403$). Der Boxplot zur Gewichtsänderung innerhalb von 24 Stunden nach dem Versuch ist in Abbildung 3.3 dargestellt.

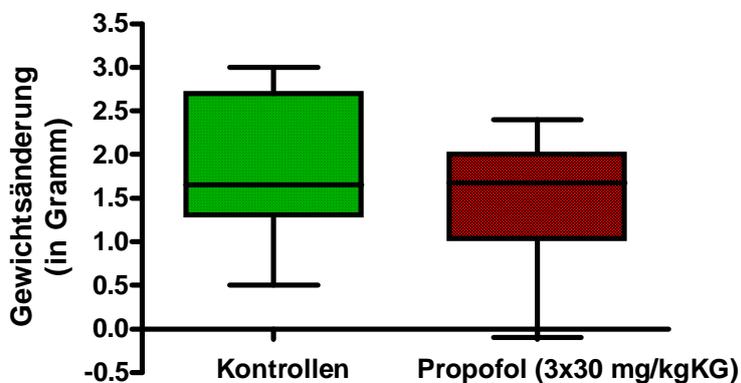


Abb.3.3: Gewichtsänderung innerhalb von 24 Stunden nach dem Versuchsbeginn bei der sechs Tage alten Ratte

Mittelwert und Standardabweichung der Gewichtsänderung in Gramm: 1,41 ± 0,77 vs. 1,74 ± 0,86; U-Test, $p = 0,403$.

3.3 Dosisabhängigkeit der neurotoxischen Effekte

Es zeigte sich eine Dosisabhängigkeit des Ausmaßes der neurodegenerativen Wirkung nach der Applikation von Propofol. Im Alter von sechs Tagen (P6) erhielten die

Versuchstiere Propofol in den Dosierungen von 3 x 10 mg Propofol pro kg Körpergewicht (n=7), 3 x 20 mg Propofol pro kg Körpergewicht (n=7) oder 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht (n=20). Die vierte Gruppe bildeten die Kontrolltiere (n=10), welche kein Medikament erhielten. Die unterschiedlichen Ausprägungen in den verschiedenen Hirnregionen sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Eine signifikant erhöhte Anzahl degenerierter Zellen nach der Anwendung von Propofol im Vergleich zu den Kontrollen zeigte sich im Cortex parietalis Lamina II, Thalamus laterodorsalis und mediodorsalis und im Subiculum. Eine signifikant niedrigere Anzahl degenerierter Zellen ergaben sich nach der Behandlung mit Propofol im Vergleich zu den Kontrollen im Cortex frontalis Lamina II, Cortex cingularis Lamina II und Cortex parietalis Lamina II.

Tabelle 3.2: Dosisabhängigkeit der neurotoxischen Wirkung von Propofol im sich entwickelnden Rattengehirn.

	Numerische Dichte degenerierter Neuronen M (Mittelwert / mm ³) ± Standardabweichung, Versuchsdauer 6 h, Behandlung am 6. Lebenstag			
Hirnregion	Kontrollen (n=10)	Propofol		
		3 x 10 mg/kgKG (n=7)	3 x 20 mg/kgKG (n=7)	3 x 30 mg/kgKG (n=20)
Cortex frontalis, Lamina II	2.942,7 ± 906,5	1.265,3 ± 431,9 **	2.000 ± 466,5 *	4.278,5 ± 2.876,8
Cortex frontalis, Lamina IV	1.079,3 ± 372,6	952,4 ± 410,0	1.043,1 ± 398,2	841,4 ± 428,3
Cortex cingularis, Lamina II	2.000,1 ± 538,6	1.306,1 ± 363,5 *	2.081,6 ± 258,9	2.878,7 ± 1.359,4
Cortex cingularis, Lamina IV	1.333,3 ± 291,8	907,0 ± 465,0	1.043,1 ± 541,2	1.333,3 ± 365,6
Septum	242,9 ± 213,2	138,4 ± 44,9	171,1 ± 81,0	214,3 ± 156,4
Nucleus caudatus	449,1 ± 320,2	228,7 ± 57,3	261,4 ± 45,2	404,3 ± 405,2
Cortex parietalis, Lamina II	2.557,1 ± 1.303,1	1.224,6 ± 564,8 *	1.959 ± 683,7	4.664,3 ± 2.537,5 *
Cortex parietalis, Lamina IV	1.110,9 ± 523,8	907,1 ± 339,4	1.270 ± 518,5	904,7 ± 557,4

Cortex retrosplenialis, Lamina II	928,7 ± 338,4	816,3 ± 347,2	775,4 ± 653,9	785,7 ± 366,5
Cortex retrosplenialis, Lamina IV	1.142,8 ± 583,7	952,4 ± 550,0	1.179,3 ± 571,3	1.142,7 ± 498,2
Thalamus mediodorsalis	194,3 ± 127,5	105,9 ± 39,3	179,6 ± 111,7	507,3 ± 657,9 *
Thalamus laterodorsalis	600 ± 436,9	465,4 ± 184,9	408,3 ± 190,6	3.234,5 ± 2.706,7 ***
Thalamus ventralis	185,8 ± 157,1	122,1 ± 39,3	122,1 ± 51,3	177,2 ± 116,0
Hypothalamus	680 ± 457,5	432,9 ± 157,8	546,9 ± 210,8	617,2 ± 441,6
CA 1 Region des Hippocampus	414,4 ± 206,8	285,9 ± 142,7	469,4 ± 293,9	385,8 ± 179,9
Gyrus dentatus des Hippocampus	360,1 ± 201,7	253,0 ± 180,3	277,6 ± 217,6	314,3 ± 123,7
Subiculum	748,6 ± 469,3	383,6 ± 153,6	457,1 ± 123,4	1.352,9 ± 614,5 **
Gesamtscore	16.970,1 ± 4.597,3	10.747,1 ± 1.841,8 **	14.245,1 ± 2.588,3	24.036,6 ± 8.133,9 *

Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der numerischen Dichte der degenerierten Zellen in den verschiedenen Hirnregionen sowie des Gesamtscores. In einigen (fett hervorgehobenen) Hirnregionen ist eine signifikante neurotoxische oder neuroprotektive Wirkung von Propofol vs. Kontrollen vorhanden (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$).

Die Dosierung von 3 x 10 mg Propofol pro kg Körpergewicht verursacht eine signifikant niedrigere Neurodegeneration im Vergleich zu den Kontrolltieren (Mittelwert ± Standardabweichung: 10.747,1 ± 1.841,8 vs. 16.970,1 ± 4.597,3; U-Test, $p = 0,003$). Die graphische Darstellung des Ergebnisses als Boxplot ist in der Abbildung 3.4 zu sehen. Eine signifikant niedrigere neurodegenerative Wirkung bei den Tieren, die mit 3 x 10 mg Propofol pro kg Körpergewicht behandelt wurden im Vergleich mit den Kontrolltieren zeigt sich in der Lamina II des Cortex frontalis, cingularis und parietalis.

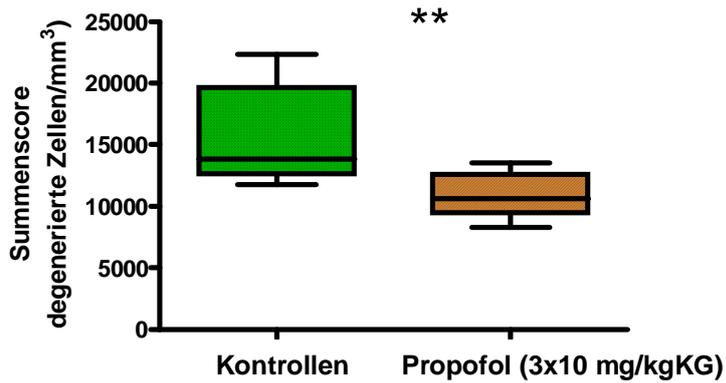


Abb. 3.4: Numerische Dichte degenerierter Neuronen pro mm³ bei sechs Tage alten Ratten (Propofol 3 x 10 mg/kg Körpergewicht vs. Kontrollen)

Bei den mit 3 x 10 mg Propofol pro kg Körpergewicht behandelten Ratten (n=7) fand sich nach 24 Stunden Überlebenszeit eine signifikant niedrigere Anzahl degenerierter Zellen pro mm³ (Summenscore) im Vergleich zu den Kontrolltieren (n=10) (Mittelwert ± Standardabweichung: 10.747,1 ± 1.841,8 vs. 16.970,1 ± 4.587,3; U-Test, p=0,003).

Die Dosierung von 3 x 20 mg Propofol pro kg Körpergewicht führt zu keinem signifikanten Unterschied im Bezug auf die Neurodegeneration im Vergleich zu den Kontrolltieren (Mittelwert ± Standardabweichung: 14.245,1 ± 2.588,3 vs. 16.970,1 ± 4.597,3; U-Test, p=0,329). In der Abbildung 3.5 ist der Boxplot mit den Summenscores der Kontrollen und der mit Propofol (3 x 20 mg Propofol pro kg Körpergewicht) behandelten Tiere dargestellt.

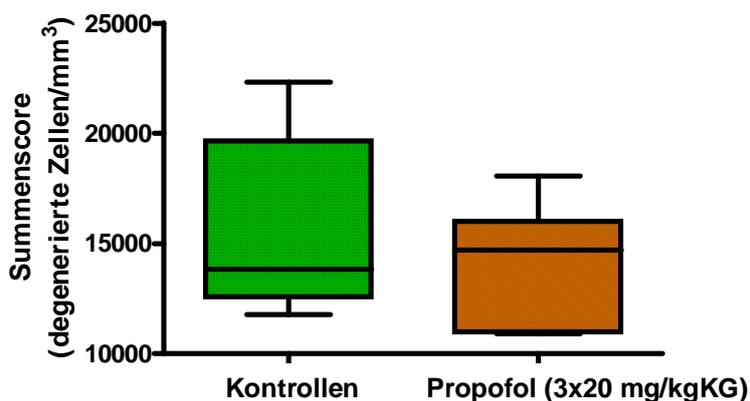


Abb. 3.5: Numerische Dichte degenerierter Neuronen pro mm³ bei sechs Tage alten Ratten (Propofol 3 x 20 mg/kg Körpergewicht)

Bei den mit 3 x 20 mg Propofol pro kg Körpergewicht behandelten Ratten (n=7) fand sich nach 24 Stunden Überlebenszeit kein Unterschied in der Anzahl degenerierter Zellen pro mm³ (Summenscore) im

Vergleich zu den Kontrolltieren (n=10) (Mittelwert \pm Standardabweichung: 14.245,1 \pm 2.588,3 vs. 16.970,1 \pm 4.597,3; U-Test, p=0,329).

Erst die Dosierung von 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht führt zu einer signifikant erhöhten Neurodegeneration im Vergleich zu den Kontrolltieren (Mittelwert \pm Standardabweichung: 24.036,6 \pm 8.133,9 vs. 16.970,1 \pm 4.597,3; U-Test, p=0,022). Allerdings wird erst mit der Dosierung von 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht eine mit dem klinischen Alltag vergleichbare Narkosetiefe erreicht. Bei den niedrigeren Dosierungen sind die Tiere nur leicht schläfrig, werden relativ schnell wieder wach und zeigen starke Reaktionen auf Schmerzreize. In der Abbildung 3.2 ist der Boxplot mit den Summenscores der Kontrollen und der mit 3 x 30 mg Propofol behandelten Tiere dargestellt.

3.4 Altersabhängigkeit der neurotoxischen Effekte

Um eine mögliche Altersabhängigkeit der neurodegenerativen Wirkung von Propofol zu untersuchen, wurde Ratten im Alter von 3 (P3), 6 (P6) oder 21 (P21) Tagen 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Den Kontrollen wurde kein Medikament appliziert.

In der Gruppe der drei Tage alten Ratten, welche mit Propofol (3 x 30 mg Propofol/kg Körpergewicht) behandelt wurden, verstarb ein Tier während der Narkose.

Die Mittelwerte und Standardfehler für die einzelnen Gruppen sind in der Tabelle 3.3 aufgelistet.

Tabelle 3.3: Altersabhängigkeit der neurotoxischen Wirkung von Propofol im sich entwickelnden Rattengehirn.

Alter	3 Tag		6 Tage		21 Tage	
Gruppe	Kontrollen	Propofol (3 x 30 mg/kgKG)	Kontrollen	Propofol (3 x 30 mg/kgKG)	Kontrollen	Propofol (3 x 30 mg/kgKG)
Gruppengröße	n=2	n=5	n=10	n=20	n=5	n=8
Mittelwert \pm Standard- abweichung	39.199,5 \pm 1.603,0	49.702 \pm 2.511,7	16.970,1 \pm 4.597,3	24.036,6 * \pm 8.133,9	3.685,4 \pm 570,8	4.343,1 \pm 1.021,6

Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der numerischen Dichte der degenerierten Zellen pro mm^3 . Bei den fett hervorgehobenen Werten zeigt sich ein signifikanter Unterschied; $*=p<0,05$.

Die Versuche bei den drei Tage alten Tieren wurden nur orientierend an einer geringen Tierzahl durchgeführt. In den Hirnschnitten der am dritten Lebenstag mit $3 \times 30 \text{ mg}$ Propofol pro kg Körpergewicht behandelten Ratten fand sich nach 24 Stunden Überlebenszeit eine tendenziell höhere Anzahl degenerierter Zellen (Summenscore) im Vergleich zu den Kontrolltieren (Mittelwert \pm Standardabweichung: $49.702 \pm 2.511,7$ vs. $39.199,5 \pm 1.603,0$). Aufgrund der geringen Anzahl der Tiere erfolgte keine weiterführende statistische Auswertung. Bei den drei Tage alten Tieren wurde ausschließlich eine TUNEL-Färbung durchgeführt.

Bei den sechs Tage alten Tieren zeigte sich nach der Gabe von $3 \times 30 \text{ mg}$ Propofol pro kg Körpergewicht eine signifikant erhöhte Anzahl degenerierter Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren (Mittelwert \pm Standardabweichung: $24.036,6 \pm 8.133,9$ vs. $16.970,1 \pm 4.597,3$; U-Test: $p=0,022$).

Bei den 21 Tage alten Tieren zeigte sich zwischen den mit Propofol behandelten Tieren und den Kontrollen kein signifikanter Unterschied bei der Anzahl der degenerierten Zellen pro mm^3 (Mittelwert \pm Standardabweichung: $4343,1 \pm 1.021,6$ vs. $3685,4 \pm 570,8$; U-Test, $p=0,057$).

Insgesamt zeigt sich eine deutliche Abnahme der neurodegenerativen Effekte von Propofol mit steigendem Alter. Der Mittelwert der degenerierten Zellen der mit Propofol behandelten Tiere ist von 49.702 im Alter von 3 Tagen auf $4.343,1$ im Alter von 21 Tagen gesunken. Auch bei den Kontrollen kam es zu einer deutlichen Abnahme der degenerierten Zellen von $39.199,5$ im Alter von 3 Tagen auf $3.685,4$ im Alter von 21 Tagen.

3.5 Reduktion der neurotoxischen Wirkung von Propofol durch die Gabe von Erythropoietin

Um zu untersuchen, ob die zusätzliche Gabe von Erythropoietin zu einer Reduktion der neurotoxischen Effekte im sich entwickelnden Rattengehirn während einer Narkose mit Propofol führt, erhielten die sechs Tage alten Ratten zusätzlich 15 Minuten vor der ersten Propofolapplikation eine Erythropoietinlösung intraperitoneal injiziert. In der Gruppe 1 ($n=20$) erhielten die Tiere nur Propofol. In der Gruppe 2 ($n=15$) erhielten die Tiere 5.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht vor der Gabe von Propofol. In dieser

Gruppe ist ein Tier während der Narkose verstorben und bei einem Gehirn gab es während der Verarbeitung Probleme, so dass aufgrund der schlechten Qualität der Hirnschnitte keine mikroskopische Auswertung erfolgen konnte. Statistisch konnten 13 Tiere ausgewertet werden. In der 3. Gruppe (n=13) erhielten die Tiere vor der Applikation von Propofol 20.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht. Ein Tier ist während der Narkose verstorben, so dass die Ergebnisse von 12 Tieren statistisch ausgewertet wurden.

Die unterschiedlichen Ausprägungen der degenerativen Effekte in den verschiedenen Hirnregionen sind in Tabelle 3.4 dargestellt.

Tabelle 3.4: Reduktion der neurotoxischen Wirkung von Propofol im sich entwickelnden Rattengehirn durch die Gabe von Erythropoietin.

Hirnregion	Numerische Dichte degenerierter Neuronen M (Mittelwert / mm ³) ± Standardabweichung, Versuchsdauer 6 h, Behandlung am 6. Lebenstag		
	3 x 30 mg/kgKG Propofol (n=20)	3 x 30 mg/kgKG Propofol + 5.000 IE Epo/kgKG (n=13)	3 x 30 mg/kgKG Propofol + 20.000 IE Epo/kgKG (n=12)
Cortex frontalis, Lamina II	4.278,5 ± 2.876,8	1.472,5 ± 542,0 ***	1.249,9 ± 656,5 ***
Cortex frontalis, Lamina IV	841,4 ± 428,3	610,2 ± 302,9	555,25 ± 430,7
Cortex cingularis, Lamina II	2.878,7 ± 1.359,4	2.099,1 ± 1.187,3	4.773,8 ± 3.703,4
Cortex cingularis, Lamina IV	1.333,3 ± 365,6	1.025,5 ± 536,9	1.216,8 ± 465,7
Septum	214,3 ± 156,4	79,2 ± 46,9 ***	99,8 ± 49,4 **
Nucleus caudatus	404,3 ± 405,2	175,8 ± 86,4 *	269,0 ± 188,5
Cortex parietalis, Lamina II	4.664,3 ± 2.537,5 *	1.538,3 ± 636,7 ***	1.345,2 ± 392,2 ***
Cortex parietalis, Lamina IV	904,7 ± 557,4	512,6 ± 378,9 *	634,7 ± 382,9
Cortex retrosplenialis, Lamina II	785,7 ± 366,5	538,5 ± 248,3 *	607,3 ± 328,7
Cortex retrosplenialis, Lamina IV	1.142,7 ± 498,2	1.049,8 ± 759,9	819,9 ± 458,4
Thalamus mediodorsalis	507,3 ± 657,9 *	608,8 ± 123,4	540,4 ± 698,9
Thalamus laterodorsalis	3.234,5 ± 2.706,7 ***	4.054,9 ± 4.326,6	4.445,8 ± 3.240,1
Thalamus ventralis	177,2 ± 116,0	129,7 ± 74,3	131,0 ± 92,3
Hypothalamus	617,2 ± 441,6	564,8 ± 604,5	609,7 ± 645,1
CA 1 Region des Hippocampus	385,8 ± 179,9	351,8 ± 215,1	464,3 ± 317,1
Gyrus dentatus des Hippocampus	314,3 ± 123,7	373,7 ± 514,6	409,3 ± 290,1
Subiculum	1.352,9 ± 614,5 **	1.615,5 ± 1.105,3	4.014 ± 1.777,9 ***
Gesamtscore	24.036,6 ± 8.133,9 *	16.800,9 ± 9.549,6 **	22.186,6 ± 9.044,9

Angegeben sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der numerischen Dichte der degenerierten Zellen. Mit Hilfe des U-Test wurden jeweils die Hirnregionen der nur mit Propofol behandelten Tiere mit den einzelnen Hirnregionen der mit verschiedenen Erythropoietinkonzentrationen und Propofol behandelten Tiere verglichen. In einigen Hirnregionen ist eine signifikante neurotoxische oder neuroprotektive Wirkung von Propofol vorhanden (*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$). Signifikante Werte wurden fett hervorgehoben.

Die Tiere, die eine Dosis von 5.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht vor der Gabe von Propofol erhielten, zeigten im Vergleich zu den Tieren, die nur Propofol erhielten, eine signifikant niedrigere Anzahl degenerierter Zellen pro mm^3 (Summenscore). Mittelwert \pm Standardabweichung betragen $16.800,9 \pm 9.549,6$ versus $24.036,6 \pm 8.133,9$ und mit Hilfe des U-Test ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p=0,003$). In der Abbildung 3.6 ist der Boxplot mit den Summenscores der mit Propofol behandelten Tiere und der mit Propofol und 5.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht behandelten Tiere dargestellt.

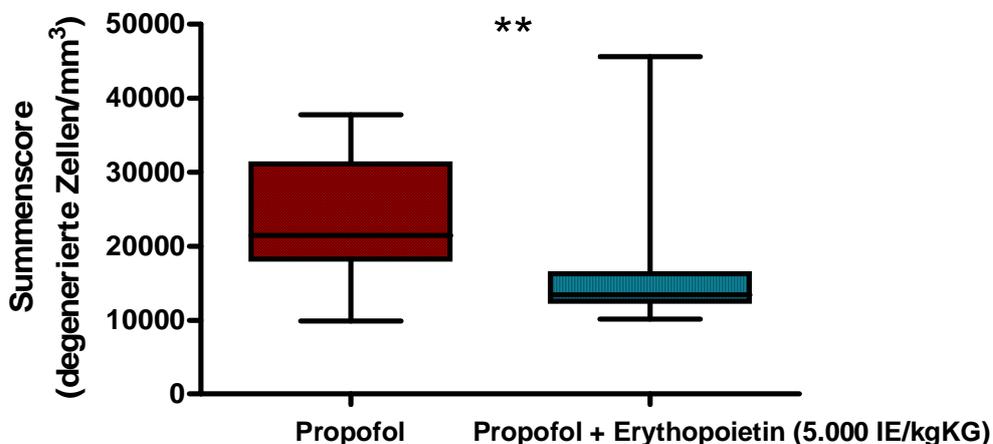


Abb. 3.6: Neuroprotektive Wirkung von 5.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht vor der Gabe von Propofol

Die Tiere, welche eine Dosis von 5.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht vor der Gabe von Propofol erhielten, zeigten im Vergleich zu den Tieren welche nur Propofol erhielten, eine signifikant niedrigere Anzahl degenerierter Zellen pro mm^3 (Mittelwert \pm Standardabweichung: $16.800,6 \pm 9.549,6$ vs. $24.036,6 \pm 8.133,9$; U-Test; $p=0,003$).

Bei den Tieren, die 20.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht zusätzlich zum Propofol erhielten, ergab sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl

degenerierter Zellen pro mm^3 (Summenscore) im Vergleich zu den nur mit Propofol behandelten Tieren (Mittelwert \pm Standardabweichung: $22.186,6 \pm 9.044,9$ vs. $24.036,6 \pm 8.133,9$; U-Test, $p=0,414$). In Abbildung 3.7 ist dieses Ergebnis graphisch als Boxplot dargestellt.

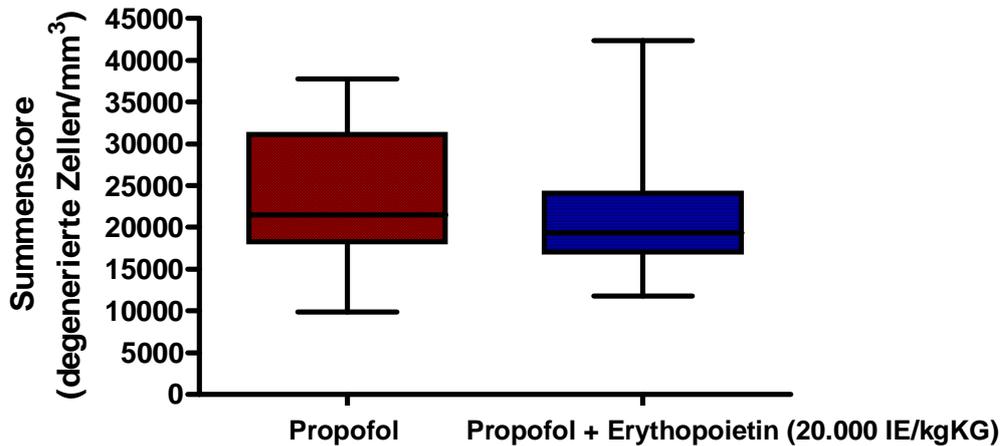


Abb. 3.7: Wirkung von 20.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht vor der Gabe von Propofol

Tiere, die eine Dosis von 20.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht vor der Gabe von Propofol erhielten, zeigten im Vergleich zu den Tieren, die nur Propofol erhielten, keinen signifikanten Unterschied hinsichtlich der Anzahl degenerierter Zellen pro mm^3 (Mittelwert \pm Standardabweichung: $22.186,6 \pm 9.044,9$ vs. $24.036,5 \pm 8.133,9$; U-Test; $p=0,414$).

Zusätzlich wurden die Tiere vor der Narkose und 24 h später gewogen. Verglichen wurde die Gewichtszunahme der einzelnen Tiere innerhalb dieser 24 Stunden. Es zeigte sich bei den nur mit Propofol behandelten Tieren eine tendenziell größere Zunahme des Körpergewichtes als bei den mit 5.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht und Propofol behandelten Tieren. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant (Mittelwert \pm Standardabweichung: $1.409 \pm 0,77$ vs. $1,092 \pm 0,8$; U-Test, $p=0,346$). Auch die Gewichtszunahme der Tiere, welche 20.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht zusätzlich zum Propofol erhielten, ist tendenziell geringer als bei den Tieren, die nur Propofol erhielten. Dieser Unterschied ist ebenfalls nicht signifikant (Mittelwert \pm Standardabweichung: $1.125 \pm 0,91$ vs. $1.409 \pm 0,77$; U-Wert, $p=0,349$).

4. Diskussion

4.1 Zusammenfassung der neurotoxischen und neuroprotektiven Effekte von Propofol

Für zahlreiche psychoaktive und sedative Substanzen wie Barbiturate, Benzodiazepine, Antiepileptika [17], Ketamin [82] sowie Anästhetika in Kombination mit Sedativa [66] wurde gezeigt, dass sie Apoptose im Zentralen Nervensystem von Tieren induzieren können.

Ziel dieser Arbeit war es, Propofol auf neurodegenerative Effekte im sich entwickelnden Gehirn der Ratte zu untersuchen.

Es zeigte sich, dass eine intraperitoneale Gabe von Propofol dosisabhängig neurodegenerative oder neuroprotektive Effekte im sich entwickelnden Gehirn der Ratte induzieren kann. Bei Gabe einer geringen Dosis von Propofol (3 x 10 mg Propofol pro kg Körpergewicht) ergab sich bei der sechs Tage alten Ratte eine signifikant niedrigere Anzahl degenerierter Zellen pro mm^3 als bei den Kontrolltieren. Bei einer Erhöhung der Propofoldosis kam es zu einer steigenden Anzahl degenerierter Zellen pro mm^3 . Bei Gabe von 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht zeigte sich bei sechs Tage alten Ratten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant erhöhte Anzahl an degenerierten Zellen pro mm^3 .

Zusätzlich zur Dosisabhängigkeit der neurotoxischen Effekte zeigte sich eine Altersabhängigkeit. Bei drei Tage alten Ratten zeigte sich nach der Gabe von 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht eine tendenziell erhöhte Anzahl an degenerierten Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im Alter von sechs Tagen induzierte die Gabe von 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikant höhere Anzahl degenerierter Zellen im Gehirn. Die Gabe von 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht führt bei 21 Tage alten Ratten im Vergleich zu den Kontrollen zu keinem signifikanten Unterschied in der Anzahl der degenerierten Zellen pro mm^3 . Die höchste Differenz der Anzahl der degenerierten Zellen pro mm^3 zwischen mit Propofol behandelten Tieren und den Kontrolltieren ergab sich im Alter von sechs Tagen.

Es zeigt sich auch insgesamt eine deutliche Abnahme der neurodegenerativen Effekte von Propofol mit steigendem Alter. Der Mittelwert der degenerierten Zellen der mit Propofol behandelten Tiere ist von 49.702 im Alter von 3 Tagen auf 4.343,1 im Alter von 21 Tagen gesunken. Auch bei den Kontrollen kam es zu einer deutlichen Abnahme der degenerierten Zellen von 39.199,5 im Alter von 3 Tagen auf 3.685,4 im Alter von 21 Tagen.

Das Ausmaß der neurotoxischen Effekte von Propofol bei der sechs Tage alten Ratte konnte durch die zusätzliche Gabe von 5.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht vor der Narkose signifikant reduziert werden. Bei einer Erhöhung der Erythropoietindosis auf 20.000 IE pro kg Körpergewicht zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl degenerierter Zellen.

4.2 Apoptose oder Nekrose?

Die meisten Rattengehirne wurden nach den Versuchen mit der De Olmos Kupfer-Silberfärbung gefärbt. Damit können degenerierte Neuron dunkelbraun bis schwarz angefärbt werden und heben sich so deutlich vom goldgelben Hintergrund ab [74]. Die De Olmos Kupfer-Silberfärbung ist eine kostengünstige Screeningmethode mit welcher allein keine Aussage zum Pathomechanismus der neuronalen Degeneration gemacht werden kann [14]. Um zu Unterscheiden, ob die Nervenzellen durch Apoptose oder durch Nekrose zu Grunde gegangen sind, sind weitere Untersuchungen nötig.

Gavrieli et al. etablierten 1992 die TUNEL-Färbung, als eine histologische Methode um in situ den programmierten Zelltod darzustellen. Dies geschieht durch Enzyme, die mit den freien 3'-OH-Enden der DNA-Fragmente reagieren [14, 77]. Bei den drei Tage alten Tieren erfolgte die Färbung mit TUNEL. In den Hirnschnitten der am dritten Lebenstag mit 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht behandelten Ratten fand sich nach 24 Stunden Überlebenszeit eine tendenziell erhöhte Anzahl degenerierter Zellen (Summenscore) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Auch bei der Nekrose und bei der postmortalen Autolyse kommt es zu freien 3'-OH-Enden der DNA, so dass die TUNEL-Färbung nicht Apoptose-spezifisch ist [10, 78].

Außerdem existiert zum Beispiel die Caspasefärbung. Caspasen sind Cystein-Proteasen, welche den apoptotischen Zelluntergang vollstrecken können. Eine Schlüsselrolle nimmt dabei die Caspase 3 ein, da sie vitale Proteine schneiden und Endonucleasen aktivieren kann und somit die Effektor-Caspase zur Durchführung des apoptotischen Programmes ist [83]. Die Caspase-Färbung stellt eine Immunhistochemie für Aktivierte Caspase 3 und Fas (Zelltodrezeptor) dar. Inzwischen wurden allerdings auch Caspaseunabhängige Apoptoseformen beschrieben [75], so dass auch mit dieser Färbung keine sichere Unterscheidung zwischen Apoptose und Nekrose möglich ist.

Am zuverlässigsten, um die neuropathologischen Veränderungen einzuordnen, ist die Elektronenmikroskopie [33]. Diese führten wir jedoch im Rahmen unserer Versuche nicht durch.

Zusammenfassend kann mit der vorliegenden Arbeit keine eindeutige Aussage zu den neuropathologischen Veränderungen nach einer Narkose mit Propofol gemacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit von der Propofoldosis und dem Alter der Ratten zu einer verminderten oder erhöhten Anzahl degenerierter Neurone kam. Die Frage, ob der vermehrte Zelluntergang nach einer Narkose mit Propofol durch Apoptose oder Nekrose entsteht, kann nur durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für die Untersuchung der GABA-agonistischen und NMDA-antagonistischen Wirkung auf Nervenzellen. Ikonomidou et al. zeigten 1999, dass die Blockade des Glutamatrezeptors die apoptotische Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn auslöst [84]. Ketamin und Midazolam führten einzeln oder kombiniert zu einer signifikanten Zunahme der Neurodegeneration. Elektronenmikroskopisch konnte gezeigt werden, dass es sich um Apoptose handelt [85]. Später konnten Arbeitsgruppen um Bittigau et al. zeigen, dass antiepileptische Medikamente ebenfalls zu einer apoptotischen Neurodegeneration führen [86].

Andere Arbeitsgruppen untersuchten inzwischen auch Propofol auf den Wirkungsmechanismus bei der Neurodegeneration. Fredriksson [82] und Cattano [87] beschreiben nach der Gabe von Propofol eine Neuroapoptose.

4.3 Dosisabhängigkeit der Wirkung von Propofol

Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren erfordert neben der Bindung von Glutamat eine zusätzliche Depolarisation der postsynaptischen Plasmamembran, sowie die gleichzeitige Bindung von Glycin. Die γ -Aminobuttersäure (GABA) ist neben Glycin im adulten Gehirn der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter, aber im unreifen Gehirn hat GABA auch exzitatorische Funktionen und beeinflusst die neuronale Migration und Differenzierung [4, 40]. Zahlreiche Tierversuche legen nahe, dass eine Anästhesie während der Hirnentwicklung zu einer Neurodegeneration führt [88]. Die existierenden, nicht klinischen Daten zeigten, dass NMDA-Antagonisten und/oder GABA-Agonisten neurotoxisch wirken [11, 12, 88].

Der genaue Wirkungsmechanismus von Propofol ist weiterhin nicht bekannt. Es gibt zahlreiche Untersuchungen, welche sich mit den Wirkungsmechanismen und den Rezeptoren beschäftigen. Die wichtigsten beschriebenen Wirkungen von Propofol sind die agonistischen Effekte an den GABA_A-Rezeptoren und den Glycin-Rezeptoren,

sowie der Antagonismus an den NMDA-Rezeptoren und den Acetylcholinrezeptoren [8, 33, 18].

Fredriksson et al. zeigten 2007, dass die Exposition von neonatalen Mäusen gegenüber einer Anästhetikakombination, welche über den NMDA- und den GABA-Rezeptor wirken, zu einer apoptotischen Neurodegeneration und bleibenden Verhaltensauffälligkeiten führt [82].

Die Arbeitsgruppe um Cattano untersuchte 2008 die neurotoxische Wirkung von Propofol als GABA-Agonist und NMDA-Antagonist auf das Gehirn der jungen Maus. Er geht davon aus, dass die nötige Dosis für eine Narkose bei einem chirurgischen Eingriff und bei einer intraperitonealen Gabe bei 200 mg Propofol pro kg Körpergewicht liegt. Bereits mit 50 mg Propofol pro kg Körpergewicht konnte er eine signifikante Neuroapoptose induzieren [87].

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es im sich entwickelnden Gehirn der Ratte bei der Gabe einer hohen Propofoldosis (3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht) und einer Narkosedauer von sechs Stunden im Vergleich zu den Kontrolltieren zu einer signifikant erhöhten Anzahl degenerierter Zellen pro mm^3 kommt. Unter der Annahme, dass Propofol hauptsächlich über den NMDA- und den GABA_A -Rezeptor wirkt, entsprechen die Ergebnisse dieser Arbeit den oben genannten Veröffentlichungen. Jedoch zeigte sich in unseren Untersuchungen eine deutliche Dosisabhängigkeit der neurodegenerativen Effekte.

Bei Gabe einer geringen Propofoldosis zeigte sich in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikant niedrigere Anzahl degenerierter Zellen pro mm^3 . In den momentan veröffentlichten Untersuchungen zur Wirkung von Propofol auf das unreife Gehirn konnten die Ergebnisse dieser Arbeit bei niedrigen Propofoldosierungen nicht reproduziert werden. Die Arbeitsgruppen um Cattano [87] und Fredriksson [82] fanden bei niedrigen Propofoldosierungen weder signifikant erhöhte noch signifikant verminderte neurodegenerative Effekte. Allerdings arbeiteten beide Gruppen mit Mäusen und nicht mit Ratten und verabreichten das Propofol im Gegensatz zum vorliegenden Versuchsaufbau nur ein Mal. Da die in der vorliegenden Arbeit gefundene neuroprotektive Wirkung geringer Propofoldosen nicht mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen übereinstimmt, sollte sie überprüft werden. Es ist aber denkbar, dass eine leichte Reduktion des zerebralen Stoffwechsels schützend auf die Neuronen wirkt. Eine neuroprotektive Wirkung von Propofol wurden in anderen Zusammenhängen berichtet. Propofol wird auch in zahlreichen Studien eine neuroprotektive Wirkung bei leichten Schlaganfällen zugeschrieben [90, 91]. Jevtovic-

Todorovic et al. beschrieben, dass neurotoxische Effekte bei der verlängerten Gabe von Lachgas bei der erwachsenen Ratte durch die Gabe von GABA-Agonisten verhindert werden können [89].

Aktuelle Veröffentlichungen beschäftigten sich mit den möglichen Mechanismen des Zelltods im sich entwickelnden Gehirn der Ratte. Die Arbeitsgruppe um Pesic untersuchte welcher molekulare Mechanismus zur Neuroapoptose bei einer Propofolnarkose bei der sieben Tage alten Ratte führt. Den Tieren wurden 25 mg Propofol pro kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Es zeigte sich eine Reduktion der NGF (*nerve growth factor*) mRNA (messenger Ribonukleinsäure) und Proteine.

Außerdem kam es zu einer Steigerung der TNF- α mRNA und Proteine [92].

Unsere Untersuchungen lassen keine Schlussfolgerungen auf die neurotoxischen oder neuroprotektiven Effekte der einzelnen Rezeptoren zu. Es konnte nur eine Dosisabhängigkeit der degenerativen Effekte im sich entwickelnden Gehirn der Ratte festgestellt werden.

4.4 Altersabhängigkeit der neurodegenerativen Wirkung von Propofol

In der vorliegenden Arbeit wurde auch die Altersabhängigkeit der neurotoxischen Wirkung von Propofol untersucht. In den Hirnschnitten der am dritten Lebenstag mit 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht behandelten Ratten fand sich nach 24 Stunden Überlebenszeit eine tendenziell erhöhte Anzahl degenerierter Zellen (Summenscore) im Vergleich zu den Kontrollen. Bei den sechs Tage alten Tieren zeigte sich nach Gabe von 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht eine signifikant erhöhte Anzahl degenerierter Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Bei den 21 Tage alten Tieren zeigte sich zwischen den mit Propofol behandelten Tieren und den Kontrollen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl der degenerierten Zellen.

Es zeigt sich auch insgesamt eine deutliche Abnahme der neurodegenerativen Effekte von Propofol mit steigendem Alter. Der Mittelwert der degenerierten Zellen der mit Propofol behandelten Tiere ist von 49.702 im Alter von 3 Tagen auf 4.343,1 im Alter von 21 Tagen gesunken. Auch bei den Kontrollen kam es zu einer deutlichen Abnahme der degenerierten Zellen von 39.199,5 im Alter von 3 Tagen auf 3.685,4 im Alter von 21 Tagen.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die Altersabhängigkeit der neurodegenerativen Effekte von Propofol ist die verstärkte Empfindlichkeit des Gehirns während der rapiden Hirnwachstumsphase. Während der ersten drei postpartalen Wochen befindet sich die

Ratte in der Phase des rapiden Hirnwachstums, mit einer maximalen Wachstumsgeschwindigkeit am siebten Lebenstag [13]. In unseren Versuchen zeigte sich während der maximalen Wachstumsgeschwindigkeit, am sechsten Lebenstag, die größte Differenz in der Anzahl der degenerierten Zellen zwischen den mit Propofol behandelten Tieren und den Kontrollen. Beim Menschen beginnt die rapide Hirnwachstumsphase im letzten Trimenon der Schwangerschaft, ab der 23. Schwangerschaftswoche, und endet mit dem Beginn des dritten Lebensjahres des Kindes [13]. In der Literatur finden sich zahlreiche Untersuchungen, welche eine Altersabhängigkeit bei der Empfindlichkeit gegenüber Noxen beschreiben [9, 17, 66].

Im Alter von sechs bis zehn Tagen ist die durch GABA_A-Agonisten und NMDA-Antagonisten induzierte Apoptose im Gehirn der Ratte am stärksten ausgeprägt [9, 11, 12, 17].

Es zeigt sich sowohl bei den mit Propofol behandelten Tieren als auch bei den Kontrolltieren eine deutlich abnehmende Neurodegeneration mit steigendem Alter. Im Rahmen der Hirnentwicklung werden überschüssig angelegte Neuronen und Gliazellen durch Apoptose ungefähr auf die Hälfte reduziert [23, 27]. Die physiologische Elimination nimmt mit zunehmendem Alter ab.

4.5 Neurodegenerative Wirkung von Propofol im Vergleich zu anderen Anästhetika

In der Literatur lassen sich zahlreiche Untersuchungen zur Wirkung von verschiedenen Anästhetika auf das sich entwickelnde Gehirn finden mit teilweise unterschiedlichen Ergebnissen. Die meisten Untersuchungen wurden an Nagetieren durchgeführt.

Zou et al. zeigten zum Beispiel, dass Ketamin bei der sieben Tage alten Ratte zu einer dosisabhängigen Zunahme der Neurotoxizität führt, welche bei hohen Dosierungen signifikant ist [93]. Hayashi zeigte, dass die einmalige intraperitoneale Gabe von Ketamin bei der sieben Tage alten Ratte zu keiner erhöhten Neurodegeneration führte [94]. Die Arbeitsgruppe um Scallet konnte zeigen, dass erst die mehrfache Gabe von Ketamin in einer hohen Dosis zu neurodegenerativen Effekten führt [95]. Ketamin wirkt hauptsächlich über einen NMDA-Antagonismus [8].

Die Arbeitsgruppe um Jevtovic-Todorovic konnte zeigen, dass eine Kombination von Midazolam, Isofluran und Lachgas im sich entwickelnden Gehirn der Ratte zu einem ausgeprägten Verlust von Neuronen sowie persistierenden Gedächtnis- und Lerndefiziten führt [63].

Inzwischen wurden auch verschiedene Untersuchungen zu neurodegenerativen Effekten von Propofol auf das sich entwickelnde Gehirn im Tiermodell veröffentlicht. Cattano et al. konnten zeigen, dass die intraperitoneale Gabe von Propofol bei der fünf bis sieben Tage alten Maus ab einer Dosis von ≥ 50 mg/kg Körpergewicht zu einer signifikanten Neuroapoptose führt. Sie konnten außerdem zeigen, dass die bei der jungen Maus benötigte Dosis von Propofol um eine chirurgische Anästhesie durchzuführen bei 200 mg/kg Körpergewicht liegt. Das bedeutet, dass bereits eine sehr geringe Dosis neurotoxisch wirkt [87].

Die Arbeitsgruppe um Fredriksson konnte ebenfalls eine neurodegenerative Wirkung von Propofol feststellen. Bei der zehn Tage alten Maus induzierte die Gabe von 60 mg Propofol diese Wirkung [82].

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen zeigte sich in den von uns durchgeführten Versuchen eine neurodegenerative Wirkung von Propofol. Jedoch führte bei der sechs Tage alten Ratte erst eine kumulative Dosis von 90 mg Propofol pro kg Körpergewicht (3 x 30 mg) zu einer signifikanten Neurodegeneration. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Cattano und Fredriksson zeigte sich in der vorliegenden Arbeit bei einer subanästhetischen Gabe von Propofol (3 x 10 mg / kg Körpergewicht) eine signifikante Neuroprotektion.

Die Arbeitsgruppe um Bercker konnte zeigen, dass die Gabe von Sevofluran im Gegensatz zu Propofol zu keiner erhöhten Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn der sechs Tage alten Ratte führt [96].

Aber nicht alle inhalativen Anästhetika sind neuroprotektiv. Jevtovic-Todorovic konnte zeigen, dass die Gabe von Isofluran neurotoxisch wirkt.

Es liegen auch zahlreiche Daten zur Wirkung von Anästhetikakombinationen auf das sich entwickelnde Gehirn vor. In den meisten Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Kombination verschiedener Anästhetika zu stärkeren neurotoxischen Effekten führt als die Einzelgabe [88].

4.6 Neuroprotektive Wirkung von Erythropoietin

Die gesteigerte Anzahl degenerierter Zellen pro mm^3 bei einer Narkose mit Propofol am sechsten Lebenstag der Ratte konnte durch die intraperitoneale Gabe von Erythropoietin, vor der Narkose, abgeschwächt werden. Die Gabe von 5.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht 15 Minuten vor der ersten Propofolapplikation führt

zu einer signifikant niedrigeren Anzahl degenerierter Zellen pro mm³ gegenüber der Gabe von Propofol allein.

Die schützenden Eigenschaften von Erythropoietin wurden in der Literatur bereits in vielen Tiermodellen beschrieben. Im unreifen Gehirn der sieben Tage alten Ratte wurden Versuche mit Erythropoietin zu hypoxisch-ischämischen Hirnschäden durchgeführt, wobei sich zeigte, dass Erythropoietin das Ausmaß eines Hirninfarkts signifikant vermindern kann und die Anzahl TUNEL-positiver Zellen verringern kann [97, 98]. In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Erythropoietin signifikant die durch Hyperoxie induzierte Apoptose und Caspase-2, -3 und -8 Aktivität im Gehirn sechs Tage alter Ratten reduziert [99].

Außerdem wurden Tierversuche zum Schädel-Hirn-Trauma durchgeführt, hier kann ebenfalls durch die Applikation von Erythropoietin eine Reduktion des Hirnschadens erreicht werden [100, 101].

In der Literatur gibt es zahlreiche Erklärungsversuche für die neuroprotektive Wirkung von Erythropoietin. Dzierko et al. beobachten in ihren Versuchen, dass die intraperitoneale Gabe des NMDA-Antagonisten (+) MK-801 bei der sieben Tage alten Ratte zu einer signifikanten Reduktion der mRNA von BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*) und GDNF (*Glial cell derived neurotrophic factor*) führt. Er zeigte außerdem, dass Erythropoietin zu einer vermehrten Expression dieser antiapoptotischen Faktoren führt [102]. Dies könnte auch ein möglicher Mechanismus der neuroprotektiven Wirkung von Erythropoietin vor der Narkose mit Propofol sein, da Propofol unter anderem NMDA-antagonistisch wirkt [8, 9].

In anderen Versuchen konnte gezeigt werden, dass Erythropoietin zu einer vermehrten Expression von Bcl-2 führt [101]. Bcl-2 wirkt antiapoptotisch [21].

Die Gabe von 20.000 IE Erythropoietin führt zu einer etwas niedrigeren, aber nicht signifikant verminderten Zahl degenerierter Zellen. Dzierko erreichte in seinen Versuchen mit dem NMDA-Antagonisten (+) MK-801 die größte antiapoptotische Wirkung bei der Gabe von 20.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht. Eine weitere Dosissteigerung oder die mehrfache Gabe führten bei ihm zu keiner weiteren Zunahme der antiapoptotischen Wirkung. Eine Erklärung könnte eine negative Beeinflussung der Signalübertragung sein, die am Erythropoietinrezeptor beginnt. Es kann zu einer Desphosphorylierung des Rezeptors kommen oder zu einer Internalisierung des Rezeptors selber. Dies kann die Funktion des Rezeptors hemmen und damit die Übermittlung der Informationen durch die Erythropoietinbindung an den Rezeptor in das Zellinnere unterbinden [102]. Die Hemmung des Rezeptors könnte auch erklären,

warum in unseren Versuchen eine Steigerung der Erythropoietindosis auf 20.000 IE/kg KG nicht zu einer Zunahme der neuroprotektiven Wirkung führt, sondern zu einer Abnahme.

4.7 Die Übertragbarkeit des Tiermodells und Schlussfolgerungen

Die Übertragung unserer experimentellen Daten auf den Menschen ist nicht unproblematisch.

Ein Rattengehirn entwickelt sich über einige Wochen, während ein menschliches Gehirn sich über Jahre entwickelt. Eine sechsstündige Anästhesie bei einer jungen Ratte entspricht nicht einer sechsstündigen Operation bei einem menschlichen Neugeborenen, sondern eher Wochen [103].

Aufgrund der geringen Größe der neugeborenen Ratten erfolgte die Gabe von Propofol in der vorliegenden Arbeit intraperitoneal. Da zunächst eine Resorption des Wirkstoffs erfolgen muss, liegt die benötigte Propofoldosis deutlich höher als bei der intravenösen Gabe. Insgesamt liegt die von uns verwendete Dosis deutlich über den beim Menschen eingesetzten Dosierungen. Es gibt außerdem deutliche Unterschiede in der Pharmakokinetik zwischen dem Menschen und dem Nagetier.

Die Arbeitsgruppe um Soriano kritisiert, dass neurotoxische Wirkungen der Narkose im Tiermodell auch durch unkontrollierbare Effekte wie die Deprivation von der Mutter, Hypoglykämie oder Hypoxie induziert werden können [104, 105].

In der klinischen Praxis werden regelmäßig Blutdruck, Puls, Temperatur und Oxygenierung gemessen, um die Nebenwirkungen der Anästhetika zu reduzieren. Anästhetika supprimieren nicht nur das zentrale Nervensystem, sondern auch den Kreislauf und die Atmung, was zu einer verminderten Durchblutung des Gewebes und einer Hypoxie führt. Die geringe Größe der jungen Ratte machen ein Monitoring (Sauerstoffsättigung, Blutdruck, etc.) und stabilisierende Techniken unmöglich. Bei Tierversuchen mit jungen Ratten ist meist nur eine Beobachtung des Hautcolorits und der Atemfrequenz möglich. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass es während der Narkose zu einer passageren Hyperkapnie und / oder einer metabolischen Azidose gekommen ist. Diese Effekte könnten ebenfalls eine Neurodegeneration im unreifen Gehirn hervorrufen.

Zusätzlich erfolgt bei menschlichen Neugeborenen vor und während der Operation eine gewichts- und altersadaptierte Flüssigkeits- und Nahrungssubstitution um eine Malnutrition, Exsikose oder Hypoglykämie zu verhindern. In den durchgeführten

Versuchen erhielten die Tiere einmalig PÄD II subcutan. Die Tiere wurden vor der Narkose und 24 Stunden später gewogen. Es zeigte sich bei den mit 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht behandelten Tieren tendenziell geringere Zunahme des Körpergewichtes als bei den Kontrolltieren. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Auch eine Hypoglykämie kann zu neurodegenerativen Effekten im Gehirn führen [106].

Ein weiteres Problem bei der Übertragbarkeit der vorliegenden Untersuchung auf eine Operation ist die fehlende chirurgische Intervention und der damit fehlende Schmerzreiz. Aber Anästhetika und insbesondere auch Propofol werden nicht nur zur Narkose, sondern auch zur Sedierung eingesetzt.

Eine weitere mögliche Einschränkung liegt in der fehlenden intraperitonealen Injektion bei den Kontrolltieren. In der Literatur gibt es jedoch keinen Anhaltspunkt, dass eine intraperitoneale Injektion allein zu einer erhöhten Neurodegeneration führt.

Mit der vorliegenden Arbeit lassen sich keine Aussagen zur Bedeutung der neurodegenerativen Effekte machen. Es ist möglich, dass die signifikant erhöhte Neurodegeneration nach der Gabe von Propofol zu bleibenden Verhaltensauffälligkeiten und Lerndefiziten führt. Es ist aber auch denkbar, dass die physiologische Elimination überschüssig angelegter Neuronen durch die Gabe von Propofol nur im Verlauf beeinflusst wird, ohne zu bleibenden Schäden zu führen. Wünschenswert wäre die Durchführung von Verhaltensstudien um zu untersuchen, inwieweit eine Neurodegeneration während der Hirnentwicklung zu Verhaltensauffälligkeiten oder Lerndefiziten im weiteren Verlauf führt.

Zusammenfassend gibt es zahlreiche Einschränkungen bei der Übertragung der Daten auf den Menschen. Da sich aus ethischen Gründen eine Durchführung dieser Untersuchungen beim Menschen verbietet, können aus der vorliegenden Arbeit jedoch Tendenzen abgeleitet werden. Der Einsatz von Anästhetika in der Praxis sollte gerade bei Früh- und Neugeborenen kritisch betrachtet werden, und die Narkosedauer sollte so kurz wie möglich sein.

5. Zusammenfassung

In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Substanzen, welche über den GABA_A-Agonismus oder den NMDA-Antagonismus wirken, im Gehirn der neugeborenen Ratte zu neurodegenerativen Effekten führen. Dies wurde unter anderem für Barbiturate und Antiepileptika publiziert. So konnten Jevtovic-Todorovic et al. zeigen, dass eine Anästhesie mit Isofluran, Lachgas und Midazolam im Tiermodell zu einem ausgeprägten Verlust von Neuronen sowie persistierenden Gedächtnis- und Lerndefiziten führt. Es konnte außerdem durch die Arbeitsgruppe um Dzierko gezeigt werden, dass die Applikation von rekombinantem Erythropoietin bei sieben Tage alten Ratten die durch den NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK801 induzierte Apoptose, reduziert. Bei der Anästhesie von Früh- und Neugeborenen wird häufig Propofol benutzt, obwohl es für diese Altersklassen keine Zulassung gibt. Propofol wirkt über eine Aktivierung der GABA_A-Rezeptoren und eine Hemmung der NMDA-Rezeptoren. Deshalb wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Applikation von Propofol bei der neugeborenen Ratte zu einer Neurodegeneration führt, und ob die zusätzliche Applikation von Erythropoietin neuroprotektive Effekte hat.

Bei 3 bis 21 Tage alten Wistar-Ratten wurde eine Anästhesie durch die intraperitoneale Gabe von Propofol in unterschiedlichen Dosierungen durchgeführt. Nach 24 Stunden Überlebenszeit wurden die Tiere getötet und die Rattengehirne wurden mit der DeOlmos-Kupfersilberfärbung oder der TUNEL-Färbung ausgewertet. Die numerische Dichte der degenerierten Zellen wurde in 17 Hirnregionen mittels der stereologischen Dissektionsmethode nach Gundersen bestimmt. Pro Tier wurde ein kumulativer Schädigungsscore summiert und statistisch ausgewertet. Die Kontrolltiere wurden wie die Versuchstiere behandelt, jedoch erhielten sie kein Medikament. Um zu untersuchen, ob die zusätzliche Gabe von Erythropoietin zu einer Reduktion der neurotoxischen Effekte im sich entwickelnden Rattengehirn während einer Narkose mit Propofol führt, erhielt eine Gruppe 5.000 IE und eine weitere Gruppe 20.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht. Die intraperitoneale Gabe von Erythropoietin erfolgte vor der Narkose mit 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht.

In den Hirnschnitten der am sechsten Lebenstag mit 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht behandelten Ratten, fand sich nach 24 Stunden Überlebenszeit eine signifikant erhöhte Anzahl degenerierter Zellen pro mm³ im Vergleich zu den Kontrolltieren, welche kein Medikament erhielten. Es zeigt sich eine Dosisabhängigkeit

des Ausmaßes der neurodegenerativen Wirkung nach der Applikation von Propofol. Die Dosierung von 3 x 20 mg Propofol pro kg Körpergewicht führt zu keinem Unterschied in der Neurodegeneration im Vergleich zu den Kontrollen. Die Dosierung von 3 x 10 mg Propofol pro kg Körpergewicht verursachte eine signifikant niedrigere Neurodegeneration im Vergleich zu den Kontrolltieren. Zusätzlich konnte eine Altersabhängigkeit der Wirkung von Propofol auf das sich entwickelnde Gehirn festgestellt werden. Bei den sechs Tage alten Tieren zeigte sich nach der Gabe von 3 x 30 mg Propofol pro kg Körpergewicht eine signifikant erhöhte Anzahl degenerierter Zellen und bei den 21 Tage alten Tieren zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Kontrolltieren. Die Tiere, die eine Dosis von 5.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht vor der Gabe von Propofol erhielten, zeigten eine signifikant niedrigere Anzahl degenerierter Zellen im Vergleich zu den nur mit Propofol behandelten Tieren. Dagegen zeigten die Tiere, die 20.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht zusätzlich zum Propofol erhielten, keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Anzahl degenerierter Zellen (Summenscore) im Vergleich zu den nur mit Propofol behandelten Tieren.

Zusammenfassend kann mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die Applikation von Propofol im sich entwickelnden Gehirn der Ratte zu dosis- und altersabhängigen neurodegenerativen Effekten führt. Eine Steigerung der Dosis führt zu einer Zunahme der degenerierten Zellen im Gehirn. Zunehmendes Alter führt zu einer Abnahme der Empfindlichkeit gegenüber Propofol. Die zusätzliche Gabe niedriger Erythropoietin-Dosen hob die neurodegenerativen Effekte auf. In wieweit sich dieses Tiermodell auf den Mensch übertragen lässt und ob die Zunahme degenerierter Zellen klinische Folgen in der Entwicklung der Hirnleistungen hat, lässt sich nur durch weitere Studien, insbesondere klinische Verhaltensstudien, klären.

6. Literatur

1. Larsen R, et al. Anästhesie. Elsevier 2006; 8: 1014-1063.
2. Stribel HW, et al. Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin. Schattauer 2005; 6:231-245.
3. Kretz FJ, Schäffer J, et al. Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie. Springer 2006; 4:200-207.
4. Soriano S, Anand K. Anesthetics and brain toxicity, Curr Opin Anaesthesiol 2005; 18: 293-297.
5. Tiret L, Nivoche Y, et al. Complications related to anaesthesia in infants and children: A prospective survey of 40240 anaesthetics. Br J Anaest 1988; 61: 263-269.
6. Braz LG, Módolo NSP, et al. Perioperativ cardiac arrest: a study of 53718 anaesthetics over 9 yr from a Brazilian teaching hospital. Br J Anaest 2006; 96: 569-575.
7. Roewer N, Thiel H, et al. Anästhesie compact. Thieme 2001; 2: 444-9.
8. Rudolph U, Antkowiak B. Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. Neuroscience 2004; 5: 709-720.
9. Olney JW, Ishimaru MJ, et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Apoptosis 2000; 5(6): 515-521.
10. Dikranian K, Ishimaru MJ, et al. Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. Neurobiol Dis 200; 8(3): 359-379.
11. Ikonimidou C, Bittigau P, et al. Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. Science 2000; 287(5455): 1056-1060.
12. Ikonimidou C, Bosch F, et al. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. Science 1999; 283 (5398): 70-74.
13. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. Early Hum Dev 1979; 3(1): 79-83.
14. Ishimaru ML, Ikonimidou C, et al. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. J Comp Neurol 1999; 408 (4): 461-476
15. Burek MJ, Oppenheim RW. Programmed cell death in the developing nervous system. Brain Pathology 1996; 6: 427-446.
16. Olney JW, Chainllie Y, et al. Do pediatric drugs cause developing neurons to commit suicide? Science 2004; 25: 135-139.

17. Bittigau P, Silfringer M, et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 15089-15094.
18. Ikonimidou C, Mosinger JL, et al. Sensitivity of the developing rat brain to hypobaric/ischemic damage parallels sensitivity to N-methyl-aspartate neurotoxicity. *J Neurosci* 1989; 9(8): 2809-2818.
19. Ikonimidou C, Bittigau P, et al. Neurotransmitters and apoptosis in the developing brain. *Biochem Pharmacol* 2001; 62 (4): 401-405.
20. Bittigau P, Silfringer M, et al. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain, *Ann Neurol* 1999; 45(6): 724-35.
21. Linnemann M, Kühl M. *Biochemie für Mediziner*. Springer Verlag 2005; 7. Auflage: 475-477.
22. Kerr JF, Wyllie AH, et al. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.
23. Mazarakis ND, Edwards AD, et al. Apoptosis in neural development and disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997; 77: 165-170.
24. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407: 802-809.
25. Martin DP, Schmidt RE, et al. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. *J Cell Biol* 1988; 106(3): 829-44.
26. Hamburger V, Levi-Montalcini R. Proliferation, differentiation and degeneration in the spinal ganglia of the chick embryo under normal and experimental conditions. *J Exp Zool* 1949; 111(3): 457-501.
27. Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Ann Rev Neurosci* 1991; 14: 453-501.
28. Raff MC. Social control on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 400.
29. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805): 770-776.
30. Grasshoff C, Rudolph U, et al. Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia : the « multi-site and multiple mechanisms » concept. *Curr Opin Anaesthesiol* 2005; 18: 386-391.
31. Lewczuk P, Hasselblatt M, et al. Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport* 2000; 11: 3485-3488.
32. Morishita E, Masuda S, et al. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997; 76: 105-116.

33. Boustany RM, Hannun Y. Apoptosis in Neurobiology: Concepts and Methods. CRC Press 1999; 4.
34. Theilen H, Adam S. Propofol Einsatz in der Intensivmedizin?! Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, TU Dresden 1999; 33-38.
35. Fachinformation Disoprivan. Stand Dezember 2007.
36. Marik PE. Propofol: therapeutic indications and side-effects. *Curr Pharm Des* 2004; 10 (29): 3639-3649.
37. Kay B, Rolly G. I.C.I. 35868, a new intravenous induction agent. *Acta Anaesthesiol Belg* 1977; 28: 303-316.
38. Lawin P, Opderbecke HW, et al. Die geschichtliche Entwicklung der Intensivmedizin in Deutschland. *Anaesthesist* 2000; 49: 130-139.
39. Karow T, Lang-Roth R. Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie; 2004: 446-452.
40. Owens DF, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci* 2002; 3: 715-727.
41. Hofmann E. Medizinische Biochemie systematisch. UNI-MED 2006; 4. Auflage: 745-747.
42. Löffler G, Petrides PE, et al. Biochemie und Pathobiochemie. Springer 2007; 8. Auflage.
43. Metha AK, Ticku MK. An uptake on GABA_A receptors. *Brain Res Rev* 1999; 29: 196-217.
44. Obrietan K, van den Pol AN. GABA neurotransmission in the hypothalamus: development reversal from Ca⁺⁺ elevating to depressing. *J Neurosci* 1995; 15: 5065-5077.
45. Bowery N, Whiting P, et al. The GABA Receptors. *Trends in Pharmacological Sciences*, Oktober 2002
46. Bettler B, Kaupmann K et al. Molecular structure and physiological functions of GABA_B receptors. *Physiol Rev* 2004; 84: 835-867.
47. Rae C, Nasrallah F et al. Now I know my ABC. A systems neurochemistry and functional metabolomic approach to understanding the GABAergic system. *J Neurochem* 2009; 109 (Suppl.1): 109-116.
48. McDonald JW, Silverstein FS, et al. Neurotoxicity of N-methyl-D-aspartate is markedly enhanced in developing rat central nervous systems. *Brain Res* 1988; 459(1): 200-203.

49. Schäfer R, Klett J. Intraocular pressure more reduced during anesthesia with propofol than with sevoflurane: both combined with remifentanyl. *Acta Anaesthesiol Scand* 2002; 46: 703-706.
50. Sator-Katzenschlager S, Deusch E. Sevoflurane and propofol decrease intraocular pressure equally during non-ophthalmic surgery and recovery. *Br J Anaesth* 2002; 89: 764-766.
51. McLeskey CH, Walawander CA, et al. Adverse events in a multicenter phase IV study of propofol: evaluation by anesthesiologists and postanesthesia care unit nurses. *Anesth Analg* 1993; 77 (4): S3-9.
52. Motsch J, Roggenbach J. Propofol-Infusionssyndrom. *Anaesthesist* 2004; 53: 1009-1022.
53. Wappler F. Das Propofol-Infusionssyndrom: Klinik, Pathophysiologie und Therapie einer seltenen Komplikation. *Dtsch Arztebl* 2006; 103(11): A705-10.
54. Sirén AL, Knerlich F, et al. Erythropoietin an erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol* 2001; 101: 271-276.
55. Egrie JC, Browne J, et al. Characterization of recombinant monkey and human erythropoietin. *Prog Clin Biol Res* 1985; 191: 339-350.
56. Kisseleva T, Bhattacharya S, et al. Signaling through JAK / STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene* 2002; 285: 1-24.
57. Juul SE, Yachnis AT, et al. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 1999; 2: 148-158.
58. Marti HH, Wenger RH, et al. Erythropoietin gene expression in human, monkey and murine brain. *Eur J of Neurosci* 1996; 8: 666-676.
59. Bernaudin M, Marti HH, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999; 19: 643-651.
60. Sadamoto Y, Igase K, et al. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarctions in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 253: 26-32.
61. Dame C, Juul SE, et al. The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* 2001; 79: 228-235.
62. Chon ZZ, Kang JQ, et al. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 1107-1118.

63. Dzielko M, Felderhoff-Mueser U, et al. Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2004; 15: 177-187.
64. Abernethy LJ, Palaniappan M, Cooke RW: Quantitative magnetic resonance imaging of the brain in survivors of very low birth weight. *Arch Dis Child* 2002; 87: 279-283.
65. Nosarti C, Al-Asady M, Frangou S, et al. Adolescents who were born very preterm have decreased brain volumes. *Brain* 2002; 125: 1616-1623.
66. Jevtovic-Todorovic V, Hartmann R, et al. Early Exposure to Common Anesthetic Agents Causes Widespread Neurodegeneration in the Developing Rat Brain and Persistent Learning Deficits, *Journal of Neuroscience* 2003; 23(3): 876-882.
67. MacGregor R, Evans D et al. Outcome at 5-6 years of prematurely born children who received morphine as neonates. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998; 79: F40-43.
68. Antunes LM, Roughan JV, et al. Effects of different propofol infusions rates on EEG activity and AEP responses in rats. *J Vet Pharmacol Ther* 2003; 26(5). 369-76.
69. Tung A, Bergmann BM, et al. Recovery from sleep deprivation occurs during propofol anesthesia, *Anesth* 2004; 100(6): 1419-26.
70. Bayona NA, Gelb AW, et al. Propofol neuroprotection in cerebral ischemia and its effects on low-molecular-weight antioxidants and skilled motor tasks. *Anesth* 2004; 100/5: 1151-9.
71. Peratoner A, Nascimento CS, et al. Effects of propofol on respiratory mechanic and lung histology in normal rats. *Br J Anesth* 2004; 92(5): 737-40.
72. Logginidou HG, Li BH, et al. Propofol suppresses the cortical somatosensory evoked potential in rats. *Anesth Analg* 2003; 97(6): 1784-8.
73. Solarogul I, Okutan O, et al. Maternal treatment with propofol attentues lipid peroxidation after transient intrauterine ischemia in the neonatal rat brain. *Biol Neonate* 2004; 85/4: 221-4.
74. Olmos JS, Ingram WR. An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration. *Brain Res* 1971; 33(2): 523-529.
75. Murahashi H, Azuma H, et al. Possible contribution of apoptois-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *J Leukoc Biol* 2003; 73: 399-406.

76. Walker PR, Weaver VM, et al. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res* 1994; 213: 100-106.
77. Gavrieli Y, Sherman Y, et al. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119(3): 493-501.
78. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, et al. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; 21(5): 1465-1468.
79. Gundersen HJG, Bendtsen TF, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988; 96: 379-394.
80. Swanson LW. *Structure of the Rat Brain*. Elsevier 1992.
81. Sherwood NM, Timiras PS. *A stereotaxic atlas of the developing rat brain*. Berkely: University of California Press, 1970.
82. Fredriksson A, Pontén E, et al. Neonatal exposure to a combination of NMDA- and GABA_A-receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology* 2007; 107(3): 427-36.
83. Porter AG and Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 99-104.
84. Ikonomidou C, Bosch F, et al. Blockade of glutamate receptors triggers apoptotic neurodegeneration in infant brain. *Science* 1999; 283: 70-74.
85. Young C, Jevtovic-Todorovic V, et al. Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol* 2005; 142(2): 189-97.
86. Bittigau P, Silfringer M, et al. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 15089-15094.
87. Cattano D, Young C, et al. Subanesthetic doses of propofol induce neuroapoptosis in the infant mouse brain. *Anesth Analg* 2008; 106(6): 1712-4.
88. Mellon RD, Simone AF, et al. Use of anesthetic agents in neonates and young children. *Anesth Analg* 2007; 28(8): 509-520.
89. Jevtovic-Todorovic V, Beals J, et al. Prolonged exposure to inhalation anesthetic nitrous oxide kills neurons in adult brain. *Neuroscience* 2003; 122: 609-616.
90. Koerner I, Brambrink A. Brain protection by anesthetic agents. *Curr Opin Anaesthesiol* 2006; 19: 481-486.

91. Adembri C, Venturi L et al. Neuroprotective effects of propofol in models of cerebral ischemia: inhibition of mitochondrial swelling as a possible mechanism. *Anesthesiology* 2006; 104: 80-89
92. Pesic V, Milanovic D, et al. Potential mechanism of cell death in the developing rat brain induced by Propofol anesthesia. *Int J Devl Neuroscience* 2009; 27: 279-287.
93. Zou X, Patterson TA, et al. Potential neurotoxicity of ketamin in the developing rat brain. *Toxicol Sci* 2009; 108/1: 149-58.
94. Hayashi H, Dikkes P, Soriano SG. Repeated administration of ketamine may lead to neuronal degeneration in the developing rat brain. *Pediatric Anesthesia* 2002; 12(9): 770–774.
95. Scallet AC, Schmued LC et al. Developmental neurotoxicity of ketamine: morphometric confirmation, exposure parameters, and multiple fluorescent labeling of apoptotic neurons. *Toxicol Sci* 2004; 81:364-70.
96. Bercker S, Bert B, et al. Neurodegeneration in newborn rats following propofol and sevoflurane anesthesia. *Neurotox Res* 2009; 16(2): 140-147.
97. Kumral A, Yilmaz O, et al. Neuroprotective Effect of Erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* 2003; 83: 224-228.
98. Sirén, Fratelli M, et al. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci* 2001; 98: 4044-4049.
99. Kaindl AM, Silfringer M, et al. Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol* 2008; 64(5): 523-534.
100. Xiong Y, Lu D, et al. Effects of erythropoietin on reducing brain damage and improving functional outcome after traumatic brain injury in mice. *J Neurosurg* 2008; 109(3): 510-21.
101. Liao ZB, Zhi XG, et al. Recombinant human erythropoietin administration protects cortical neurons from traumatic brain injury in rats. *Eur J Neurol* 2008; 15(2): 140-9
102. Dzierko M, Felderhoff-Mueser U, et al. Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2004; 15(2): 177-87.
103. Clancy B, Darlington RB, Finlay BL. Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 2001; 105: 7-17.
104. Soriano SG, Anand KJ, et al. Of mice and men: should we extrapolate rodent experimental data to the care of human neonates? *Anesthesiology* 2005; 102: 866-868.

105. Anand KJ, Soriano SG, et al. Anesthetics agents and the immature brain: are these toxic or therapeutic? *Anesthesiology* 2004; 101: 527-530.
106. Wise-Faberowski L, Raizada MK, et al. Oxygen and glucose deprivation-induced neuronal apoptosis is attenuated by halothane and isoflurane. *Anesth Analg* 2001; 93: 1281-1287.

7. Verzeichnisse

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Effekte von Anästhetika auf Liganden-gesteuerte Ionenkanäle.....	12
Abb. 1.2: Die Periode des rapiden Hirnwachstums „Brain growth spurt period“	13
Abb. 1.3: Die molekularen Interaktionen während der Apoptose mit der Darstellung des intrinsischen und des extrinsischen Wegs.....	17
Abb. 1.4: 2,6-Diisopropylphenol, C ₁₂ H ₁₈ O	18
Abb. 1.5: Übersicht über wichtige Wirkungen von Propofol	20
Abb. 1.6: Schematische Darstellung des GABA _A -Rezeptors und der Angriffsstellen verschiedener Medikamente	21
Abb. 1.7: Darstellung des Glutamat (NMDA)-Rezeptors.....	22
Abb. 1.8: Molekularer Aufbau des nicotinischen Acetylcholin-Rezeptors	23
Abb. 2.1: Gehirn einer sechs Tage alten Ratte nach Fixation und Präparation aus dem Schädel.....	34
Abb. 2.2: koronare Grobschnitte, links vordere Hirnhälfte, rechts hintere Hirnhälfte	35
Abb. 2.3: Grobschnitte in Agar-Blöcken, links die vordere Hirnhälfte, rechts die hintere Hirnhälfte.....	35
Abb. 2.4: coronare Schnitte der vorderen Hirnhälfte auf einem Objektträger, nach der Silberfärbung.....	37
Abb. 2.5: coronare Schnitte der hinteren Hirnhälfte auf einem Objektträger, nach der Silberfärbung.....	38
Abb. 3.1: Hirnschnittpräparate	43
Abb.3.2: Numerische Dichte degenerierter Neuronen pro mm ³ bei sechs Tage alten Ratten (Propofol 3 x 30 mg/kg Körpergewicht) vs. Kontrollen.....	44
Abb.3.3: Gewichtsänderung innerhalb von 24 Stunden nach dem Versuchsbeginn bei der sechs Tage alten Ratte	45

Abb. 3.4: Numerische Dichte degenerierter Neuronen pro mm^3 bei sechs Tage alten Ratten (Propofol 3 x 10 mg/kg Körpergewicht vs. Kontrollen).....	48
Abb. 3.5: Numerische Dichte degenerierter Neuronen pro mm^3 bei sechs Tage alten Ratten (Propofol 3 x 20 mg/kg Körpergewicht)	48
Abb. 3.6: Neuroprotektive Wirkung von 5.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht vor der Gabe von Propofol	52
Abb. 3.7: Wirkung von 20.000 IE Erythropoietin pro kg Körpergewicht vor der Gabe von Propofol.....	53

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Dosisfindung	31
Tabelle 2.2: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Dosisabhängigkeit....	32
Tabelle 2.3: Übersicht über die durchgeführten Experimente zur Altersabhängigkeit. ...	32
Tabelle 2.4: Übersicht über die durchgeführten Experimente zum Einfluss von Erythropoietin auf die Wirkung von Propofol.....	33
Tabelle 3.1: Neurotoxische Wirkung von Propofol im sich entwickelnden Rattengehirn	44
Tabelle 3.2: Dosisabhängigkeit der neurotoxischen Wirkung von Propofol im sich entwickelnden Rattengehirn.	46
Tabelle 3.3: Altersabhängigkeit der neurotoxischen Wirkung von Propofol im sich entwickelnden Rattengehirn.	49
Tabelle 3.4: Reduktion der neurotoxischen Wirkung von Propofol im sich entwickelnden Rattengehirn durch die Gabe von Erythropoietin.	51

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
Apaf	<i>Apoptosis Protease Activating Factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BDNF	<i>Brain-derived neurotrophic factor</i>
bidest.	bidestilliert
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD 95	Todesrezeptor der Tumornekrosisfaktor-Familie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	deoxy-Uridine-TriPhosphate
g	Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDNF	<i>Glial cell derived neurotrophic factor</i>
h	Stunde
HIF-1	hypoxia-inducible factor 1
IE	Internationale Einheit
IGF	<i>insulin-like growth factors</i>
i.v.	intravenös
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
l	Liter
M	Molar
M \pm SEM	Mittelwert \pm Standardfehler
mg	Milligramm
Min	Minute
MK 801	Dizocilpin (NMDA-Rezeptor-Antagonist)
ml	Milliliter
mm	Millimeter

mM	Millimolar
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mm ³	Kubikmillimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
µm	Mikrometer
Na	Natrium
nACh-Rezeptor	nicotinischer Acetylcholin-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NH ₃	Ammoniak
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
O ₂	Sauerstoff
PÄD-II	Jonosteril päd II, Standardelektrolytlösungen
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
s.c.	subkutan
Ser	Serin
TdT-Enzym	terminal deoxynucleotyl Transferase
Thr	Threonin
TIVA	totale intravenöse Anästhesie
TNF-α	Tumornekrosefaktor
TUNEL	<i>terminal transferase mediated dUTP-biotin nick end labeling</i>
Tyr	Tyrosin
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
5-HT ₃	Serotonin
%	Prozent
°	Grad
°C	Grad Celsius

8. Anhang

8.1 Lebenslauf

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

8.2 Publikationen und Kongressbeiträge

- Bercker S, Bert B, Bittigau P, Felderhoff-Müser U, Bühner C, Ikonomidou C, Weise M, Kaisers UX, Kerner T: Neurodegeneration in newborn rats following propofol and sevoflurane anesthesia.
Neurotox Res. 2009; 16(2): 140-7
- Weise M, Dreykluft C, Bercker S, Bittigau P, Kerner T: Untersuchung auf neurodegenerative Effekte von Sevofluran und Propofol am Gehirn neugeborener Ratten.
8. Hauptstadtkongress für Anästhesiologie und Intensivtherapie (HAI), Berlin, Deutschland, 2006
- Dreykluft C, Bercker S, Weise M, Bittigau P, Ikonomidou H, Felderhoff-Müser U, Kaisers U, Kerner T: Untersuchung auf cerebrale neurodegenerative Effekte von Sevofluran an neugeborenen Ratten.
Deutscher Anästhesiekongress (DAC), Leipzig, Deutschland, 2006
- Schmidt M, Dzierko M, Bercker S, Dreykluft C, Weise M, Bittigau P, Bühner C, Kerner T: Die neuroprotektive Wirkung von Erythropoietin ist dosisabhängig.
Deutscher Anästhesiekongress (DAC), Leipzig, Deutschland, 2006
- Kammerl A, Bert B, Bittigau P, Bercker S, Dreykluft C, Weise M, Fink H, Kerner T: Verhaltensuntersuchungen nach neonataler Anästhetika-Behandlung von Ratten: Propofol und Sevofluran im Vergleich.
Deutscher Anästhesiecongress, Hamburg, Deutschland, 2007
- Kammerl A, Bert B, Bercker S, Bittigau P, Dreykluft C, Weise M, Fink H, Kerner T: Memory impairments in adolescent rats after neonatal anaesthesia.
5th World Congress on Pediatric Critical Care, Genf, Schweiz, 2007

8.3 Danksagung

Mein ausgesprochener Dank gilt Herrn PD Dr. Thoralf Kerner für die freundliche Überlassung des Themas, die fachliche Betreuung und das kritische Lesen des Manuskriptes.

Ebenso möchte ich Frau Prof. Dr. Hrisanthi Ikonomidou danken, dass ich die Möglichkeit hatte meine Promotion in ihrem Labor durchzuführen.

Ferner gilt mein Dank meiner Betreuerin Frau PD Dr. Petra Bittigau und meinem Betreuer Herrn Dr. Sven Bercker, die jederzeit mit ihrem Rat zur Verfügung standen.

Für die Einführung und die Hilfe bei der praktischen Einarbeitung danke ich besonders Frau Dr. Vanya Stefovskaja und Frau Jessica Vöckler.

Außerdem möchte ich Frau Evelyn Strauß danken für die Hilfe bei der TUNEL-Färbung.

Mein ganz besonderer Dank gebührt meiner Familie, insbesondere meinem 2009 verstorbenen Vater. Ihre Liebe, Geduld und stetige Motivation machten diese Arbeit erst möglich.

Ein herzliches Dankeschön an Christiane Dreykluft und Andreas Worms, die mich moralisch unterstützt haben, konstruktive Kritik übten und sehr viel Toleranz zeigten.

8.4 Eidesstattliche Erklärung

Ich, Mirjam Weise, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Neurodegenerative Effekte von Propofol auf das unreife Gehirn der Ratte“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe. Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt worden.

Mirjam Weise

Rostock, den 14.07.2009