

---

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

DISSERTATION

**Evaluation neurodegenerativer Effekte von  
Sevofluran  
im unreifen Gehirn der Ratte**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin  
Berlin

von

Christiane Dreykluff

aus Suhl

---

---

Gutachter/in:

1. Priv.-Doz. Dr. med. T. Kerner

2. Prof. Dr. med. C. Bühner

3. Prof. Dr. med. J. Strauß

Datum der Promotion:

19. November 2010

---

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1	Anästhesie im Kindesalter .....	1
1.1.1	Entwicklung der Kinderanästhesie .....	1
1.1.2	Pharmakologische Besonderheiten im Kindesalter .....	2
1.1.3	Allgemeine Besonderheiten für die Anästhesie von Kindern.....	3
1.2	Wirkmechanismen von Anästhetika.....	4
1.3	Der $\gamma$ -Aminobuttersäure <sub>A</sub> -Rezeptor .....	5
1.3.1	Einfluss von GABA auf die neuronale Entwicklung .....	7
1.4	Apoptose .....	8
1.4.1	Morphologische Merkmale der Apoptose.....	8
1.4.2	Lokalisation physiologischer Apoptosevorgänge im Rattenhirn .....	9
1.4.3	Genetische Regulation der Apoptose.....	9
1.5	Die Phase des rapiden Wachstums des Gehirns .....	10
1.6	Sevofluran .....	11
1.6.1	Entwicklung und Eigenschaften von Sevofluran .....	11
1.6.2	Allgemeine Effekte von Sevofluran auf das Nervensystem.....	12
1.6.3	Sevofluran in der Kinderanästhesie .....	12
1.7	Neurotoxizität von Anästhetika .....	13
1.8	Fragestellungen.....	14
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
2.1	Tierversuche, Versuchsplan, ethische Richtlinien .....	16

---

---

2.2	Perfusion und Gewebepräparation .....	18
2.3	Einbettung, Schnitte .....	19
2.4	De Olmos Kupfer-Silberfärbung .....	20
2.5	TUNEL-Färbung .....	22
2.6	Morphometrie .....	22
2.7	Statistische Auswertung .....	25
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>26</b>
3.1	Fehlender Nachweis neurodegenerativer Effekte durch Sevofluran.....	26
3.1.1	Zeitabhängige Effekte von Sevofluran .....	26
3.1.2	Altersabhängige Effekte von Sevofluran .....	33
3.2	Gewichtsentwicklung nach Sevoflurannarkose.....	36
3.2.1	Abhängigkeit der Gewichtsentwicklung von der Narkosedauer ...	36
3.2.2	Abhängigkeit der Gewichtsentwicklung vom Alter der Tiere .....	38
<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>39</b>
4.1	Allgemeine Betrachtung .....	39
4.2	Potentielle neuroprotektive Effekte von Sevofluran .....	41
4.3	Apoptose während der Hirnentwicklung .....	42
4.4	Wirkmechanismen von Sevofluran .....	43
4.5	Unerwünschte Effekte bei Anwendung von Sevofluran .....	46
4.6	Methodenkritik .....	48
4.6.1	Wirkungen in Abhängigkeit von der Expositionsdauer .....	48
4.6.2	Wirkungen in Abhängigkeit vom Alter der Tiere .....	50

---

---

4.7	Probleme der Anästhesie am Tiermodell.....	50
4.7.1	Dauer der Exposition.....	50
4.7.2	Effekte einer Mangelernährung auf das unreife Gehirn.....	51
4.7.3	Cerebrale Sauerstoffversorgung während der Narkose .....	51
4.7.4	Effekte von Schmerzreizen mit und ohne Anästhetika .....	52
4.8	Klinische Relevanz .....	53
4.8.1	Übertragbarkeit der experimentellen Ergebnisse .....	53
4.8.2	Medikamentenkombinationen in der Anästhesie.....	54
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>55</b>
<b>6</b>	<b>ANHANG.....</b>	<b>57</b>
	Literaturverzeichnis .....	57
	Abbildungsverzeichnis .....	68
	Tabellenverzeichnis .....	70
	Abkürzungsverzeichnis .....	71
	Lebenslauf.....	73
	Danksagung.....	74
	Erklärung.....	75

---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 ANÄSTHESIE IM KINDESALTER

### 1.1.1 ENTWICKLUNG DER KINDERANÄSTHESIE

Primum non nocere (lat.: zuerst einmal nicht schaden) - dieser zentrale Grundsatz hippokratischer Tradition gilt als Maxime für die Anästhesie von Kindern, der vulnerabelsten Patientenpopulation. Trotz des erhöhten Risikos für Komplikationen im Neugeborenen- und Kindesalter müssen Millionen von Kindern weltweit jedes Jahr einer Vollnarkose ausgesetzt werden, um chirurgische Eingriffe zu ermöglichen <sup>[1]</sup>.

Die erste Narkose bei einem Kind wurde 1842 überliefert, als Crawford W. Long, ein Mediziner aus Georgia, an einem achtjährigen Jungen, dem ein Zeh amputiert werden sollte, eine Anästhesie mit Äther durchführte <sup>[2]</sup>. Äther entwickelte sich in den folgenden Jahren zum Anästhetikum der Wahl im Kindesalter. Dieser Erfolg war auf die geringe Gefahr kardiovaskulärer und ventilatorischer Depressionen und toxischer Effekte zurückzuführen. Seit dem ersten übertragenen Fall einer Narkose beim Kind 1842 hat sich die Kinderanästhesie über die Jahre rasch entwickelt. Im Jahre 1847 wurde Chloroform entdeckt und auch für die Anästhesie von Kindern genutzt. Aufgrund einer erhöhten Komplikationsrate hat es sich jedoch als Mononarkotikum nicht etabliert. Im Verlauf wurden Kombinationsnarkosen aus Äther und Chloroform mit unterschiedlichem Erfolg angewandt <sup>[3]</sup>.

Um die Jahrhundertwende wurde Ethylchlorid in die Kinderanästhesie eingeführt. Diese Verbindung ermöglichte eine schnelle Narkoseeinleitung und war bis zur Einführung von Halothan das Einleitungsnarkotikum der Wahl. In den dreißiger Jahren wurde Cyclopropan entwickelt. Da es sich um ein explosives Narkotikum handelte, erforderte es ein geschlossenes Beatmungssystem. Dies beschleunigte die Entwicklung von Systemen, die eine kontrollierte Beatmung am Kind ermöglichten. Zeitgleich wurde Thiopental, welches eine rasche intravenöse Einleitung gewährleistet, eingeführt.

Eine deutliche Verbesserung von Sicherheit und Komfort in der Kinderanästhesie konnte durch die Einführung von Halothan in den fünfziger Jahren verzeichnet werden.

---

Dieses nicht entzündliche Agens verdrängte in den folgenden Jahren einen Großteil zuvor verwendeter Narkotika <sup>[3]</sup>.

Ein weiterer Grundstein der Anästhesie wurde mit der endotrachealen Intubation gelegt, deren Anwendung in den zwanziger Jahren für Patienten im Erwachsenenalter ihre Anfänge nahm. Eine endotracheale Intubation im Kindesalter wurde ab 1945 mit der Herstellung spezieller Tuben möglich <sup>[4]</sup>.

Durch die Weiterentwicklung anästhetischer Substanzen, neuer Technologien und wissenschaftlicher Forschungen ist die pädiatrische Anästhesie in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zu einer zunehmend sichereren Disziplin gewachsen <sup>[5]</sup>. Heute wird eine moderne Kinderanästhesie in der Regel als balancierte Anästhesie oder total intravenöse Anästhesie (TIVA) durchgeführt. Hierbei werden Inhalationsnarkotika von Injektionsnarkotika unterschieden und diese zur Einleitung und Aufrechterhaltung der Narkose genutzt. Sevofluran, ein inhalativ zu applizierendes Anästhetikum, spielt aufgrund seiner guten Atemwegsverträglichkeit und seiner raschen An- und Abflutung in der Kinderanästhesie eine wichtige Rolle.

### **1.1.2 PHARMAKOLOGISCHE BESONDERHEITEN IM KINDESALTER**

Erhebliche Unterschiede zwischen Kindern und Erwachsenen bestehen in der Pharmakokinetik und -dynamik. Dazu gehören beispielsweise Unterschiede in der Zusammensetzung der Körperkompartimente (größerer Extrazellulärraum, geringerer Fettgewebsanteil) und der Verteilung von Pharmaka (geringerer Serum-Albumin-Gehalt) mit folglich Minderung der therapeutischen Breite <sup>[6],[7]</sup>. Bei der Betrachtung inhalativer Anästhetika in der Pädiatrie sind insbesondere folgende Aspekte von Bedeutung:

- Veränderte Membranpermeabilität:  
Durch eine veränderte Membranpermeabilität beim Neugeborenen kann wegen der unreifen Blut-Hirn-Schranke ein größerer Anteil eines Pharmakons in das Gehirn eindringen und dort kumulieren, insbesondere nicht-ionisierte, lipophile Substanzen.
- Eingeschränkte Elimination wasser- und fettlöslicher Pharmaka:  
Diese beruht auf der fortschreitenden Reifung der Leber- und Nierenfunktion. Die

---

Halbwertszeiten lipidlöslicher Stoffe sind wegen der unzureichenden Kapazität der Leber des Neugeborenen und mehr noch des Frühgeborenen zu Glukuronidierung, Sulfatierung und Hydroxylierung von Fremdstoffen teilweise erheblich verlängert. Renal eliminierbare wasserlösliche Stoffe werden in den ersten Lebensmonaten ebenfalls verlangsamt ausgeschieden, da noch nicht alle angelegten Nephrone am Filtrationsprozess beteiligt sind <sup>[8],[9],[10],[11]</sup>.

- Schnelleres An- und Abfluten von Narkosegasen:

Beim Neugeborenen und Säugling ist das Verhältnis von alveolärer Ventilation zur funktionellen Residualkapazität mit 5:1 deutlich höher als das des Erwachsenen. Dies hat ein beschleunigtes An- und Abfluten von Narkosegasen mit daraus folgender schnellerer Veränderung der Narkosetiefe zur Folge <sup>[7],[12]</sup>.

### **1.1.3 ALLGEMEINE BESONDERHEITEN FÜR DIE ANÄSTHESIE VON KINDERN**

Häufig sind die Empfehlungen zur Anwendung neuer Medikamente bei Säuglingen und Kleinkindern sehr zurückhaltend <sup>[13]</sup>. Dies kann nur vereinzelt mit medizinischen Besonderheiten im Kindesalter begründet werden, vielmehr sind medikolegale Überlegungen und der fehlende ökonomische Anreiz der Herstellerfirmen ausschlaggebend <sup>[14]</sup>. Mittlerweile sind einige Anästhetika, die heute häufig zur Narkose von Kindern verwendet werden, in Deutschland zugelassen, jedoch existieren in der Regel kaum Leitlinien wissenschaftlicher Fachgesellschaften.

Die Inhalationsnarkose stellt wegen ihrer einfachen Handhabung und guten Steuerbarkeit ein häufig angewandtes Verfahren in der Kinderanästhesie dar <sup>[15]</sup>. Die Aufnahme und Elimination von Inhalationsnarkotika verläuft, wie im oberen Abschnitt beschrieben, bei kleinen Kindern schneller als bei älteren Kindern und Erwachsenen. Das – bezogen auf das Körpergewicht – größere Herzzeitvolumen würde normalerweise dem raschen Anstieg der alveolären Konzentration entgegenwirken, jedoch wird dieser Effekt durch den größeren Durchblutungsanteil der gefäßreichen Gewebe und die unterschiedlichen Blut-/ Gewebe-Löslichkeitskoeffizienten ausgeglichen. Nach Ablauf der Neugeborenenperiode besteht bei Säuglingen und Kleinkindern ein höherer Dosisbedarf der volatilen Anästhetika als beim Erwachsenen, während bei Früh- und Neugeborenen eine größere Empfindlichkeit besteht und der Bedarf geringer ist als bei Kindern jenseits dieses Lebensalters.

---

Intravenöse Anästhetika können sowohl zur Einleitung als auch zur Aufrechterhaltung einer Narkose eingesetzt werden. Die totale intravenöse Anästhesie (TIVA) wird zunehmend auch bei Kindern eingesetzt <sup>[16]</sup>. Vorteile intravenöser Anästhetika gegenüber Inhalationsnarkotika bestehen unter anderem in einer geringeren Inzidenz von postoperativer Übelkeit, Erbrechen und Unruhe, einer geringeren Umweltbelastung, einer fehlenden Exzitationsphase und einem schnelleren Erwachen nach Narkose. In der Literatur wird außerdem beschrieben, dass kardiovaskuläre Nebenwirkungen insbesondere bei schwerkranken Kindern oder großen Eingriffen, die eine postoperative Intensivbehandlung erfordern, wesentlich geringer sind <sup>[17],[18]</sup>.

Die perioperative Analgesie stellt einen elementaren Bestandteil der Kinderanästhesie dar. Entgegen der früheren Lehrmeinung, dass Analgetika aufgrund des hohen Nebenwirkungspotentials gemieden werden sollten, haben Untersuchungen am Tiermodell gezeigt, dass wiederholte Schmerzreize an neugeborenen Ratten langfristige Verhaltensstörungen zur Folge haben <sup>[19]</sup>. Klinische Studien an beatmeten Früh- und Neugeborenen haben zusätzlich gezeigt, dass eine Schmerzbehandlung mit Opioiden keine erhöhte Mortalität und keine vermehrten neuronalen Entwicklungsstörungen im Vergleich zu Kontrollgruppen zur Folge hat <sup>[20],[21]</sup>.

## 1.2 WIRKMECHANISMEN VON ANÄSTHETIKA

Die gegenwärtig in der klinischen Anästhesiologie eingesetzten Medikamente wirken prinzipiell über folgende Mechanismen <sup>[22]</sup>:

1. Verstärkung der Inhibition, die über  $\gamma$ -Aminobuttersäure<sub>A</sub>-Rezeptoren (GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren) vermittelt wird (z.B. Benzodiazepine, Barbiturate, Propofol, Etomidate, Sevofluran, Isofluran)
2. Verminderung exzitatorischer Funktionen durch Blockade von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDA-Rezeptoren) (z.B. Lachgas, Ketamin, Xenon)
3. agonistische Wirkung auf den  $\mu$ -Opioidrezeptor <sup>[23],[24],[25]</sup>

Die Abbildung 1 zeigt die verschiedenen Bindungsstellen und Effekte häufig in der Anästhesie verwendeter Narkotika an liganden-gesteuerten Ionenkanälen.

	GABA <sub>A</sub> receptor	Glycine receptor	nACh (muscle) receptor	nACh (neuro) receptor	5-HT <sub>3</sub> receptor	AMPA receptor	Kainate receptor	NMDA receptor
Etomidate	Dark Green	Light Green	Light Pink	Light Pink	White			
Propofol	Dark Green	Dark Green	Light Pink	Light Pink	White	Light Pink	White	Light Pink
Barbiturates	Dark Green	Light Green	Light Pink	Dark Pink	Light Pink	Dark Pink	Dark Pink	White
Ketamine	Light Green	White	Light Pink	Dark Pink	Light Green	White	White	Dark Pink
Isoflurane	Dark Green	Dark Green	Light Pink	Dark Pink	Dark Green	Dark Pink	Dark Green	Light Pink
Sevoflurane	Dark Green	Dark Green	Light Pink	Dark Pink				
Nitrous oxide	Light Green	Light Green	Dark Pink	Dark Pink	Dark Pink	Light Pink	Dark Pink	Dark Pink

**Abb. 1: Effekte von Anästhetika an liganden-gesteuerten Ionenkanälen**

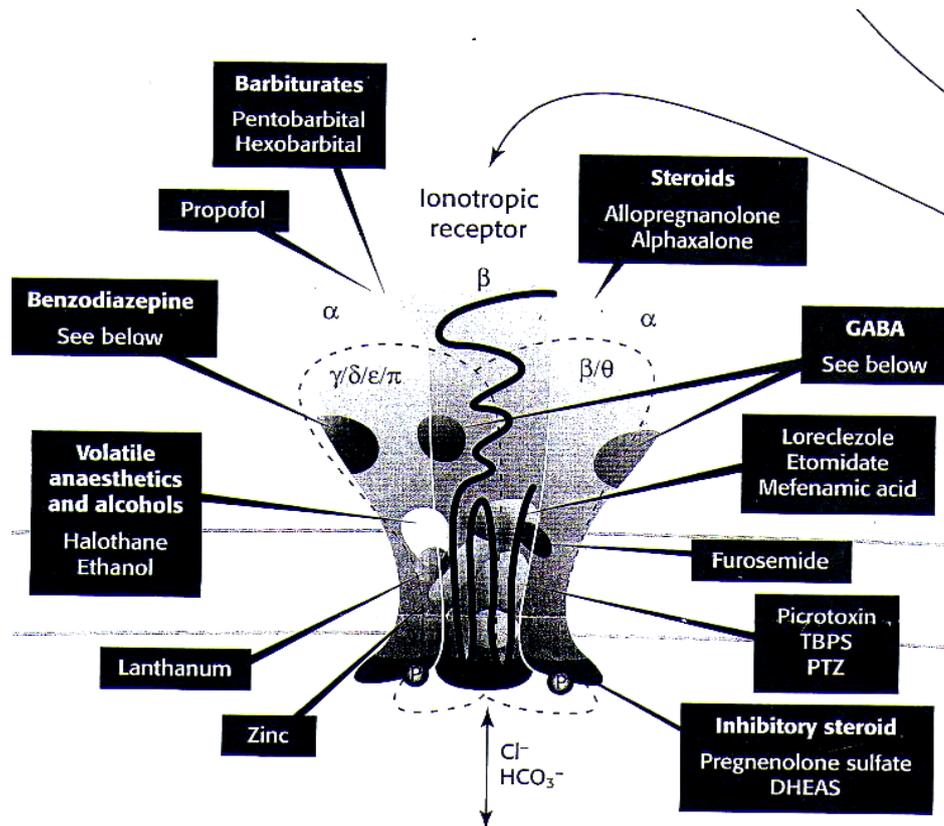
Dunkelgrün: signifikante Verstärkung, pink: signifikante Inhibition, hellgrün und hellrosa: leichte Verstärkung bzw. Inhibition, leeres Feld: kein Effekt unabhängig von der Konzentration [22].

### 1.3 DER $\gamma$ -AMINO BUTTERSÄURE<sub>A</sub>-REZEPTOR

Der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter des adulten Gehirns ist die  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA). Im unreifen Gehirn hat sie u.a. exzitatorische Funktionen und beeinflusst die neuronale Migration und Differenzierung [26]. Der wichtigste GABA-gesteuerte Ionenkanal ist der GABA-Rezeptor vom Typ A (GABA<sub>A</sub>-Rezeptor). Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist ein Ionenkanal-Rezeptor, der an einen Chloridkanal gekoppelt ist. Er ist ein transmembranöses pentamerer Protein, dessen Untereinheiten in unterschiedlicher Ausgestaltung vorkommen und der im Laufe der Hirnentwicklung modifiziert wird [27]. Die einzelnen Rezeptoruntereinheiten innerhalb dieser Superfamilie haben die gleiche Membrantopologie: eine große extrazelluläre aminoterminal Domäne, vier Transmembransegmente (TM1 - TM4), eine intrazelluläre Domäne zwischen TM3 und TM4 (TM3/TM4-Loop) sowie einen extrazellulären Carboxyterminus. Der aminoterminalen Domäne wird die Bindung von Neurotransmittern und verschiedenen Modulatoren zugeschrieben.

Ab der zweiten Lebenswoche führt die Aktivierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors zur Hyperpolarisation und damit zu einer Verminderung des intrazellulären Calciums und

der neuronalen Aktivität [28]. Zu den therapeutisch eingesetzten GABA<sub>A</sub>-Agonisten gehören unter anderem Barbiturate, Benzodiazepine und halogenierte Kohlenwasserstoffe, wie die inhalativen Anästhetika und Propofol [29],[30]. Abbildung 2 zeigt die Bindungsstellen verschiedener Medikamente an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten. Volatile Anästhetika binden an die α-Untereinheit des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Komplexes**

Dargestellt sind die Bindungsstellen für GABA, Benzodiazepine, Barbiturate, Propofol, volatile Anästhetika, Alkohol, u.a. (Bowery N, Whiting P, Wafford K: The GABA Receptors. Trends in Pharmacological Sciences, Oktober 2002). GABA = γ-Aminobuttersäure, TBPS = t-Butylbicyclophosphorothionat, PTZ = Pentylenetetrazol, DHEAS = Dehydroepiandrosteronsulfat, Benzodiazepine: Agonisten: Diazepam, Flunitrazepam, Zolpidem, Antagonist: Flumazenil

---

### 1.3.1 EINFLUSS VON GABA AUF DIE NEURONALE ENTWICKLUNG

GABA wird als der wichtigste inhibitorische Transmitter im entwickelten Gehirn angesehen, allerdings spielt dieser Botenstoff während der frühen Entwicklung eine andere Rolle. Während der frühen Hirnentwicklung agiert er als ein Wachstumsfaktor, um Abläufe wie Proliferation, Migration, Differenzierung, Synapsenreifung und Zelltod zu beeinflussen <sup>[26],[31],[32]</sup>. Während der frühen Entwicklung ist die Chloridkonzentration in den Nervenzellen hoch. Durch das Vorhandensein von GABA kommt es durch Öffnung von Chloridkanälen zur Depolarisation, GABA wirkt exzitatorisch.

Während der Reifung der Nervenzellen kommt es an GABA-Rezeptoren bei Anwesenheit von GABA zu einer Hyperpolarisation. Diese Umschaltung von einem exzitatorischen zu einem inhibitorischen Transmitter ist auf die Expression eines Kaliumchlorid-Cotransporters (KCC2) zurückzuführen, der um die Geburt im Hirnstamm, eine Woche nach der Geburt im Hippocampus und eine bis zwei Wochen nach Geburt im Kortex von Ratten nachweisbar ist. Eine Downregulation von KCC2 kann infolge von traumatischen Hirnverletzungen zu einer Induktion epileptischer Aktivität aufgrund einer Dysfunktion GABAerger Inhibition führen [33][34].

Da GABA eine wichtige trophische Rolle während der frühen Hirnentwicklung spielt, kann eine Beeinträchtigung der Funktion der GABAergen Transmission während dieser Periode die Entwicklung neuronaler Vernetzungen und die Plastizität neuronaler Netzwerke erheblich beeinträchtigen.

Ethanol interagiert unter anderem mit dem GABA<sub>A</sub> Rezeptor. Das empfindliche Zeitfenster für Ethanolexposition liegt im Kortex der Ratte zwischen dem dritten und 10. Tag der Schwangerschaft. Genau während dieser Zeit scheint GABA hauptsächlich depolarisierende und trophische Effekte auf die Zellproliferation sich entwickelnder kortikaler Neurone zu haben. Beim Menschen zeigen sich intellektuelle Defizite, entstanden durch Abweichungen der Hirngröße, als die wichtigste Komponente des Fetalen-Alkohol-Syndroms <sup>[35]</sup>. Kraniofaziale Anomalien in menschlichen Feten, die in Beziehung zu Alkoholexposition im ersten Trimester der Schwangerschaft stehen, sind fazialen Defekten, wie sie bei Mäusen mit Mutationen im  $\beta$ -3 GABA<sub>A</sub>-Rezeptor zu sehen sind, sehr ähnlich.

---

## 1.4 APOPTOSE

Man unterscheidet die klassische Form des akuten exzitatorischen Zelltodes, welcher durch rapides Anschwellen von Dendriten, Zellkörpern und intrazytoplasmatischen Organellen, Kernfragmentation und Lyse der Zelle gekennzeichnet ist, von der Apoptose. Bei dieser handelt es sich um eine verzögerte Form des Zelltodes, die physiologisch in der Entwicklung auftritt und eine wichtige Funktion in der Entwicklung des zentralen Nervensystem darstellt. Während der Entwicklung des Zentralnervensystems kommt der Apoptose eine Schlüsselfunktion zu. Der aktive Zelltod stellt dabei den Mechanismus zur Elimination unbrauchbarer Neurone in der Organogenese dar.

### 1.4.1 MORPHOLOGISCHE MERKMALE DER APOPTOSE

Morphologische Veränderungen des apoptotischen Zelltodes wurden erstmals 1972 von Kerr und Mitarbeitern in Leberzellen beschrieben <sup>[36]</sup>. Sie beschrieben Apoptose als einen physiologischen, aktiven Prozess des Zelltodes, welcher spezifische morphologische Formen aufweist und unter einer Vielfalt von Umständen auftritt.

Ishmaru et al. studierten im Gehirn zwei Tage alter Ratten den Ablauf der ultrastrukturellen Veränderungen von Neuronen, welche im Rahmen der physiologischen Apoptose degenerieren <sup>[37]</sup>. Zunächst schrumpfen die apoptotischen Zellen, wobei die Zellintegrität erhalten bleibt. Es kommt zu einem Lösen der Zellkontakte, das Nucleoplasma und das Zytoplasma kondensieren und der Zellkern schrumpft. Diesen Vorgang bezeichnet man als Karyopyknose. Die DNA des Kerns wird in etwa 180 Basenpaarstücke fragmentiert. Die beim Zerfall der Zelle entstehenden Fragmente bezeichnet man als Apoptosekörperchen („apoptotic bodies“), welche anschließend phagozytiert werden. Eine Entzündungsreaktion in der Umgebung bleibt aus, da es nicht zu einer Freisetzung proinflammatorischer Zellbestandteile kommt. Anhand dieser elektronenmikroskopisch beobachtbaren morphologischen Kriterien kann man die Apoptose von der Nekrose abgrenzen <sup>[38]</sup>.

---

### 1.4.2 LOKALISATION PHYSIOLOGISCHER APOPTOSEVORGÄNGE IM RATTENHIRN

Der physiologische Zelltod im fetalen Rattenhirn beschränkt sich auf die Keimmatrixzonen und niedere Hirnzentren <sup>[37]</sup>. Zwischen dem ersten bis fünften Lebenstag, d.h. im frühen Neugeborenenalter, werden apoptotisch degenerierende Zellen im Mittel- und Frontalhirn außerhalb der Keimmatrix nachgewiesen. Am zweiten Lebenstag lässt sich physiologische Zelldegeneration am besten in der Nähe der Ventrikel und des Aquädukts beobachten. Bereits am zehnten postnatalen Tag finden kaum noch physiologische Zelltodvorgänge statt.

### 1.4.3 GENETISCHE REGULATION DER APOPTOSE

Die apoptotische Zelltodkaskade kann entweder über einen rezeptorvermittelten, extrinsischen Weg oder über einen intrinsischen Weg in Gang gesetzt werden <sup>[38]</sup>.

Die Aktivierung über den extrinsischen Weg findet durch Bindung von Liganden an sogenannte „Death Receptors“ statt. So bindet beispielsweise der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) an den TNF-Rezeptor oder der Fibroblast associated Ligand (Fas) als ein Mitglied der TNF-Zytokin-Familie an seinen spezifischen Oberflächenrezeptor <sup>[39],[40],[41]</sup>. Daraufhin wird eine Kaskade in Gang gesetzt: Es erfolgt die Trimerisation des Rezeptors mit Bildung einer Todesdomäne, der sogenannten „death domain“ und eines „death inducing signalling complex“ (DISC), welcher wiederum durch Adaptermoleküle und Enzyme das apoptotische Programm weitervermittelt. Eine wichtige Rolle im apoptotischen Kaskadensystem spielen die Caspasen. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die als intrazelluläre Vermittler fungieren <sup>[42],[43]</sup>. Das Schlüsselenzym der Fas-induzierten Apoptose ist die Caspase 8, welche weitere Caspasen, sogenannte Effektorcaspasen, für die Exekution der Zelle aktiviert.

Die apoptotische Kaskade kann alternativ auch über den intrinsischen Weg aktiviert werden. Beispiele für eine intrinsische Aktivierung sind Induktion von Strangbrüchen der DNA bei Bestrahlung, Zellschädigung durch freie Radikale im Rahmen von oxidativem Stress oder Entzug des Wachstumsfaktors *nerve growth factor* (NGF). Dies führt zu einer Änderung des mitochondrialen Membranpotentials. Als Folge wird Cytochrom C aus den Mitochondrien in das Zytoplasma ausgeschüttet. Es kommt zu einer Komplexbildung von Cytochrom C mit Apoptotic-Protease-Activating-Factor (Apaf-1)

---

und Caspase 9. Dieser Komplex aktiviert in der Folge Caspase 3. Diese Schlüsselprotease ist in der Lage, Proteine zu schneiden und Endonukleasen zu aktivieren und fungiert somit als Endglied der apoptotischen Signaltransduktionskaskade <sup>[44]</sup>. Caspase 3 gilt in den meisten experimentellen Schädigungsmodellen als sogenannter „point of no return“ innerhalb der apoptotischen Kaskade <sup>[45]</sup>.

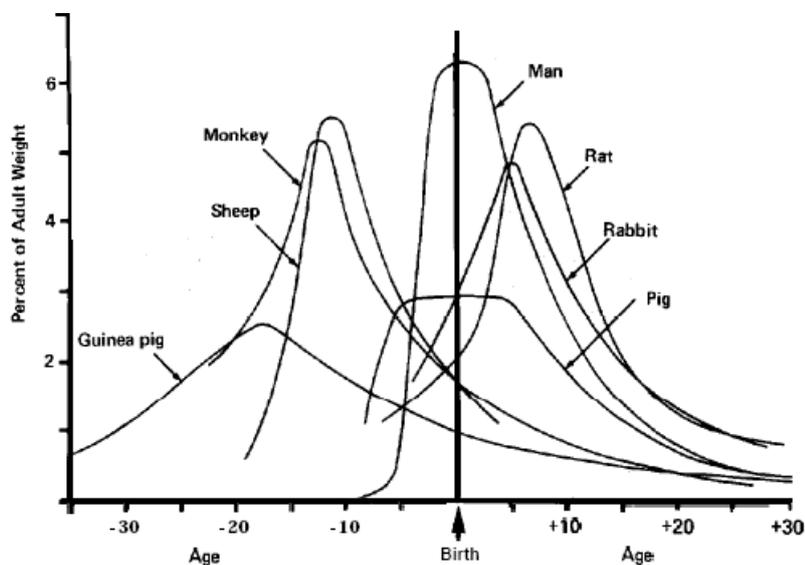
## 1.5 DIE PHASE DES RAPIDEN WACHSTUMS DES GEHIRNS

Das reifende Gehirn durchläuft eine Phase des rapiden Hirnwachstums, in welcher es besonders empfänglich auf externe Noxen reagiert, welche zur Nervenzelldegeneration führen, die pathologische Ausmaße und bleibende Schäden verursachen kann. In diesem Zeitraum findet zum einen die Differenzierung und Migration von Nerven- und Gliazellen, zum anderen die Synaptogenese, sprich die Verknüpfung von Synapsen, statt. Physiologisch kommt es in dieser Phase zu erhöhten apoptotischen Vorgängen im Nervenzellsystem. Im Rahmen dieses rapiden Wachstums reagiert das Gehirn besonders auf Schädigungen wie Mangelernährung <sup>[46]</sup>. Diese vulnerable Phase des Hirnwachstums hat, bezogen auf den Zeitpunkt der Geburt, bei verschiedenen Tierspezies unterschiedliche Zeitverläufe.

Dobbing beschrieb diese Periode bereits 1974 als „brain growth spurt period“ <sup>[47]</sup>. Die Lebensphase, die mit diesem rapiden Hirnwachstum korreliert, findet bei verschiedenen Spezies zu unterschiedlichen Zeiten statt. Beim Menschen umfasst sie die Perinatalzeit, welche vom letzten Trimenon der Schwangerschaft, beginnend in der 23. Schwangerschaftswoche, bis zum Beginn des dritten Lebensjahres des Kleinkindes verläuft. Die Hirnwachstumsgeschwindigkeit folgt einem sigmoiden Kurvenverlauf und ist zum Zeitpunkt der Geburt am höchsten. In Abbildung 3 sind die Perioden des rapiden Hirnwachstums am Beispiel des Meerschweinchens, des Schafes, des Affen, des Menschen, der Ratte, des Kaninchens und des Schweines graphisch dargestellt.

Um Phänomene zu simulieren, die sich im menschlichen Gehirn während der Periode des rapiden Hirnwachstums abspielen, wird die Ratte während der vergleichbaren ontogenetischen Phase als Tiermodell benutzt. Bei der Ratte beginnt die Phase des rapiden Hirnwachstums postnatal und umfasst die drei ersten Lebenswochen. Die

maximale Hirnwachstumsgeschwindigkeit bei der Ratte wird zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag beobachtet.



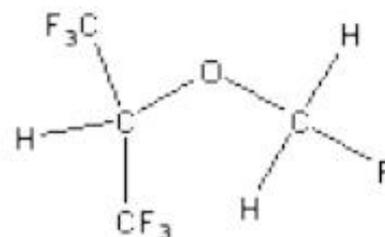
**Abb. 3: Die Periode des rapiden Hirnwachstums „Brain growth spurt period“ beim Menschen**

(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)

## 1.6 SEVOFLURAN

### 1.6.1 ENTWICKLUNG UND EIGENSCHAFTEN VON SEVOFLURAN

Sevofluran wurde 1995 in Deutschland in die Klinik eingeführt. Bislang wurden weltweit weit über 200 Millionen Narkosen mit Sevofluran durchgeführt <sup>[48]</sup>. Es handelt sich hierbei um ein gut steuerbares und nebenwirkungsarmes Inhalationsnarkotikum <sup>[49]</sup>. Sevofluran ist ein halogener Methyl-Äther (Fluormethyl-2,2,2-trifluor-1-(trifluormethyl)äthyl-Äther). Die Strukturformel von Sevofluran ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 4: Strukturformel Sevofluran**

---

Im Vergleich zu anderen halogenierten Inhalationsnarkotika hat Sevofluran keine atemwegsirritierenden Effekte und einen angenehmen Geruch. Aus diesem Grund ist es zur Narkoseeinleitung bei Kindern besonders gut geeignet. Es hat einige weitere Vorteile gegenüber älteren Inhalationsanästhetika, z.B. in Hinblick auf seine molekulare Stabilität, die vergleichsweise niedrigere Arrhythmogenität und Kardiodepressivität und seine große therapeutische Breite. Sevofluran beeinflusst die zerebrale Perfusion kaum und zeigt wenig Organtoxizität<sup>[30]</sup>.

### **1.6.2 ALLGEMEINE EFFEKTE VON SEVOFLURAN AUF DAS NERVENSYSTEM**

Sevofluran senkt den zerebralen Sauerstoffverbrauch um ca. 50%. Unter Sevofluran ist der zerebrale Blutfluss konstant oder nur gering vermindert, die Autoregulation und CO<sub>2</sub>-Reagibilität der Hirngefäße bleiben erhalten.<sup>[48], [50]</sup>

Sevofluran bewirkt eine dosisabhängige Blockade der zentralen Reizverarbeitung, des Elektroenzephalogramms und der reizevozierten EEG-Signale. Als molekularer und zellulärer Mechanismus neuronaler Wirkungen volatiler Anästhetika wird zum Teil eine unspezifische, lipophile Wechselwirkung mit Lipidmembranen und spannungsabhängigen Ionenkanälen angenommen. Volatile Anästhetika haben zusätzlich eine bedeutende Wirkung auf durch Liganden aktivierte postsynaptische inhibitorische Ionenkanäle. In diesem Zusammenhang kommt dem inhibitorischen GABA-Rezeptorsystem eine besondere Bedeutung zu. So konnte für Sevofluran in klinischen Konzentrationen eine reversible, dosisabhängige Aktivierung der GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>B</sub> induzierten Hemmung der Area CA1 des Hippokampus der Ratte aufgezeigt werden<sup>[50]</sup>.

### **1.6.3 SEVOFLURAN IN DER KINDERANÄSTHESIE**

Angesichts der günstigeren pharmakokinetischen Eigenschaften, der geringeren kardialen Nebenwirkungen gegenüber anderen Inhalationsnarkotika und der fehlenden Atemwegsreizung wird Sevofluran häufig zur Narkoseeinleitung und -aufrechterhaltung bei Kindern eingesetzt<sup>[11]</sup>. Neben allgemeinen unerwünschten Medikamentenwirkungen wie Übelkeit, Erbrechen, Husten, Fieber, Frösteln, Bradykardie, Tachykardie, Erniedrigung oder Erhöhung des Blutdrucks, verstärktem Speichelfluss, respiratorischer Beschwerden, Kopfschmerzen oder Hypothermie sind unter der Anwendung von

---

Sevofluran in der Kinderanästhesie einige spezifische Nebenwirkungen zu beachten. Dazu gehören z.B. das Exzitationssyndrom <sup>[51],[52]</sup>, maligne Hyperthermie, Krampfanfälle und postoperative Unruhezustände <sup>[52],[53],[54]</sup>.

## 1.7 NEUROTOXIZITÄT VON ANÄSTHETIKA

In den letzten Jahren wurden verschiedene Langzeitstudien zur neuronalen Entwicklung kritisch kranker Neugeborener durchgeführt. Diese Patienten mussten komplizierten chirurgischen Eingriffen wie z.B. der Versorgung einer Ösophagusatresie, der Ligatur eines offenen Ductus arteriosus oder neurochirurgischen Prozeduren, die eine Anästhesie erforderten, ausgesetzt werden. Hierbei wurde die neuropsychologische Entwicklung der behandelten Kinder durch validierte neurokognitive Beurteilungsmethoden ausgewertet. Neuronale Langzeitschädigungen wie beispielsweise ein verminderter Intelligenzquotient, das Auftreten cerebraler Lähmungen, Taubheit oder Blindheit wurden dabei gehäuft beobachtet <sup>[55],[56],[57],[58]</sup>. In den zitierten Untersuchungen wurden die Patienten einer ganzen Reihe von Stressoren zusätzlich zur durchgeführten Anästhesie unterzogen. Die Ursache der beschriebenen Entwicklungsverzögerungen konnte somit nicht weiter spezifiziert werden. Ebenso existieren keine Studien zur neuronalen Entwicklung gesunder Neugeborener und Kinder, die eine elektive chirurgische Intervention erfuhren <sup>[58]</sup>.

Obwohl das Anästhesieregime in den oben beschriebenen Studien nicht systematisch beschrieben wurde, existieren einige Studien an Mensch und Tier, die die Effekte einzelner Anästhetika auf die neuronale Struktur bzw. die neuronale Entwicklung dosisabhängig beschreiben.

1999 konnte gezeigt werden, dass die Applikation von NMDA-Rezeptor-Antagonisten während der Phase der frühen Hirnentwicklung neurotoxische Effekte auslösen kann <sup>[59]</sup>. Studien an sieben Tage alten Ratten ergaben, dass die repetitive intraperitoneale Injektion des NMDA-Rezeptor-Antagonisten Dizocilpin (MK-801) im unreifen Rattenhirn zu ausgedehnter apoptotischer Neurodegeneration in TUNEL- und Silberfärbungen führt. In dieser Studie wurden außerdem andere NMDA-Antagonisten, einschließlich Ketamin, auf potentielle neurotoxische Effekte im unreifen Rattenhirn getestet. Die repetitive Applikation von Ketamin in einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht führte ebenso wie MK-801 zu ausgedehnter Apoptose im Gehirn der sich entwickelnden

---

Ratte. Eine Dosisreduktion des Ketamins auf 10 mg/kg Körpergewicht bei sonst gleichem Versuchsaufbau hatte hingegen keine Erhöhung der neuronalen Apoptoserate im sieben Tage alten Rattentier zur Folge. Ebenso zeigte die einmalige intraperitoneale Applikation von Ketamin in der Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht keine neurodegenerativen Effekte im Rattenhirn. Scallet et al. bestätigten diese Ergebnisse [60]. Diese stellten eine Beziehung zwischen der Konzentration von Ketamin im Blut und dem Ausmaß der Neurotoxizität her. Viele anästhetische Substanzen wurden in den letzten Jahren auf potentielle neurotoxische Effekte im unreifen Gehirn der Ratte untersucht. Hierbei konnten in verschiedenen Studien dosisabhängig erhöhte Neuroapoptoseraten nach Applikation von Clonazepam, Diazepam, Pentobarbital, Phenobarbital und Isofluran nachgewiesen werden [61],[62],[63],[64].

Jevtovic-Todorovic et al. erzeugten Neuroapoptose in neugeborenen Ratten durch eine sechs Stunden andauernde Kombinationsnarkose bestehend aus Midazolam, Lachgas und Isofluran. Neben einem ausgeprägten Verlust von Neuronen führte die Applikation dieser Anästhetika zu persistierenden Gedächtnis- und Lerndefiziten im unreifen Gehirn der Tiere [65].

## 1.8 FRAGESTELLUNGEN

Enorme Fortschritte in der Neonatologie haben in den vergangenen Jahren zu einem vermehrten Überleben von Früh- und Neugeborenen geführt. Allerdings leidet ein Teil von ihnen unter neurologischen Auffälligkeiten und motorischen oder kognitiven Defiziten, die radiologisch mit einem verminderten Volumen der grauen Substanz des Gehirns einhergehen können [66],[67]. Hypoxie, Ischämie und Infektionen werden differentialdiagnostisch erwogen, der eigentliche Auslöser bleibt jedoch häufig unklar.

In verschiedenen Untersuchungen wurde bereits gezeigt, dass Substanzen, die über eine Aktivierung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren oder über eine Blockade von NMDA-Rezeptoren wirken, neurodegenerative Effekte im Gehirn neugeborener Ratten auslösen können [59],[60],[61],[62],[68], darunter Barbiturate und Neuroleptika. Auch eine Kombinationsnarkose mit Isofluran, Lachgas und Midazolam bewirkt im Tiermodell einen Nervenzelluntergang durch Induktion von Apoptosemechanismen [65]. Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass volatile Anästhetika wie zum Beispiel Sevofluran mit den oben genannten Wirkmechanismen einen neuronalen Zelluntergang

---

durch Apoptoseinduktion im unreifen Gehirn der neugeborenen Ratte herbeiführen könnten.

Die folgende Arbeit soll somit die folgenden Fragestellungen untersuchen:

- Wirkt Sevofluran im sich entwickelnden Gehirn der Ratte neurotoxisch ?
- Ist diese Wirkung von Sevofluran abhängig von der Expositionsdauer ?
- Ist diese Wirkung von Sevofluran abhängig vom Alter der Tiere ?

---

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 TIERVERSUCHE, VERSUCHSPLAN, ETHISCHE RICHTLINIEN

Für die Untersuchungen wurden Wistar-Ratten verwendet (Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BGVV)). Die Tierexperimente wurden am 02.09.2004 vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin genehmigt (Genehmigungsnummer: G 0144/04) und erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen der Society for Neuroscience (Society for Neuroscience, Policy on Ethics). Die Tiere wurden in pathogenfreien Räumen artgerecht gehalten und versorgt.

Es wurden null, drei, sechs und 21 Tage alte Tiere untersucht. Während des Versuches wurden die Jungtiere vom Muttertier getrennt. Die Tiere wurden randomisiert in Versuchs- und Kontrolltiere eingeteilt. Anschließend wurden die Versuchstiere in eine mit Einstreu ausgelegte Inkubationskammer (Billups-Rothenberg Inc., Del Mar, USA; Ø 31cm, Höhe 11cm) verbracht, die über eine gaszuführende Leitung mit einem Narkosegerät (F.Stephan GmbH, Gackebach, Deutschland) mit einem Sevofluranverdampfer verbunden wurde. Unter der Inkubationskammer befand sich eine auf 37,5°C beheizte Wärmeplatte. In der Kammer wurde eine Konzentration von 3-5 Vol.% Sevofluran (SEVOrane®, Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) aufrechterhalten. Die entsprechende Dosis wurde in einer vorangegangenen Dosisfindungsstudie als optimale Narkosekonzentration ermittelt. In niedrigerer Dosierung (< 3 Vol.%) waren die Tiere noch wach und agil, wobei sie bei Konzentrationen >5 Vol.% schnell atemdepressiv und kardiovaskulär instabil wurden. Bei einer Sevoflurandosierung zwischen 3 und 5 Vol.% schliefen die Versuchstiere fest, behielten aber ihre rosige Hautfarbe und die Atemfrequenz sank im Verlauf um maximal 20%. Die Kontrolltiere atmeten über den gleichen Zeitraum in Abwesenheit vom Muttertier Raumluft ein.

Das Alter der Versuchstiere variierte je nach Versuchsaufbau zwischen null und 21 Tagen (Tab. 1), die Dauer der Narkose zwischen zwei und sechs Stunden bei sechs Tage alten Ratten (Tab. 2). Nach spätestens sechs Stunden wurde die Narkose

beendet und die Tiere wurden nach Erwachen zum Muttertier verbracht. Die Kontrolltiere wurden ohne Narkosegasexposition von der Mutter getrennt und in einer Kammer unter den gleichen Bedingungen isoliert.

Um Hypoxie und Hyperkapnie während der Narkose auszuschließen, wurden neben Beobachtung und Kontrolle der Atemfrequenz exemplarisch bei zwei Versuchstieren Blutgasanalysen (BAYER RapidLab 860, New Jersey, USA) durchgeführt. Hierzu erfolgte eine blinde Punktion des linken Ventrikels zur Gewinnung arteriellen Blutes.

**Tab. 1: Übersicht des Versuchsaufbaus in Abhängigkeit vom Alter der Tiere**

Versuchs- Gruppe	Substanz	Dosierung	Narkose- dauer	Alter der Tiere	Färbung	Tierzahl pro Gruppe
1	Sevofluran inhalativ	3-5 %	2 h	0 d	TUNEL	6
2	Sevofluran inhalativ	3-5 %	2 h	3 d	TUNEL	6
3	Sevofluran inhalativ	3-5 %	2 h	6 d	De Olmos	10
4	Sevofluran inhalativ	3-5%	2 h	21 d	De Olmos	3

**Tab. 2: Übersicht des Versuchsaufbaus in Abhängigkeit von der Dauer der Narkose**

Versuchs- Gruppe	Substanz	Dosierung	Narkose- dauer	Alter der Tiere	Färbung	Tierzahl pro Gruppe
1	Sevofluran inhalativ	3-5 %	2 h	6d	De Olmos	10
2	Sevofluran inhalativ	3-5 %	4 h	6d	De Olmos	9
3	Sevofluran inhalativ	3-5 %	6 h	6 d	De Olmos	13

---

## 2.2 PERFUSION UND GEWEBEPREPARATION

Die Tiere wurden 24 Stunden nach Beginn des Versuches mit einer Überdosis Chloralhydrat 10% (0,1ml/10g Körpergewicht, Fluka, 23100, Buchs, Schweiz) getötet. Nach Thorakotomie wurde zunächst das rechte Atrium inzidiert, um einen Abfluss des Blutes aus dem Kreislauf zu gewährleisten. Anschließend wurde eine Kanüle über den linken Ventrikel in die Aorta vorgeschoben. Das Gefäßsystem wurde dann mit 20ml *Phosphate buffered saline* (PBS) und Heparin (Thrombophob 25.000, Heparin-Natrium; Nordmark Arzneimittel GmbH 2082 Uetersen; phosphate buffered saline, 10-fach Konzentrat: 70ml monobasisches 1 M Na-Phosphat, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Sigma S-9863; 330 ml dibasisches 1 M Na-Phosphat Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, Sigma S-0876 St. Louis, MO. USA und 180 g NaCl, Merck, Darmstadt, Deutschland) perfundiert. Im Anschluss daran erfolgte eine Perfusion mit 20 ml 4%er Paraformaldehydlösung in Cacodylatpuffer (2l 10% Stammlösung: 100g Paraformaldehyd [Merck, Darmstadt, Deutschland] in 800 ml auf 60°C erhitztem Aqua bidest. mit 2 Pellets NaOH [Merck, Darmstadt, Deutschland] gelöst, abgekühlt, auf pH 7,5 titriert, auf 1l aufgefüllt; für 4%ige Lösung 800 ml der Stammlösung mit 18 g NaCl und 2 g Natrium-Cacodylat [Sigma C-0250; St. Louis, MO. USA] versetzen und auf 2 Liter aufgefüllt [pH = 7,4]).

Danach wurden die fixierten Gehirne aus der Kalotte präpariert und für zwei bis vier Tage in toto in Paraformaldehyd gelagert. In Abb. 5 ist solch ein Rattenhirn nach Lagerung in Paraformaldehydlösung dargestellt.



**Abb. 5: Rattenhirn nach Lagerung in Paraformaldehydlösung**

---

Anschließend wurden die Rattenhirne in Form eines Grobschnittes unter Ausschluss des Riech- und Kleinhirns in zwei koronare Teile geteilt und erneut über vier Tage in der Fixationslösung gelagert. Abb. 6 zeigt ein grobgeschnittenes Rattenhirn unter Ausschluss des Klein- und Riechhirns.



**Abb. 6: Grobschnitt der Rattenhirne in zwei koronare Teile**

### **2.3 EINBETTUNG, SCHNITTE**

Die grob geschnittenen Gehirne wurden in 4% Agar (20 g Agar-Puder; Electron Microscopy Sciences, Fort Washington, Pennsylvania, USA, in 500 ml Aqua bidest.) eingebettet und entsprechend präpariert. Ein in Agar eingebettetes grob geschnittenes Gehirn ist in Abb. 7 dargestellt.



**Abb. 7: Gehirne nach Grobschnitt in Agar eingebettet**

---

Die Agarblöcke wurden koronar in 70 µm dünne Scheiben geschnitten (Leica, VT 1000 S, Nussloch, Deutschland). Für die darauf folgende Silberfärbung wurde jeder siebente Schnitt ausgewählt und in Zellkulturplatten (24-Well-Platten; Falcon, Beston Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ. USA) in 4%iger Paraformaldehydlösung in Cacodylat-Puffer mindestens drei Tage gelagert. Für jedes Tier ergaben sich sechs Hirnschnitte aus dem vorderen Teil des Gehirns und sechs Hirnschnitte aus dem mittleren und hinteren Teil des Gehirns. Alle übrigen Schnitte wurden in mit PBS-Azid (100 ml des zehnfach-Konzentrates mit 0,05% Na-Azid NaN<sub>3</sub>, Sigma S-8032; St. Louis, MO. USA, ad 1l) befüllten Zellkulturplatten bei 4°C gelagert.

## 2.4 DE OLMOS KUPFER-SILBERFÄRBUNG

Durch die De Olmos Kupfer-Silberfärbung werden degenerierte Axone und Neurone dargestellt. Diese erscheinen im Lichtmikroskop dunkelbraun bis schwarz und heben sich deutlich vom goldgelben Hintergrund ab <sup>[69]</sup>. Die dunkle Färbung kommt dadurch zustande, dass Silbernitrat durch die durchlässig gewordene Zellmembran von den geschädigten Neuronen in die Zellen dringen kann. Alle zu färbenden Schnitte eines Tieres wurden in eine Petrischale überführt und dreimal in Aqua bidest. gewaschen. Zunächst wurden die Schnitte für 1 Stunde bei 40°C in Kupfer-Silberlösung und dann ca. 48 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lösung enthielt folgende Substanzen: 180 ml auf 40 °C erwärmtes Aqua bidest., 1,5 g Silbernitrat (Roth 9370.3; Karlsruhe, Deutschland), 3 ml 0,5 %ige Kupfernitratlösung (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). Dann wurden die sich in der Petrischale befindenden Hirnschnitte mit frischem Aceton gewaschen, und anschließend für 35 Minuten in einer Silber-Diamin-Lösung bestehend aus 120ml Aqua bidest., 24 g Silbernitrat, 60 ml 0,4 %ige Natronlauge und 30 ml Ammoniumhydroxid (NH<sub>4</sub>OH, Sigma A-6899; St. Louis, MO. USA) inkubiert. Die Schnitte wurden nun unter Agitation in einer ethanolischen Lösung von Formaldehyd und Zitronensäure reduziert: 135 ml Aqua bidest., 15 ml Ethanol absolut, 180 µl Formaldehydlösung (37%, Riedel-de Haën, Seelze, Deutschland), und 10,5 mg Zitronensäure (Sigma C-0759; St. Louis, MO. USA). Die sich dadurch dunkelbraun

gefärbten Schnitte wurden im Anschluß zweimal mit Aqua bidest. gewaschen, um nun in einer 3 %igen Kaliumferrizyanidlösung (0,45 g  $K_3FeCN_6$ , Sigma P-8131; St. Louis, MO. USA in 150 ml Aqua bidest.) für etwa 2-3 Minuten gebleicht zu werden. Darauf folgte erneut zweimaliges Waschen in Aqua bidest.. Die Stabilisierung der Färbung erfolgte schließlich exakt eine Minute durch eine 0,1%ige Natriumthiosulfatlösung (0,2 g  $Na_2S_2O_3$ , Sigma S-7026; St. Louis, MO. USA). Die jetzt bernsteinfarbenen gefärbten Hirschnittpräparate wurden mit Hilfe von Permount Mounting Medium (Electron Microscopy Sciences, FT, Washington) auf Objektträger überführt und anschließend luftgetrocknet. Die Objektträger wurden dann in Behältnisse überführt, die mit graduell steigenden Alkoholkonzentrationen (beginnend mit 40 %igem Ethanol bis Ethanol absolut, zuletzt Xylol) gefüllt waren. Dadurch wurden die Präparate dehydratisiert und konnten abschließend mit Deckgläsern (Menzel, Microm, Walldorf, Deutschland) gedeckt werden. Die Abb. 8 zeigt nach De Olmos Kupfer-Silberfärbung behandelte Hirschnitte aus dem vorderen und hinteren Teil des Gehirns sechs Tage alter Ratten.



**Abb. 8: Hirschnitte nach De Olmos Kupfer-Silberfärbung auf gedeckelten Objektträgern**

Sechs Hirschnitte aus dem vorderen Teil des Gehirns (oben) und sechs Hirschnitte aus dem mittleren und hinteren Teil des Gehirns (unten) sechs Tage alter Ratten.

---

## 2.5 TUNEL-FÄRBUNG

Ein charakteristisches Merkmal der Apoptose ist die Aufspaltung nukleärer DNA in etwa 180 Basenpaare lange Fragmente <sup>[70],[71]</sup>. Trigger dieser Spaltung sind aktivierte Endonukleasen. Zur Darstellung solcher DNA-Fragmente beschrieb Gavrieli et al. (1992) eine histologische Färbungsmethode, die sogenannte TUNEL-Färbung (TUNEL = terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) <sup>[72]</sup>. Nach Behandlung und Perfusion der Versuchstiere wurden die Gehirne in Paraffin eingebettet und anschließend am Rotationsmikrotom (Microm HM 360 Ser.-Nr. 9709, Walldorf, Deutschland) in zehn µm dicke Scheiben geschnitten. Diese wurden vorsichtig auf speziell beschichtete Objektträger (Super Frost Plus; R. Langenbrinck, Emmerdingen, Deutschland) transferiert. Die nun folgende Färbung mit Hilfe eines Kits (A-popTag kit, Cat # S 7100 KIT, Komponenten 1-6, Oncor Appligene, Heidelberg, Deutschland) beruhte auf der Reaktion des Enzyms terminale Deoxynucleotidyl-Transferase (tDT) mit den 3'-OH Enden von DNA und Anbindung biotinylierter Polydesoxyuridylnukleotide. Die Biotinenden reagierten mit Avidin, welches an eine Peroxidase gekoppelt war. Diese Anti-Dioxigenin-Peroxidase katalysierte eine Farbreaktion. Schließlich wurden die Gehirne mit Methylgrün gegengefärbt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Kerne apoptotischer Zellen färbten sich aufgrund ihres hohen Anteils an DNA mit freien 3'-OH Enden dunkelbraun (= TUNEL-positive Zellen). Das Zytoplasma intakter Zellen wurde mit Methylgrün angefärbt. Da auch Nekrose oder Autolyse mit hoher Fragmentierung von DNA einhergehen, ist diese Färbung allerdings nicht Apoptose-spezifisch <sup>[73],[74],[75]</sup>.

## 2.6 MORPHOMETRIE

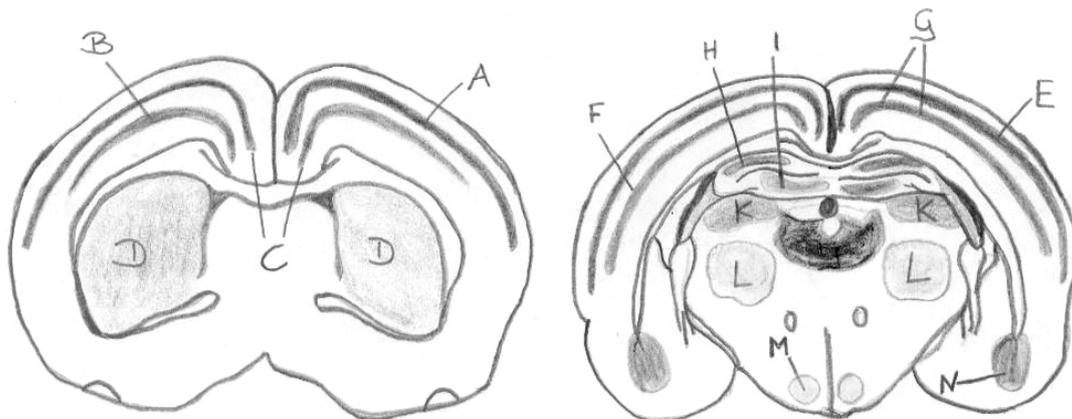
Eine morphometrische Quantifizierung des Ausmaßes der Neurodegeneration erfolgte durch Untersuchungen zur Dichtebestimmung der degenerierten Zellen. Diese wurden mittels der stereologischen Dissektionsmethode (*unibased stereological dissector method*) nach Gundersen durchgeführt <sup>[76],[77]</sup>. Die Bestimmung der Dichte wurde an den nach der DeOlmos- und TUNEL-Methode gefärbten Hirnschnitten durchgeführt.

Es wurden folgende Hirnareale ausgewertet:

- Cortex frontalis Lamina II und IV

- Cortex parietalis Lamina II und IV
- Cortex cingularis Lamina II und IV
- Cortex retrosplenialis Lamina II und IV
- Septum
- Nucleus caudatus
- Thalamus ventralis, laterodorsalis und mediodorsalis
- Subiculum
- Hypothalamus
- CA 1 Region des Hippocampus
- Gyrus dentatus des Hippocampus

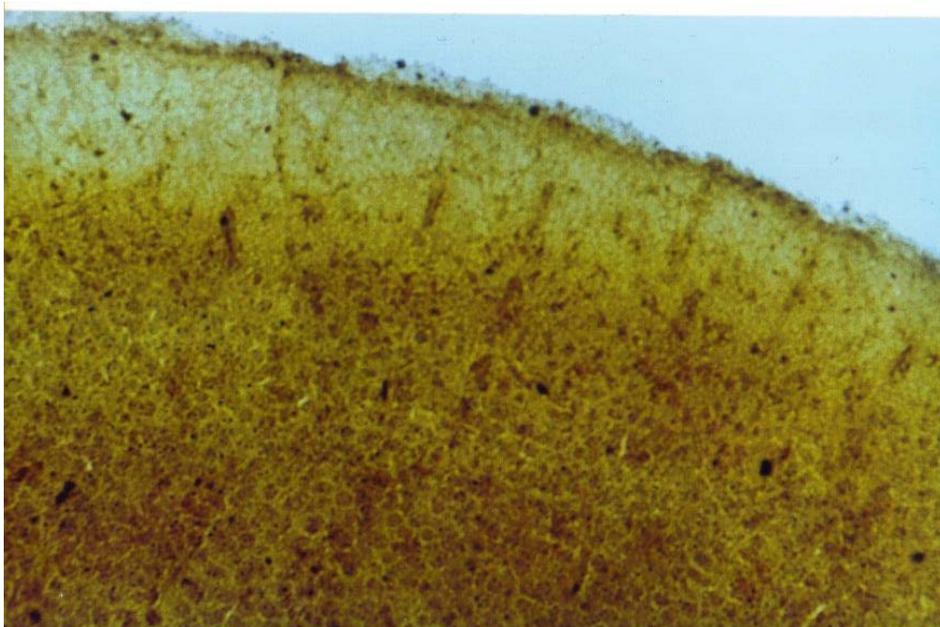
Diese Hirnareale sind graphisch in Abb. 9 aufgezeigt.



**Abb. 9: Schematische Darstellung der ausgezählten Hirnregionen zur Errechnung der numerischen Dichte untergegangener Zellen pro  $\text{mm}^3$**

A = Lamina II des frontalen Cortex, B = Lamina IV des frontalen Cortex, C = Lamina II und IV des Gyrus cinguli, D = Nucleus caudatus, E = Lamina II des parietalen Cortex, F = Lamina IV des parietalen Cortex, G = Lamina II und IV des retrosplenialen Cortex, H = CA 1 Region des Hippocampus, I = Gyrus dentatus, J = mediodorsaler Thalamus, K = laterodorsaler Thalamus, L = ventraler Thalamus, M = Nucleus venteromedialis hypothalami (nicht ausgezählt), N = Subiculum

Die Hirnareale wurden mit Hilfe von Atlanten des sich entwickelnden Gehirns der Ratte identifiziert <sup>[78],[79]</sup>. Zum Mikroskopieren und Auszählen der Hirnschnitte diente ein Lichtmikroskop (BX60 F-3 Olympus, Japan) mit integriertem Zählgitter im Okular. Der Zählrahmen hatte die Maße 0,05 mm auf 0,05 mm bei einer Schnittdicke von 0,07 mm. Die angefärbten Zellen wurden in dem vorgegebenen Raster gezählt. Abb. 10 zeigt das mikroskopische Bild eines frontalen Cortex nach De Olmos Kupfer-Silberfärbung eines sechs Tage alten Rattenhirns nach Sevoflurannarkose. Anschließend konnte man unter Berücksichtigung der Schnittdicke und des Vergrößerungsfaktors die Anzahl degenerierter Zellen in diesem Volumen berechnen. Nicht mitgezählt wurden die angefärbten Zellen, die auf dem linken und unteren Rand des Rasters lagen. Pro Region wurden acht Felder ausgewählt, die degenerierten Zellen in diesen Feldern ausgezählt, und der Mittelwert der degenerierten Zellen pro Region pro mm<sup>3</sup> errechnet. Die Dichten der einzelnen Gehirnareale wurden addiert und ein Gesamtsummenscore für jedes Gehirn ermittelt. Mit Hilfe dieses Summenscores konnte die Anzahl degenerierter Zellen von Kontrolltieren und behandelten Tieren miteinander verglichen werden. Die Auswertung der Präparate erfolgte verblindet durch zwei unabhängige erfahrene Untersucher.



**Abb. 10: Mikroskopisches Bild nach De Olmos Kupfer-Silberfärbung**

Dargestellt ist der frontale Cortex einer sechs Tage alten Ratte nach zweistündiger Sevofluranbehandlung.

---

## 2.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Aus den Dichten der degenerierten Zellen der jeweiligen Hirnareale der Versuchsgruppen wurde der arithmetische Mittelwert ( $M = \text{mean}$ ) und die Standardabweichung ( $SD = \text{standard deviation}$ ) errechnet. Die Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden mit Hilfe des Student's t-Test auf ihre Signifikanz hin überprüft. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  angenommen. Die Untersuchungen zur Abhängigkeit neurodegenerativer Schäden von der Dauer der Narkose und vom Alter der Tiere wurden mit Hilfe der ermittelten Gesamtscores und der Varianzanalyse (one-way ANOVA) überprüft. Die statistische Auswertung der Daten wurde mit der Software Prism© (GraphPad Software, La Jolla, CA 92037, USA) durchgeführt.

---

## 3 ERGEBNISSE

### 3.1 FEHLENDER NACHWEIS NEURODEGENERATIVER EFFEKTE DURCH SEVOFLURAN

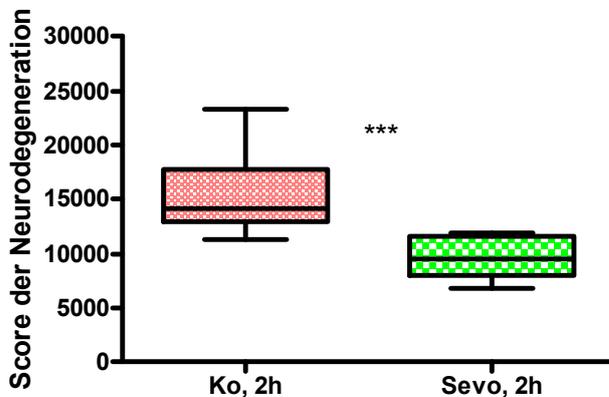
In der vorliegenden Studie wurden junge Ratten unterschiedlichen Alters einer unterschiedlichen Zeitdauer einer Sevoflurannarkose ausgesetzt. Es konnten in den durchgeführten Untersuchungen weder zeit- noch altersabhängige neurodegenerative Effekte von Sevofluran im unreifen Gehirn der Ratte nachgewiesen werden.

#### 3.1.1 ZEITABHÄNGIGE EFFEKTE VON SEVOFLURAN

Die Dauer der Narkose mit Sevofluran variierte je nach Versuchsaufbau zwischen zwei und sechs Stunden. Die untersuchten Ratten waren zum Zeitpunkt des Versuches sechs Tage alt. Die Kontrolltiere wurden für den selben Zeitraum vom Muttertier getrennt. Um Dehydratation und Elektrolytverschiebungen bei den vier und sechs Stunden andauernden Versuchen und dadurch alimentär bedingte neuronale Schäden zu vermeiden, erhielten sowohl die behandelten, als auch die Kontrolltiere einmalig gewichtsadaptiert eine 5% Glukoselösung subkutan injiziert. In den durchgeführten Versuchen konnten keine neurotoxischen Effekte von Sevofluran auf das unreife Hirn der Ratte nachgewiesen werden.

Die histologische Analyse der Hirnschnitte der zwei Stunden behandelten sechs Tage alten Versuchstiere ergab im Vergleich zur Kontrollgruppe keine erhöhte Rate an degenerierten Nervenzellen. Im Gegenteil: es zeigte sich ein statistisch signifikant niedrigerer neurodegenerativer Score bei den mit Sevofluran narkotisierten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $***P = 0,0008$ ; Student's t-Test). Der arithmetische Mittelwert der Gesamtsummenscores der zwei Stunden vom Muttertier getrennten Kontrolltiere betrug 15.739 ( $n = 7$ ), während dieser bei den mit Sevofluran behandelten Tieren mit 9.562 ( $n = 10$ ) niedriger lag. In einigen Hirnarealen war dieser Effekt besonders stark ausgeprägt. Dazu gehörten insbesondere der Cortex frontalis, parietalis, retrosplenialis und cingularis, der Nucleus caudatus und das Subiculum. Die Dichtemittelwerte und Standardabweichungen der 17 einzelnen Hirnregionen sind in

Tab. 3 aufgeführt. In der Abb. 11 sind die mittleren Summenscores der Gruppe der zwei Stunden mit Sevofluran behandelten Tiere der Gruppe der Kontrolltiere graphisch gegenübergestellt.

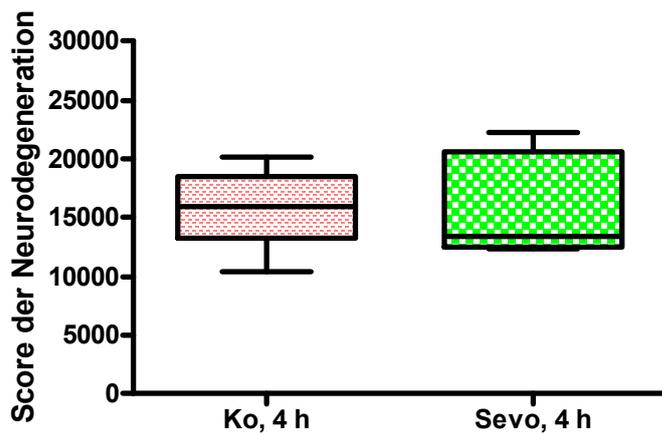


**Abb. 11: Anzahl degenerierter Nervenzellen pro  $\text{mm}^3$  im Hirn sechs Tage alter Ratten (2h)**

Die Tiere der Kontrollgruppe ( $n = 7$ ) wurden zwei Stunden vom Muttertier getrennt. Gegenübergestellt ist die Gruppe der zwei Stunden mit 3-5 Vol.% Sevofluran behandelten Tiere ( $n = 10$ ). Die Boxplots zeigen die Verteilung der mittleren Summenscores pro Versuchsgruppe an. Die mit Sevofluran behandelten Tiere zeigten eine signifikant geringere Neurodegeneration als die Kontrollgruppe (\*\*\*)  $P = 0,0008$ ;

Student's t-Test). Ko = Kontrollen, Sevo = Sevofluran.

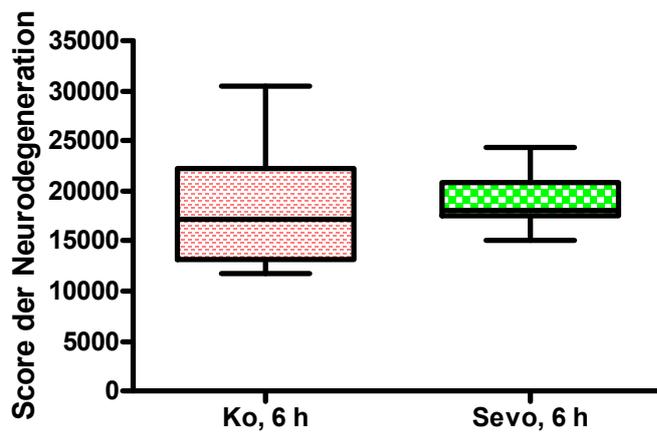
Die vier Stunden mit Sevofluran narkotisierten Tiere zeigten, verglichen mit den Kontrolltieren, keinen signifikanten Anstieg der numerischen Zelldichte untergegangener Nervenzellen. Der Mittelwert der errechneten Gesamtsummenscores der neun mit Sevofluran behandelten Tiere betrug 15.739, die neun Kontrolltiere wiesen im Mittel einen Gesamtsummenscore von 15.634 auf. In Abb. 12 sind diese Ergebnisse graphisch dargestellt. Die Mittelwerte der Dichte untergegangener Zellen und deren Standardabweichungen in den einzelnen Hirnregionen sind im Mittelteil der Tab. 3 ersichtlich.



**Abb. 12: Anzahl degenerierter Nervenzellen pro  $\text{mm}^3$  im Hirn sechs Tage alter Ratten (4h)**

Die Tiere der Kontrollgruppe ( $n = 9$ ) wurden vier Stunden vom Muttertier getrennt. Gegenübergestellt ist die Gruppe der vier Stunden mit 3-5 Vol.% Sevofluran behandelten Tiere ( $n = 9$ ). Die Boxplots zeigen die Verteilung der mittleren Summenscores pro Versuchsgruppe an. Ko = Kontrollen, Sevo = Sevofluran.

Die sechs Stunden mit Sevofluran behandelten Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren keinen signifikanten Anstieg der Neurodegeneration. Der Mittelwert der Gesamtsummenscores der 13 narkotisierten Tiere lag bei 18.870, während er bei den elf Kontrolltieren bei 18.199 lag. In Abb. 13 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Dichtesummenscores pro Versuchsgruppe graphisch dargestellt. Die Mittelwerte der Summenscores der einzelnen Hirnregionen sind in Tab. 3 ersichtlich. Während in den zwei und vier Stunden andauernden Narkosen mit Sevofluran alle Tiere die Narkose überlebten, sind während der sechsstündigen Narkose insgesamt vier von 17 Tieren verstorben.



**Abb. 13: Anzahl degenerierter Nervenzellen pro  $\text{mm}^3$  im Hirn sechs Tage alter Ratten (6h)**

Die Tiere der Kontrollgruppe ( $n = 11$ ) wurden sechs Stunden vom Muttertier getrennt. Gegenübergestellt ist die Gruppe der sechs Stunden mit 3-5 Vol.% Sevofluran behandelten Tiere ( $n = 13$ ). Die Boxplots zeigen die Verteilung der mittleren Summenscores pro Versuchsgruppe an. Ko = Kontrolle, Sevo = Sevofluran.

**Tab. 3: Zeitabhängige Wirkung von Sevofluran im sich entwickelnden Gehirn der Ratte auf die einzeln untersuchten Hirnregionen**

Hirnregion	Numerische Zelldichte untergegangener Neurone $M \pm SD$					
	Versuchsdauer $t = 2$ Stunden		Versuchsdauer $t = 4$ Stunden		Versuchsdauer $t = 6$ Stunden	
	Kontrollen ( $n = 7$ )	Sevofluran 3-5 Vol.% ( $n = 10$ )	Kontrollen ( $n = 9$ )	Sevofluran 3-5 Vol.% ( $n = 9$ )	Kontrollen ( $n = 11$ )	Sevofluran 3-5 Vol.% ( $n = 13$ )
Cortex frontalis, Lamina II	2.837 $\pm$ 1.321	2.043 $\pm$ 788	2.444 $\pm$ 608	3.175 $\pm$ 1.699	3.286 $\pm$ 1.426	3.279 $\pm$ 1.041
Cortex frontalis, Lamina IV	862 $\pm$ 438	222 $\pm$ 214**	737 $\pm$ 323	917 $\pm$ 295	1.068 $\pm$ 356	1.025 $\pm$ 582
Cortex parietalis, Lamina II	2.673 $\pm$ 968	2.371 $\pm$ 657	2.714 $\pm$ 1.629	2.365 $\pm$ 1.016	2.701 $\pm$ 1.326	2.890 $\pm$ 1.510

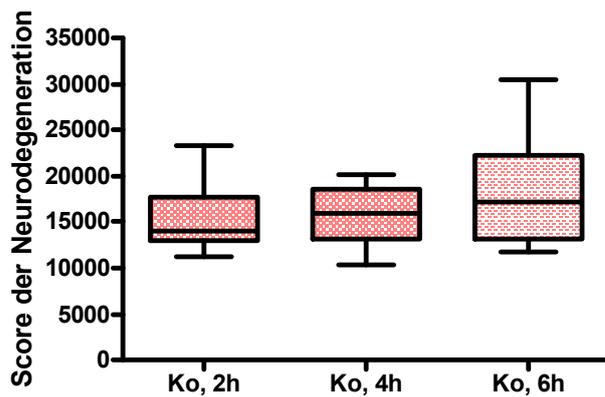
Cortex parietalis, Lamina IV	1.088 444	±	95 153***	±	988 335	±	741 318	±	1.125 499	±	928 715	±
Cortex cingularis, Lamina II	2.510 746	±	1.143 517***	±	2.032 989	±	2.810 711	±	2.117 641	±	2.352 682	±
Cortex cingularis, Lamina IV	1.315 532	±	603 349**	±	1.305 191	±	917 335**	±	1.356 287	±	1.612 557	±
Cortex retrosplenialis, Lamina II	968 451	±	500 139**	±	952 398	±	905 258	±	961 339	±	1.494 832	±
Cortex retrosplenialis, Lamina IV	862 240	±	571 251*	±	1.376 615	±	1.199 140	±	1.212 600	±	1.294 793	±
Septum	93 67	±	60 41	±	149 109	±	98 71	±	252 205	±	231 120	±
Nucleus caudatus	286 66	±	117 44***	±	381 257	±	162 64 *	±	577 522	±	492 249	±
Thalamus ventralis	78 39	±	74 59	±	175 157	±	89 30	±	198 154	±	163 98	±
Thalamus laterodorsalis	412 143	±	363 236	±	397 235	±	543 311	±	756 662	±	1.097 707	±
Thalamus mediodorsalis	126 93	±	63 35	±	178 121	±	143 52	±	223 155	±	194 94	±
Subiculum	633 156	±	369 175**	±	660 267	±	581 193	±	857 573	±	646 462	±
Hypothalamus	429 171	±	423 171	±	521 214	±	336 143 *	±	740 478	±	541 322	±
CA 1 Region des Hippocampus	306 173	±	386 191	±	429 189	±	473 182	±	416 196	±	308 128	±

Gyrus dentatus	261	±	160	±	197	±	286	±	353	±	325	±
des Hippocampus	118		80		131		140		193		192	

Am 6. Lebenstag erhielten die Tiere eine zwei-, vier-, bzw. sechsstündige Sevoflurannarkose. Die Kontrolltiere wurden für jeweils die gleiche Zeit vom Muttertier getrennt. Nach 24 Stunden wurden die Gehirne histologisch präpariert und nach DeOlmos gefärbt. Die Dichte der Zellen wurde mit der stereologischen Dissektionsmethode in 17 Hirnregionen bestimmt. Angegeben sind die Mittelwerte der Dichte der degenerierten Zellen und die Standardabweichung ( $M \pm SD$ ) in den einzelnen untersuchten Hirnregionen. In einigen Gehirnregionen ist ein signifikanter Unterschied zwischen den mit Sevofluran behandelten Tieren im Vergleich zu deren Kontrollgruppen nachweisbar (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; Student's t-Test).

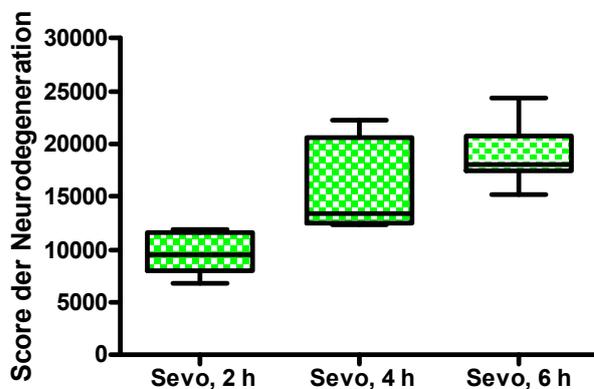
Exemplarisch wurde bei zwei mit Sevofluran behandelten Tieren zum Ausschluss von Hypoxämie, Hyperkapnie und Azidose nach einer Versuchsdauer von vier Stunden Blut abgenommen. Aufgrund einer ungenügenden Blutmenge bei einem der beiden Tiere konnte jedoch nur eine Blutgasanalyse erhoben werden: Der pH-Wert lag mit 7,468 im Referenzbereich, der  $pO_2$  betrug 133 mmHg, der  $pCO_2$  26,2 mmHg.

Vergleicht man die Gesamtsummenscores der zwei, vier und sechs Stunden mit Sevofluran behandelten Tiere miteinander, kann ein Zusammenhang zwischen der Dauer der Narkose und dem Ausmaß der Neuronenuntergänge beobachtet werden. Die Anzahl degenerierter Nervenzellen stieg mit längerer Narkosedauer der behandelten Tiere signifikant an (\*\*\*  $P < 0,0001$ , ANOVA  $F = 29,89$ ). Jedoch konnte, wie oben beschrieben, im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen kein signifikanter Anstieg degenerierter Nervenzellen verzeichnet werden. Ein graphischer Vergleich innerhalb der Kontrollgruppen und der Gruppen der mit Sevofluran behandelten Tiere sind in Abb. 14 und Abb. 15 dargestellt.



**Abb. 14: Neurodegenerative Effekte nicht behandelter Kontrolltiere in Abhängigkeit von der Dauer der Trennung vom Muttertier**

Sechs Tage alte Ratten wurden zwei ( $n = 7$ ), vier ( $n = 9$ ) bzw. sechs Stunden ( $n = 11$ ) von dem Muttertier getrennt. In nach de Olmos gefärbten Hirnschnitten wurde mit der stereologischen Dissektionsmethode die Dichte degenerierter Zellen/ $\text{mm}^3$  in 17 Hirnregionen bestimmt. Diese Zelldichtewerte wurden zu einem Gesamtwert für jedes Gehirn summiert. Die Boxplots zeigen die Verteilung der mittleren Summenscores pro Versuchsgruppe an. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen nachgewiesen werden. Ko = Kontrollen.



**Abb. 15: Neurodegenerative Effekte von Sevofluran in Abhängigkeit von der Dauer der Exposition.**

Sechs Tage alte Ratten wurden zwei ( $n = 10$ ), vier ( $n = 9$ ) bzw. sechs Stunden ( $n = 13$ ) einer Narkose mit Sevofluran ausgesetzt. In nach de Olmos gefärbten Hirnschnitten wurde mit der stereologischen Dissektionsmethode die Dichte degenerierter Zellen/ $\text{mm}^3$  in 17 Hirnregionen bestimmt. Diese Zelldichtewerte wurden zu einem Gesamtwert für jedes Gehirn summiert. Die Boxplots zeigen die Verteilung der mittleren Summenscores pro Versuchsgruppe an. Die Varianzanalyse (ANOVA) ergab einen signifikanten Effekt der Dauer der Narkose mit Sevofluran auf das Ausmaß der Neurodegeneration ( $F = 29,89$ ,  $*** P < 0,0001$ ). Sevo = Sevofluran.

---

### 3.1.2 ALTERSABHÄNGIGE EFFEKTE VON SEVOFLURAN

Zur Darstellung einer möglichen Altersabhängigkeit einer proapoptotischen Wirkung von Sevofluran wurden Ratten unterschiedlichen Alters der Inhalation von Sevofluran ausgesetzt. Hierbei konnten sowohl bei den null, drei, sechs als auch 21 Tage alten Ratten keine neurodegenerativen Effekte im Vergleich zu deren zugeordneten Kontrollgruppen nachgewiesen werden.

Die null Tage alten, zwei Stunden mit Sevofluran behandelten Ratten (n = 6), zeigten einen mittleren Gesamtsummenscore von 52.311. Aufgrund von Problemen beim Perfusionsprozess ist dem nur ein Kontrolltier gegenübergestellt, welches einen Summenscore von 44.667 aufwies. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen ist aufgrund der zu kleinen Größe der Kontrollgruppe nicht nachweisbar. In Tab. 4 sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der numerischen Zelldichte untergegangener Nervenzellen der null Tage alten Ratten in der linken Spalte aufgelistet.

Die drei Tage alten, zwei Stunden mit Sevofluran narkotisierten Tiere (n = 6) wiesen im Mittel einen Gesamtsummenscore von 36.751 auf, während die zugeordnete Kontrollgruppe (n = 2) einen mittleren Summenscore von 39.577 aufwies. Dieser Unterschied ist jedoch nicht signifikant. Die Werte sind in Tab. 4 aufgeführt.

Es zeigte sich bei den sechs Tage alten Ratten, wie bereits zuvor beschrieben, ein im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant geringerer Neuronenuntergang der zwei Stunden mit Sevofluran behandelten Tiere (\*\* P = 0,0008; Student's t-Test).

Bei den 21 Tage alten, zwei Stunden mit Sevofluran behandelten Ratten (n = 3), konnte ein mittlerer Gesamtsummenscore von 3.813 ermittelt werden. Die Werte der Kontrollgruppe (n = 3) lagen im Mittel bei 3.364. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 in den rechten Spalten aufgezeigt.

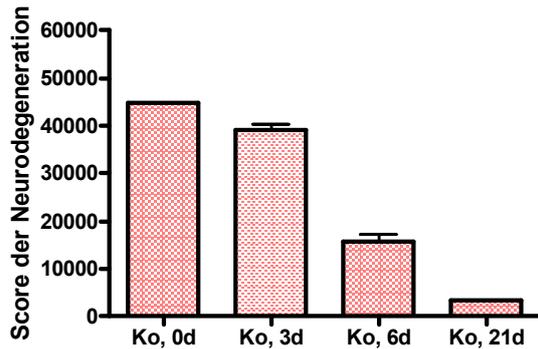
**Tab. 4: Altersabhängige Wirkung von Sevofluran im sich entwickelnden Gehirn der Ratte**

Numerische Zelldichte untergegangener Neurone $M \pm SD$							
Alter der Ratten: 0 Tage		Alter der Ratten: 3 Tage		Alter der Ratten: 6 Tage		Alter der Ratten: 21 Tage	
Kontrollen (n = 1)	Sevofluran 3-5 Vol. % (n = 6)	Kontrollen (n = 2)	Sevofluran 3-5 Vol. % (n = 6)	Kontrollen (n = 7)	Sevofluran 3-5 Vol. % (n = 10)	Kontrollen (n = 3)	Sevofluran 3-5 Vol. % (n = 3)
44.667 ± 0	52.311 ± 1.691	39.577 ± 1.309	36.751 ± 2.272	15.739 ± 4.083	9.562 ± 1.924 ***	3.364 ± 107	3.813 ± 699

Am 0., 3., 6. bzw. 21. Lebenstag erhielten die Tiere eine zweistündige Sevofluranarkose. Die Kontrolltiere wurden für die gleiche Zeit vom Muttertier getrennt. Nach 24 Stunden wurden die Gehirne histologisch präpariert und nach DeOlmos bzw. TUNEL gefärbt. Die Dichte der Zellen wurde mit der stereologischen Dissektionsmethode in 17 Hirnregionen bestimmt. Angegeben sind die Summenscores und der Standardabweichung ( $M \pm SD$ ). (\*  $P < 0,05$ ; \*\*  $P < 0,01$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; Student's t-Test).

Eine statistisch signifikante Abnahme der Neurodegeneration bei den mit Sevofluran narkotisierten Tieren konnte mit steigendem Alter verzeichnet werden (\*\*\*)  $P < 0,001$ , oneway ANOVA  $F = 849$ ;  $n = 3-10$ ). Ein mit zunehmendem Alter der Kontrolltiere sinkender Summenscore untergegangener Zellen konnte auch in der Kontrollgruppe aufgezeigt werden, dieser Unterschied war jedoch aufgrund zu geringer Tierzahlen in der Gruppe der null und drei Tage alten Ratten nicht signifikant. Zwischen der Gruppe der sechs Tage und der Gruppe der 21 Tage alten Kontrolltiere konnte eine signifikante Reduktion des neurodegenerativen Scores mit steigendem Alter der Tiere gezeigt werden (\*\*\*)  $P = 0,001$ , Student's t-Test). Eine graphische Gegenüberstellung der Gesamtsummenscores der Kontrollgruppen und der Gruppen der mit Sevofluran narkotisierten Tiere sind in Abb. 16 und Abb. 17 zu finden.

Die Letalität bei den null, drei und sechs Tage alten Tieren, welche zwei Stunden einer Sevofluranarkose ausgesetzt wurden, lag bei 0%, die Letalität der 21 Tage alten Ratten, welche unter gleichen Bedingungen narkotisiert wurden, betrug 50%.



**Abb. 16: Neurodegenerative Effekte nicht behandelter Kontrolltiere in Abhängigkeit vom Alter der Ratten**

Null (n = 1), drei (n = 2), sechs (n = 7) und 21 (n = 3) Tage alte Ratten wurden jeweils zwei Stunden vom Muttertier getrennt. In nach TUNEL bzw. de Olmos gefärbten Hirnschnitten wurde mit der stereologischen Dissektionsmethode die Dichte degenerierter Zellen/mm<sup>3</sup> in 17 Hirnregionen bestimmt. Diese Zelldichtewerte wurden zu einem Gesamtwert für jedes Gehirn summiert. Die Säulen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Scores pro Versuchsgruppe an. Es konnten keine signifikanten Unterschiede mit steigendem Alter der Tiere nachgewiesen werden. Ko = Kontrollen.



**Abb. 17: Neurodegenerative Effekte von Sevofluran in Abhängigkeit vom Alter der Ratten.**

Null (n = 6), drei (n = 6), sechs (n = 10) und 21 (n = 3) Tage alte Ratten wurden einer zweistündigen Narkose mit Sevofluran ausgesetzt. In nach TUNEL bzw. de Olmos gefärbten Hirnschnitten wurde mit der stereologischen Dissektionsmethode die Dichte degenerierter Zellen/mm<sup>3</sup> in 17 Hirnregionen bestimmt. Diese Zelldichtewerte wurden zu einem Gesamtwert für jedes Gehirn summiert. Die Säulen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Scores pro Versuchsgruppe an. Die Varianzanalyse (ANOVA) ergab einen signifikanten altersabhängigen Effekt auf das Ausmaß der Neurodegeneration (F = 848,9, \*\*\* P < 0,0001). Sevo = Sevofluran.

---

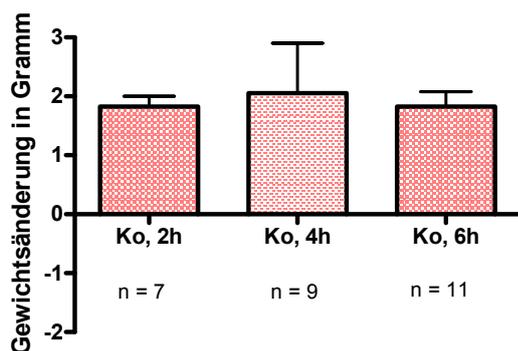
## 3.2 GEWICHTSENTWICKLUNG NACH SEVOFLURANNARKOSE

Um herauszufinden, ob die Behandlung mit Sevofluran Effekte auf die Gewichtsentwicklung der Tiere hat, wurden die Ratten vor Versuchsbeginn und 24 Stunden nach Versuchsbeginn gewogen.

### 3.2.1 ABHÄNGIGKEIT DER GEWICHTSENTWICKLUNG VON DER NARKOSEDAUER

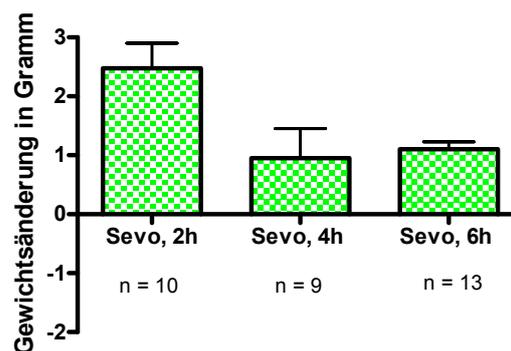
In der statistischen Analyse zeigte sich eine von der Dauer der Narkose abhängige signifikant verminderte Gewichtszunahme (\*\*\*)  $P = 0,0006$ , oneway ANOVA  $F = 9,66$ ). Die Tiere, welche lediglich zwei Stunden dem Narkotikum ausgesetzt waren, nahmen in den folgenden 24 Stunden signifikant mehr an Gewicht zu als die vier- bzw. sechs Stunden mit Sevofluran behandelten Tiere. Dies ist in Abb. 19 graphisch dargestellt.

Die zugeordneten Kontrollgruppen wiesen jedoch mit zunehmender Dauer der Trennung vom Muttertier keine signifikanten Unterschiede in der Gewichtsentwicklung auf. Die zwei Stunden vom Muttertier getrennten Tiere zeigten eine mittlere Gewichtszunahme von 1,83 g/ 24 h, bei den vier Stunden vom Muttertier separierten Ratten lag die mittlere Gewichtszunahme bei 2,06 g/ 24 h, die sechs Stunden dauernde Trennung von der Mutter ging mit einer mittleren Gewichtszunahme von 1,81 g/ 24 h einher. Abbildung 24 zeigt die mittlere Gewichtszunahme der jeweiligen Kontrollgruppen und deren Standardabweichungen an.



**Abb. 18: Gewichtszunahme sechs Tage alter Kontrolltiere 24 Stunden nach Versuchsbeginn in Abhängigkeit von der Dauer der Trennung vom Muttertier**

Die Säulen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gewichtsveränderungen pro Kontrollgruppe an. Die Dauer der Trennung vom Muttertier hat keinen signifikanten Effekt auf die Gewichtsänderung der Kontrolltiere Ko = Kontrollen.



**Abb. 19: Gewichtszunahme sechs Tage alter, mit Sevofluran behandelte Ratten 24 Stunden nach Versuchsbeginn in Abhängigkeit von der Dauer der Narkose**

Die Säulen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen der Gewichtsveränderungen pro Versuchsgruppe an. Die Varianzanalyse (ANOVA) ergab einen signifikanten Effekt der Dauer der Narkose mit Sevofluran auf die Gewichtszunahme der Ratte ( $F = 9,66$ ,  $P = 0,0006$ ). Sevo = Sevofluran.

Vergleicht man die mit Sevofluran behandelten Tiere mit ihrer jeweiligen zugeordneten Kontrollgruppe, sind hier ebenfalls Unterschiede im Gewichtsentwicklungsverlauf festzustellen:

Die zwei Stunden mit Sevofluran behandelten sechs Tage alten Ratten zeigten eine signifikant höhere Gewichtszunahme als ihre entsprechende Kontrollgruppe (\*\*  $P = 0,0085$ ; Student's t-test). Die mittlere Gewichtszunahme der Kontrolltiere lag bei  $1,83 \pm 0,18$  g/ 24h, die der mit Sevofluran narkotisierten Tiere lag im Mittel bei  $2,49 \text{ g} \pm 0,13$  g/ 24 h.

Die vier Stunden mit Sevofluran behandelten sechs Tage alten Ratten ( $n = 9$ ) nahmen in den 24 Stunden nach Versuchsbeginn im Mittel  $0,95 \pm 0,5$  g und damit durchschnittlich weniger an Gewicht zu als die Tiere ihrer zugehörigen Kontrollgruppe ( $n = 9$ ), welche vier Stunden vom Muttertier getrennt waren. Deren mittlere Gewichtszunahme betrug  $2,06 \pm 0,28$  g. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant.

---

Die sechs Stunden mit einer Sevoflurannarkose behandelten Versuchstiere nahmen ebenfalls weniger an Gewicht zu als ihre zugeordnete Kontrollgruppe. Hierbei lag die mittlere Gewichtszunahme der mit Sevofluran behandelten Tiere bei  $1,09 \pm 0,13$  g, ( $n = 13$ ), während die der Kontrollgruppe  $1,82 \pm 0,26$  g ( $n = 11$ ) betrug. Dieser Unterschied ist signifikant (\* $P = 0,0152$ ; Student's t-Test).

### **3.2.2 ABHÄNGIGKEIT DER GEWICHTSENTWICKLUNG VOM ALTER DER TIERE**

In den Kontrollgruppen zeigten sich bei zweistündiger Trennung vom Muttertier mit steigendem Alter der Ratten höhere Gewichtszunahmen im Verlauf von 24 Stunden äquivalent zum physiologischen Gewichtskurvenverlauf (Gewichtszunahme des null Tage alten Kontrolltieres:  $0,8\text{g}/24\text{h}$ , Gewichtszunahme der drei Tage alten Kontrolltiere:  $1,1 \pm 0,2\text{g}/24\text{h}$ , Zunahme an Gewicht der sechs Tage alten Kontrolltiere:  $1,83 \pm 0,18\text{g}/24\text{h}$ , Gewichtszunahme der 21 Tage alten Kontrolltiere:  $2,99 \pm 0,01\text{g}/24\text{h}$ ).

Ein ähnlicher Gewichtsentwicklungsverlauf zeigte sich auch bei den zwei Stunden mit Sevofluran narkotisierten Tieren im Alter von null bis sechs Tagen. Hier konnte bei den null Tage alten behandelten Tieren eine mittlere Gewichtszunahme von  $0,4 \pm 0,15\text{g}$  errechnet werden. Die drei Tage alten Versuchstiere nahmen im Verlauf von 24 Stunden im Mittel  $1,6 \pm 0,05\text{g}$  zu. Eine mittlere Gewichtserhöhung von  $2,49 \pm 0,12\text{g}$  wiesen die sechs Tage alten mit Sevofluran behandelten Tiere auf.

Die Gruppe der 21 Tage alten mit Sevofluran behandelten Ratten verlor in den folgenden 24 Stunden nach Versuchsbeginn im Durchschnitt  $3,66 \pm 0,33\text{g}$  an Gewicht, während die zugeordnete Kontrollgruppe im Mittel  $2,99 \pm 0,01\text{g}$  an Gewicht zunahm. Dieser Unterschied war signifikant (\*\*\*  $P < 0,001$ ; Student's t-test,  $n = 3,3$ ).

---

## 4 DISKUSSION

### 4.1 ALLGEMEINE BETRACHTUNG

Diese Arbeit wurde durchgeführt, um zeit- und altersabhängige Effekte von Sevofluran auf das unreife Gehirn der Ratte zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Ratten im Alter von null, drei, sechs und 21 Tagen einer Sevoflurannarkose ausgesetzt. Die Dauer der Narkose variierte bei den sechs Tage alten Ratten zwischen zwei und sechs Stunden. Als Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine Mononarkose mit Sevofluran an neugeborenen Ratten keine neurodegenerativen Effekte hervorruft.

Im Mittelpunkt verschiedenster Publikationen stehen neurotoxische Effekte von anästhetischen Substanzen auf das sich entwickelnde Gehirn. In Studien am Tiermodell wies eine große Anzahl psychoaktiver und sedativer Substanzen einen apoptoseinduzierenden Effekt im zentralen Nervensystem auf. Die meisten veröffentlichten Daten auf diesem Gebiet sind Daten zu neurotoxischen Effekten von Ketamin und anderen NMDA-Antagonisten. Ketamin ruft sowohl im Hirn von Ratten als auch von Mäusen eine ausgedehnte Neuroapoptose hervor <sup>[59],[80]</sup>. Die Bedeutung dieser Daten am Modell des Nagetiers wurde durch den Nachweis ausgedehnter Neuroapoptose im Cortex von Rhesusaffen feten nach 24 Stunden Ketaminanästhesie des Muttertiers auch für Säugetiere bestätigt <sup>[81]</sup>. Fredriksson et al. konnten zeigen, dass eine Kombination von Ketamin mit GABA<sub>A</sub>-Agonisten wie Barbituraten oder Propofol während der Phase des rapiden Hirnwachstums neuroapoptotische Effekte verstärkt und langfristige Verhaltensauffälligkeiten zur Folge hat <sup>[82]</sup>.

Neurodegenerative Effekte wurden in Untersuchungen an neonatalen Mäusen auch für Substanzen demonstriert, welche ihre Wirkung überwiegend über einen GABA<sub>A</sub>-Agonismus entfalten. Dazu gehören Benzodiazepine, Propofol und Barbiturate <sup>[62],[80],[83]</sup>. Zusätzlich zeigte sich in den Untersuchungen, dass sich das Ausmaß der Neurodegeneration durch die Kombination von Anästhetika wie z.B. die Kombinationen von Propofol mit Thiopental, Ketamin mit Propofol, Midazolam mit Ketamin oder Diazepam mit Phenobarbital erhöht.

---

Während der genaue Wirkmechanismus volatiler Anästhetika bisher noch nicht vollständig geklärt ist, steht fest, dass sie alle GABA-agonistische und/oder NMDA-antagonistische Eigenschaften haben. Vor über 20 Jahren wurde bereits beobachtet, dass Halothan die Hirnentwicklung beeinflussen kann. Ratten, die während der gesamten Schwangerschaft einer kontinuierlichen Halothannarkose ausgesetzt wurden, zeigten schwere Schädigungen des Dendritenwachstums und der Synaptogenese. Dieser Effekt von Halothan war mit Lernbehinderungen, einem verminderten explorativem Verhalten und einem verminderten Reaktionsvermögen verbunden [84],[85],[86]. Ein weiteres volatiles Anästhetikum, welches im unreifen Hirn der Ratte zeitabhängig neurodegenerative Effekte auslöst, ist Isofluran. Hierzu wurden Studien an sieben Tage alten Ratten durchgeführt. In einer *in vitro*-Studie konnten Wise-Faberowski et al. nach einer Expositionszeit von mindestens fünf Stunden bei einer Dosis von 1,5 Vol.% Isofluran neurotoxische Effekte in Hippocampuszellkulturen nachweisen. Dieser Effekt von Isofluran war zeit- und altersabhängig [87]. Im Jahr 2003 veröffentlichten Jevtovic-Todorovic et al., dass 7 Tage alte Ratten nach einer 6-stündigen Exposition gegenüber Isofluran, Lachgas und Midazolam ausgedehnte neurodegenerative Prozesse sowie persistierende Verhaltens- und Lerndefizite aufweisen [65].

Sevofluran, eine häufig verwendete Substanz in der Kinderanästhesie, wurde bisher kaum auf mögliche neurotoxische Effekte im unreifen Hirn untersucht. Berns et al. veröffentlichten im Juli 2009 eine Studie, die Effekte von Sevofluran auf die neuronale Zellentwicklung untersuchte. Neuronale Zellkulturen von Rattenembryonen (E 18) wurden einer Sevoflurandosis zwischen 4 und 8 Vol.% für bis zu 48 Stunden exponiert. In klinisch relevanten Expositionszeiten und Konzentrationen konnten hier keine neurodegenerativen Effekte nachgewiesen werden [88]. Die in dem *in vitro* Modell ermittelten Ergebnisse konnten in der hier vorliegenden Arbeit ebenfalls *in vivo* bestätigt werden. Die Sevofluranexpositionsdauer lag in der vorliegenden Untersuchung zwischen zwei und sechs Stunden. Hierbei konnten auch im Rahmen einer sechsständigen Narkose mit Sevofluran in einer Konzentration von 3-5 Vol.% keine neurotoxischen Effekte im Hirn der sechs Tage alten Ratte nachgewiesen werden. Das Alter der Tiere lag zwischen null und 21 Tagen. Eine zwei Stunden andauernde Anästhesie mit Sevofluran löste in unserem Modell keine erhöhte Rate neurodegenerativer Veränderungen im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen aus.

---

## 4.2 POTENTIELLE NEUROPROTEKTIVE EFFEKTE VON SEVOFLURAN

In der vorliegenden Untersuchung zeigte die Gruppe der sechs Tage alten Ratten, welche zwei Stunden mit Sevofluran behandelt wurde, im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant geringere Degeneration neuronaler Zellen. Außerdem zeigte sich in dieser Gruppe eine im Vergleich zur Kontrollgruppe höhere Gewichtszunahme. Dieser zunächst unerwartete Effekt könnte auf eine neuroprotektive Wirkung dieses Narkotikums bei Kurzzeitanwendung hinweisen. Dieses Phänomen war tendentiell auch bei den drei Tage alten Tieren, welche zwei Stunden mit Sevofluran narkotisiert wurden, nachweisbar, allerdings nicht signifikant. In länger dauernden Narkosen mit Sevofluran zeigte sich kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Anzahl degenerierter Nervenzellen zwischen den Kontroll- und Versuchsgruppen.

Bisher beschäftigten sich Forschungsgruppen mit möglichen neuroprotektiven Effekten von Inhalationsnarkotika bei zerebralen Ischämien bzw. cerebrovaskulären Insulten [89],[90],[91],[92],[93],[95]. Obwohl Sevofluran bisher noch nicht so detailliert untersucht wurde wie z.B. Halothan, deuten die verfügbaren Daten darauf hin, dass Sevofluran im Zusammenhang mit fokaler oder globaler Ischämie neuroprotektiv wirkt [91]. Diese Daten müssen durch weitere Dosisfindungsstudien und Langzeitverhaltensstudien ergänzt werden. Verschiedene Forschungsgruppen haben sich in den letzten Jahren mit der Frage beschäftigt, ob Sevofluran das Ausmaß eines ischämischen Hirninfarktes vermindern kann. Payne et al. zeigten, dass eine Behandlung mit Sevofluran, 15 Minuten oder 24 Stunden vor einem globalen ischämischen Ereignis den neuronalen Schaden im Rattenhirn reduzieren kann [92]. Kehl et al. führten *in vitro* Studien durch, in denen Hippocampusscheiben der Ratte 15 Minuten vor Hypoxie mit Sevofluran vorbehandelt wurden. Nach Reoxygenierung zeigte sich dosisabhängig eine im Vergleich zu den Kontrollen erhöhte Genesung der neuronalen Funktion [93],[94]. Hierbei zeigte sich eine erhöhte Konzentration der antiapoptotischen Proteine *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) und *murine double minute-2* (Mdm-2) und eine Ischämie-induzierte Erhöhung des proapoptotischen Proteins Bax wurde inhibiert. Die Anästhesie mit Sevofluran verursachte zusätzlich eine Reduktion des aktivierten Apoptosemarkers Caspase-3.

Die in dieser Arbeit erhobenen Daten lassen vermuten, dass Sevofluran eine von der Dauer der Exposition abhängige neuroprotektive Wirkung aufweist. Eine Hypothese ist,

---

dass die kurz andauernde Behandlung mit Sevofluran das unreife Hirn der Ratte vor neurodegenerativen Prozessen schützen kann.

Eine Präkonditionierung des Gehirns mit volatilen Anästhetika zur Prophylaxe oder Reduktion des Ausmaßes eines ischämischen Schadens könnte in der Zukunft eine Rolle bei vaskulären Eingriffen mit einem hohem Risiko für Apoplexie spielen. Eine weitere Möglichkeit des Einsatzes von Sevofluran zur Reduktion von Morbidität und Mortalität von Patienten sind kardiochirurgische oder neurochirurgische Interventionen, bei welchen mit ischämischen Episoden gerechnet werden muss <sup>[95]</sup>. Dieser potentielle Nutzen von Sevofluran könnte, insbesondere bei Patienten mit kardialen oder neuronalen Erkrankungen, eine weitere Diskussion um die Wahl des am besten geeigneten Anästhetikums anregen.

### **4.3 APOPTOSE WÄHREND DER HIRNENTWICKLUNG**

Die Ergebnisse der hier durchgeführten Untersuchungen mit Sevofluran ergaben keinen Hinweis für eine neurotoxische Wirkung dieses Anästhetikums. Aus diesem Grund wurde auf elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Differenzierung des Zelltodes verzichtet. Die durchgeführte DeOlmos Kupfersilberfärbung und die TUNEL-Färbung erlauben allerdings keine definitive Aussage über die Art des Zelltodes. Bei der Färbung nach deOlmos werden die Zellmembranen der degenerierenden Neuronen durchlässig für Silbersalz und dieses kann in die Zellen eindringen. Die TUNEL-Färbung weist freie DNA-Enden nach. Beide Methoden schließen Nekrose und Autolyse nicht aus.

Während der Hirnentwicklung spielt der Vorgang der Apoptose eine übergeordnete Rolle. Im Rahmen der Hirnreifung werden Neuronen im Überschuss produziert und auf etwa die Hälfte ihrer Ausgangszahl reduziert. Der programmierte Zelltod kann auf allen Stufen der neuronalen Reifung nachgewiesen werden; am häufigsten allerdings sind reife Neuronen betroffen, welche bereits über Verbindungen zu afferenten und efferenten Zellen verfügen <sup>[96]</sup>. Laut Oppenheimer könnte Apoptose folgende Funktionen für das Individuum haben: Es sollen optimale Zahlenverhältnisse zwischen den verschiedenen Neuronenpopulationen sowie zwischen Neuronen und ihren Zielzellen erreicht werden. Des Weiteren dient der physiologische Zelltod zur Korrektur von Fehlern; Zellen mit fehlerhaften interzellulären Verbindungen werden eliminiert. Außerdem werden überflüssige Zellen und Zellen einer früheren Entwicklungsstufe

---

eliminiert. Weitere Funktionen der Apoptose sind laut Oppenheimer die Entfernung ektopter Zellen, Morphogenese und Plastizität. In der Erforschung der Regulation apoptotischer Vorgänge im Gehirn sind bis heute bereits viele Faktoren identifiziert worden, die den programmierten Zelltod von Neuronen fördern oder inhibieren können [97]. Die Bedeutung des programmierten Zelltodes für die Entwicklung des Nervensystems wird besonders durch die Vielzahl von neurologischen Krankheitsbildern ersichtlich, bei denen ein Zusammenhang mit fehlerhafter Apoptoseregulation diskutiert wird [98],[99]. Kongenitale Fehlbildungen wie die Myelomeningozele oder von Nervenzellvorläufern ausgehende Tumorerkrankungen wie das Neuroblastom gelten als Beispiele für eine zu geringe Apoptoseaktivität. Auch für Nervenzelluntergänge im Rahmen des M. Alzheimer werden apoptotische Vorgänge diskutiert [100].

Zusammenfassend kann mit der vorliegenden Arbeit keine Aussage zu den exakten neuropathologischen Veränderungen nach einer Narkose mit Sevofluran getätigt werden, da eine Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose untergegangener Nervenzellen in den Untersuchungen nicht vorgenommen wurde.

#### **4.4 WIRKMECHANISMEN VON SEVOFLURAN**

Die Wirkstärke von Anästhetika steigt mit ihrer Lipophilie. Die Wirkung ist aber nicht alleine durch ihre Lipidlöslichkeit und ihre damit verbundene Anreicherung in den Zellmembranen zu erklären [101]. Die wichtigsten Zielstrukturen für Anästhetika sind ligandenaktivierte Ionenkanäle [102]. Dazu gehören unter anderem der nicotinische Acetylcholinrezeptor, die Serotonin-Typ-3-Rezeptoren, Glutamatrezeptoren, die durch NMDA,  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA) oder Kainat aktiviert werden, sowie Glycin- und GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren [103]. Während die exakten Mechanismen, über welche volatile Substanzen eine Anästhesie induzieren, bisher noch nicht vollständig aufgeklärt sind, steht fest, dass alle volatilen Anästhetika entweder GABA-mimetisch und/oder NMDA-antagonistisch wirken [104]. Dabei hängt deren Wirkung stark von dem hauptsächlich beeinflussten Rezeptor ab [105].

In den vorliegenden Studien mit Sevofluran werden die neuronalen Effekte insbesondere auf die Wirkung des Narkotikums am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor zurückgeführt. In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die Modulation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors der

---

Schlüsselmechanismus für die hypnotische und sedative Wirkung von Sevofluran ist. Das Pharmakon Sevofluran fungiert also primär als GABA<sub>A</sub>-Agonist. Dabei spielt der  $\beta_2$ -Rezeptor-Subtyp, welcher etwa 50% aller GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im Gehirn ausmacht, eine Schlüsselrolle in der sedierenden und amnestischen Wirkkomponente <sup>[106]</sup>. Die zudem induzierte Muskelrelaxierung wird durch eine Bindung des Narkotikums an den  $\beta_3$ -Rezeptor-Subtyp erzeugt <sup>[107],[108]</sup>. Welchen Einfluss die Bindung des Narkotikums Sevofluran an weitere Rezeptoren auf die neuronale Entwicklung des Hirns ausübt, ist zu diesem Zeitpunkt noch offen. Zu diesen Rezeptoren gehören insbesondere der Glycin-Rezeptor, der nikotinerge Acetylcholinrezeptor und der 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor (5HT<sub>3</sub>-Rezeptor).

Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass Sevofluran zusätzlich Glycinrezeptoren moduliert und hier eine agonistische Wirkung aufweist <sup>[22],[109],[110],[111]</sup>. Zhang et al. zeigten, dass die minimale alveoläre Konzentration volatiler Anästhetika, bei der 50% aller Patienten auf eine Hautinzision nicht mehr mit Abwehrbewegungen reagieren (MAC-Wert) durch Zugabe von Strychnin, einem kompetitiven Antagonisten am Glycinrezeptor, steigt. Dies lässt darauf schließen, dass Glycinrezeptoren am muskelrelaxierenden Effekt von Narkotika beteiligt sind <sup>[112]</sup>. Glycin ist ein wichtiger inhibitorischer Transmitter im Rückenmark und Hirnstamm. Der postsynaptische Rezeptor für Glycin ähnelt dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor. <sup>[113]</sup>. In der Entwicklung des Menschen scheint bei diesem Rezeptor ebenfalls eine Umschaltung von exzitatorisch zu inhibitorischen Effekten ähnlich den GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren stattzufinden. Dies dürfte auch die Ursache für das Verschwinden von Neugeborenenreflexen im Verlauf der Entwicklung sein. Offen bleibt bisher die Frage, in welcher Intensität die Effekte von Sevofluran durch agonistische Wirkung am Glycin-Rezeptor beeinflusst werden.

Ein weiterer Rezeptor, welcher durch Sevofluran beeinflusst wird, ist der neuronale nicotinische Acetylcholinrezeptor <sup>[22],[109],[111]</sup>. Im Gegensatz zu dem Anästhetikum Propofol, bei welchem ein modulierender Effekt auf diesen Rezeptor nur in sehr hohen Konzentrationen nachweisbar ist, wird dieser Acetylcholinrezeptor durch volatile Narkotika bereits in Konzentrationen unterhalb des MAC inhibiert <sup>[114]</sup>. Nicotinerge Acetylcholinrezeptoren spielen eine wichtige Rolle während der Entwicklung und Reifung des Hirns. Die Aktivierung der Rezeptoren führt in der postnatalen Entwicklung zur Knüpfung synaptischer Kontakte und Verbindungen. Eine Antagonisierung kann mit

---

einer Beeinträchtigung kognitiver Fähigkeiten einhergehen. Perinatale Manipulationen am cholinergen System können erhebliche Schäden der kortikalen Struktur mit resultierenden kognitiven Einbußen verursachen. Als Beispiele hierfür sind Asphyxie oder Missbrauch toxischer Substanzen wie Alkohol zu erwähnen <sup>[32]</sup>. Die Bindung von Sevofluran an den Acetylcholinrezeptor während der Phase des rapiden Hirnwachstums könnte folglich mit einer gestörten Hirnentwicklung einhergehen. Jedoch lässt sich nach heutigem Erkenntnisstand nur spekulieren, welchen Stellenwert die Antagonisierung dieses Rezeptors durch die Behandlung mit Sevofluran im Vergleich zu den hier aufgeführten weiteren Rezeptoren aufweist.

Ob Sevofluran einen modulierenden Effekt auf 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren hat, ist noch nicht vollständig geklärt. Der größte Anteil dieser Rezeptoren ist im Hirnstamm, dem Hippocampus und den Amygdalae lokalisiert <sup>[110]</sup>. Serotonin hat Einfluss auf die neuronale Proliferation, Differenzierung, Migration und Synaptogenese. Es kann bereits im befruchteten Ei nachgewiesen werden. Das frühe Auftreten von Serotonin und seines Rezeptors während der pränatalen Entwicklung zeigt, dass dieses biogene Amin eine große Rolle in der Morpho- und Synaptogenese im Hirn spielt. Zusätzlich ist es mitverantwortlich für die Morphogenese des Herzens und des kraniofazialen Epithels. Serotoninrezeptorinhibition in der embryonalen Entwicklung kann kraniofaziale Malformationen zur Folge haben. Eine exzessive oder eine inadäquate Aktivierung spezifischer Serotoninrezeptoren während der Entwicklung wird mitverantwortlich gemacht für die Entwicklung psychiatrischer Erkrankungen wie Angststörungen, Abhängigkeit und Autismus <sup>[32]</sup>.

Die Frage ob eine Bindung und Aktivierung von Sevofluran an nicotinische Acetylcholinrezeptoren, an Serotonin-Typ-3-Rezeptoren oder an Glycinrezeptoren vor einer neurotoxischen Wirkung schützt, bleibt bisher offen. Weiterführende Studien sind notwendig, um die genauen Wirkmechanismen von Sevofluran und deren klinische Relevanz ermessen zu können. Die zukünftige Erforschung der Wirkmechanismen von Anästhetika ist ein wegweisender Schritt zur Abschätzung neuronaler Folgeschäden und könnte zu der Entwicklung eines „idealen“ Narkotikums maßgeblich beitragen.

---

## 4.5 UNERWÜNSCHTE EFFEKTE BEI ANWENDUNG VON SEVOFLURAN

Die vorliegende Untersuchung ergab keinen Hinweis auf eine neurotoxische Wirkung von Sevofluran im unreifen Hirn der Ratte. In der Kinderanästhesie hat sich Sevofluran aufgrund vieler Vorteile gegenüber anderen Anästhetika etabliert, unter anderem wegen seiner einfachen Handhabung, hämodynamischen Stabilität, dem Fehlen einer relevanten Beeinflussung der Nierenfunktion und des geringen Risikos einer Hepatotoxizität. Bis 1995 lagen 5 publizierte Fälle einer hepatischen Dysfunktion nach etwa 3 Millionen Narkosen mit Sevofluran vor <sup>[48]</sup>. Jedoch sind im Zusammenhang mit der Anwendung von Sevofluran unerwünschte Effekte beschrieben, deren Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind und welche sogar eine neurotoxische Wirkung dieses Anästhetikums befürchten lassen.

Dazu gehören:

- Das Exzitationssyndrom

Bei Narkoseeinleitung mit Sevofluran in reinem Sauerstoff, kommt es bei etwa einem Drittel der pädiatrischen Patienten zu Exzitationen, die zu einer Verzögerung der Narkoseeinleitung führen können. Sie beginnen etwa eine Minute nach Start der Inhalation von Sevofluran und dauern im Durchschnitt etwa eine Minute. Diese Exzitationen beinhalten unwillkürliche Bewegungen wie Muskelzuckungen sowie tonische, tonisch-klonische und klonische Muskelkrämpfe sowie einen kurzfristigen Anstieg der Herzfrequenz. Der zugrunde liegende Mechanismus ist gegenwärtig nicht bekannt <sup>[51],[52]</sup>.

- Postoperative Unruhezustände

Im Allgemeinen erwachen Kinder nach einer Sevoflurannarkose sehr rasch, etwa doppelt so schnell wie z.B. nach einer Halothannarkose <sup>[115]</sup>. Es wurde gezeigt, dass auch schmerzfreie Kinder nach Sevoflurannarkosen mehr Unruhezustände aufweisen als nach Halothananästhesien. Die Kinder scheinen ruhig aufzuwachen und durch einen äußeren Reiz in einen Zustand der Unruhe und Agitiertheit angestoßen zu werden. Diese Zustände sind in der Regel selbstlimitierend <sup>[52],[53],[54]</sup>.

Kain et al. verglichen in einer prospektiven, doppel-blinden, randomisierten und kontrollierten Studie postoperative Auffälligkeiten bei drei- bis zehnjährigen Kindern

---

nach Anästhesie mit Sevofluran gegenüber Halothan. Die Autoren fanden allerdings keine Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen: weder in der Häufigkeit von postoperativer Agitiertheit noch im Schlafverhalten noch in der Häufigkeit postoperativer Verhaltensauffälligkeiten. Sie kommen zu dem Schluss, dass Kleinkinder durch die Narkose mit Sevofluran kein höheres Risiko für Verhaltensauffälligkeiten oder Schlafstörungen aufweisen. Keaney et al. untersuchten postoperative Verhaltensauffälligkeiten bis 30 Tage nach Operation in Sevofluran- oder Halothannarkose. Obwohl die Kinder mit Sevoflurananästhesie bei Narkoseende häufiger agitiert waren, ergaben sich insgesamt keine Unterschiede hinsichtlich postoperativer Verhaltensauffälligkeiten <sup>[48],[55]</sup>.

- Maligne Hyperthermie

Sevofluran ist wie die etablierten Inhalationsanästhetika eine Triggersubstanz der malignen Hyperthermie und darf daher bei Patienten mit einem Verdacht oder einer Prädisposition für diese Erkrankung nicht eingesetzt werden. Die Triggerpotenz wurde tierexperimentell am Schweinmodell demonstriert, allerdings war die maligne Hyperthermie weniger stark ausgeprägt als nach Halothanapplikation, eine Ursache hierfür ist nicht bekannt <sup>[51],[116]</sup>.

- Krampfanfälle

Das krampfauslösende Potential von Sevofluran kann als gering eingestuft werden und ist in Bezug auf die Häufigkeit mit Isofluran vergleichbar. In einigen Kasuistiken wurden jedoch tonisch-klonische Bewegungen bzw. kurz dauernde Krampfpotentiale mit der Anwendung von Sevofluran in Verbindung gebracht <sup>[50]</sup>. Dabei wurde allerdings entweder parallel kein EEG aufgezeichnet, EEG-Veränderungen gingen nicht mit tonisch-klonischen Bewegungen einher oder standen im zeitlichen Zusammenhang mit der Applikation von Opioiden, die ein krampfauslösendes Potential aufweisen <sup>[48]</sup>. Bei Patienten mit einer Epilepsie wird von einigen Autoren eine besondere Empfindlichkeit gegenüber Sevofluran angenommen. Studien zur Anwendung von Sevofluran bei Kindern mit Epilepsieerleidern liegen nicht vor, so dass man sich nur auf Untersuchungen bei Erwachsenen beziehen kann. Eine adäquate, niedrigere Dosierung von Sevofluran bei pädiatrischen Patienten mit Epilepsie wird empfohlen <sup>[117],[118]</sup>.

---

Eine weitere Erforschung der Ursachen dieser beschriebenen unerwünschten Phänomene ist notwendig, um herauszufinden, ob und inwieweit Sevofluran das reife Gehirn beeinflussen kann. In der hier durchgeführten Arbeit konnten zwar keine neuropathologischen Schädigungen nach Sevoflurananarkosen am Tier nachgewiesen werden, jedoch beschränkten sich die Untersuchungen auf eine Quantifizierung untergegangener Nervenzellen. Wünschenswert wäre die Durchführung von Verhaltensstudien, um herauszufinden, inwieweit die Anästhesie mit Sevofluran während der Hirnentwicklung zu Verhaltensauffälligkeiten oder Lerndefiziten führen kann.

## **4.6 METHODENKRITIK**

### **4.6.1 WIRKUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER EXPOSITIONSDAUER**

In der hier vorliegenden Untersuchung zeigte sich unter zunehmender Dauer der Narkose mit Sevofluran ein signifikanter Anstieg degenerierter Zellen im Hirn der neugeborenen Ratte. Unter der längsten Expositionszeit von sechs Stunden zeigte sich dabei allerdings kein Unterschied zu den unbehandelten Kontrolltieren, wohingegen die nur kurz (zwei Stunden) behandelten Tiere signifikant niedrigere Scores als ihre zugeordneten Kontrollen aufzeigten.

In der Gruppe der sechs Stunden mit Sevofluran narkotisierten Tiere starben 23 Prozent der behandelten Ratten während des Versuches. Zusätzlich zeigten sich bei den vier und sechs Stunden mit Sevofluran behandelten Ratten eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verminderte Gewichtszunahme im Verlauf von 24 Stunden. Trotz zusätzlicher subkutaner Injektionen von Glukose und kontinuierlicher Wärmezufuhr mit Hilfe von Wärmeplatten kann hierbei eine Hypoalimentation und/oder eine Hypothermie nicht sicher ausgeschlossen werden. Sowohl die mit Sevofluran behandelten als auch die Kontrolltiere erhielten bei vier Stunden oder länger andauernden Versuchen nach der Hälfte der Versuchszeit, wie im Methodenteil der Arbeit beschrieben, gewichtsadaptiert fünf-prozentige Glukoselösung subkutan injiziert. Hierbei ist zu diskutieren, ob die applizierte Menge der substituierten Flüssigkeit adäquat war. Ein zukünftiger Ansatzpunkt wäre die repetitive Gabe kleinerer Mengen Flüssigkeit, um eine im Verlauf des Versuches kontinuierliche Aufrechterhaltung der Homöostase der Tiere

zu ermöglichen. Die Blutglukosespiegel der behandelten Jungtiere wurden während der hier durchgeführten Versuche aufgrund der geringen Größe der Tiere und deren kleinem Blutvolumen nicht überwacht. Es wurden Studien veröffentlicht, die den Einfluss der Blutglukosekonzentration unter der Narkose mit Isofluran auf neuronale Schäden an jungen Mäusen untersuchten. Hierbei zeigte sich, dass die unter der Behandlung gemessenen Blutzuckerwerte keinen Einfluss auf das Ausmaß der neuroapoptotischen Wirkung aufwiesen <sup>[119]</sup>.

Die bei den mit Sevofluran behandelten Tieren aufgetretene verminderte Gewichtszunahme der vier Stunden oder länger anästhesierten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ist zusätzlich dadurch zu erklären, dass die neugeborenen Ratten nach Beendigung der Narkose eine gewisse Zeit bis zur selbstständigen Nahrungsaufnahme benötigten.

Weiterhin mögen auch respiratorische Veränderungen im Sinne einer Atemdepression der Ratten mit zunehmender Dauer des Versuches eine Rolle gespielt haben. Das Monitoring bestand aus dem Auszählen der Atemfrequenz und Begutachtung der Hautfarbe der Tiere während der Narkose. Zusätzlich wurden exemplarisch arterielle Blutgasanalysen durch direkte Punktion des linken Ventrikels durchgeführt. Hierzu wurden vier Stunden mit Sevofluran behandelte Tiere sofort nach Narkose einer kardialen Punktion ausgesetzt. Jedoch müssen diese Ergebnisse aus folgenden Gründen sehr zurückhaltend interpretiert werden:

1. Trotz kardialer Punktion war die Blutmenge einer neugeborenen Ratte, die für eine Blutgasanalyse benötigt wird, nicht ausreichend, so dass insgesamt nur eine Probe analysiert werden konnte.
2. Die Punktion musste blind erfolgen. Aus diesem Grund konnte nicht mit Sicherheit gewährleistet werden, dass der linke Ventrikel punktiert wurde. Eine genaue Unterscheidung, ob es sich um eine arterielle oder venöse Probe handelt, war somit nicht möglich.
3. Die Zeitspanne zwischen Ende der Narkose mit Sevofluran und Blutgewinnung war mit einer Dauer von zwei bis fünf Minuten zu lang, um exakte Aussagen über den Säure-Basen-Haushalt der Tiere während der Narkose erstellen zu können.

---

#### 4.6.2 WIRKUNGEN IN ABHÄNGIGKEIT VOM ALTER DER TIERE

Die vorliegenden Untersuchungen auf eine altersabhängigen Neurodegeneration unter der Mononarkose mit Sevofluran zeigten im Vergleich zu Kontrolltieren gleichen Alters keine Erhöhung apoptotischer Nervenzelluntergänge. Jedoch war die Anzahl der Kontrolltiere zu gering, um eine statistische Berechnung durchzuführen. In dieser Studie zeigten sich auch in einer Phase der größten Vulnerabilität des Gehirns am sechsten Lebensstag der Ratte unter Sevofluran keine quantitativ höheren Schäden als bei Kontrolltieren des gleichen Alters. Mit steigendem Alter der Ratten zeigte sich sowohl ein Abfall der physiologischen Apoptoserate bei den Kontrolltieren als auch des neurodegenerativen Scores der mit Sevofluran behandelten Tiere. Die Elimination überschüssig angelegter Neuronen und Gliazellen durch Apoptose im Rahmen der Hirnentwicklung nimmt physiologisch mit zunehmenden Alter ab <sup>[120]</sup>.

In vorhergehenden Untersuchungen wurde eine altersabhängige Empfindlichkeit des Rattenhirns gegenüber Noxen nachgewiesen <sup>[62],[65],[121]</sup>. Die durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisten und NMDA-Rezeptor-Antagonisten induzierte Apoptose ist im Alter von sechs bis zehn Tagen im Hirn der Ratte am stärksten ausgeprägt. Nach diesem Zeitpunkt nimmt die maximale Empfindlichkeit bis zur dritten Lebenswoche ab. Hierzu wurden mehrere Studien an Ratten mit Ethanol, Traumata und Antiepileptika durchgeführt und diese Altersabhängigkeit bestätigt <sup>[121],[122],[123],[124]</sup>. Wise-Faberowski untersuchten in einer in-vitro-Studie altersabhängige neurotoxische Effekte von Isofluran. Hierbei zeigte sich die größte Anzahl degenerierter Nervenzellen bei sieben Tage alten, mit Isofluran behandelten Hippokampusscheiben der Ratte <sup>[87]</sup>. In der hier vorliegenden Untersuchung konnte eine neurotoxische Wirkung von Sevofluran auch in dieser vulnerablen Phase nicht nachgewiesen werden.

### 4.7 PROBLEME DER ANÄSTHESIE AM TIERMODELL

#### 4.7.1 DAUER DER EXPOSITION

In früheren Studien traten neurodegenerative Effekte bei neugeborenen Ratten auf, nachdem diese lang andauernd gegenüber Anästhetika exponiert waren <sup>[59],[125],[126]</sup>. Aus der Perspektive der Entwicklungskurve ist diese lange Dauer einer Exposition mit einer mehrwöchigen Anästhesie beim menschlichen Neugeborenen gleichzusetzen <sup>[127]</sup>.

---

Dieser Fall tritt jedoch klinisch sehr selten auf. In Studien mit Ketamin konnte beispielsweise gezeigt werden, dass durch die einmalige intraperitoneale Applikation von Ketamin bei sieben Tage alten Ratten keine erhöhte Neurodegeneration im Vergleich zu Kontrolltieren auftrat <sup>[128]</sup>. Auch die Gewichtsentwicklungskurve zeigte sich hierbei nicht negativ beeinflusst. Bei repetitiver Applikation von Ketamin zeigte sich jedoch neben einem Anstieg des neuronalen Zelltodes eine verminderte Gewichtszunahme im Vergleich zu Placebogruppen.

Diese Studien legen den Verdacht nahe, dass das längerfristige Ausgesetztsein durch anästhetischen Substanzen ein essentieller Faktor bei der Entstehung neuronaler Schäden und Wachstumsstörungen darstellt, jedoch in der Praxis in Bezug auf die Dauer der Exposition meist irrelevant ist.

Andere Studien zeigen wiederum, dass auch die kurzfristige Exposition mit Alkohol oder anderen anästhetischen Stoffen eine zwei- bis vierfache Erhöhung untergegangener Nervenzellen zur Folge haben kann <sup>[129]</sup>. Dies zeigt wiederum die Abhängigkeit der neurotoxischen Wirkung von der applizierten Substanz.

#### **4.7.2 EFFEKTE EINER MANGELERNÄHRUNG AUF DAS UNREIFE GEHIRN**

Nagetiere säugen während und im Anschluss an eine Narkose nicht. Eine bedarfsgerechte kontinuierliche Versorgung mit Flüssigkeit und Nährstoffen stellt einen wichtigen Baustein in der Entwicklung der Jungtiere dar, ist aber im Tiermodell mit neugeborenen Ratten nur eingeschränkt möglich. Eine verminderte Gewichtszunahme kann als Folge einer länger andauernden Narkose resultieren und dabei eine wichtige Rolle in der frühen Hirnentwicklung spielen. Klinische und experimentelle Forschungen haben eine Malnutrition mit mangelnder Gewichtszunahme und späteren Lernschwierigkeiten verknüpft <sup>[130],[131],[132],[133]</sup>. Einige Forschungsgruppen erwähnen in ihren Publikationen trotz ihrer enormen Wichtigkeit die Gewichtskurven der in ihren Versuchen behandelten Tiere nicht.

#### **4.7.3 CEREBRALE SAUERSTOFFVERSORGUNG WÄHREND DER NARKOSE**

Anästhetische Substanzen setzen zum einen die Hirnaktivität und zum anderen dosis- und substanzabhängig die Kreislauffunktion und die Atmung herab. Dieses kann

---

wiederum zu einer Minderung der cerebralen Perfusion und sogar zu Hypoxie führen. Hypoxie und Ischämie während einer länger andauernden Narkose können eine ausgeprägte Neurodegeneration im unreifen Gehirn erzeugen <sup>[134]</sup>. Ein Monitoring der Vitalparameter ist im Tierversuch der Ratte häufig nur in Form von Beobachtung der Hautfarbe und Auszählung der Atemfrequenz möglich. Daher wird eine während der Narkose auftretende vorübergehende Hypoxie möglicherweise nicht erkannt. Die Verabreichung von Anästhetika bei Säuglingen und Kleinkindern ist von kontinuierlichem Monitoring des Blutdrucks, der Herzfrequenz und der Sauerstoffsättigung begleitet, so dass bei geringsten Abweichungen der Vitalparameter verschiedene Therapieformen eingesetzt werden können, um diese Parameter zu regulieren.

#### **4.7.4 EFFEKTE VON SCHMERZREIZEN MIT UND OHNE ANÄSTHETIKA**

Die längerfristige Anwendung anästhetischer Substanzen in der Neonatalperiode führt zur Blockierung der Wahrnehmung verschiedenster Stimuli auf das unreife zentralnervöse System während der Phase des rapiden Hirnwachstums. In verschiedenen Studien wurde der Effekt repetitiver Schmerzreize an neugeborenen Ratten untersucht. Hierbei konnten langfristige Verhaltensänderungen und Auffälligkeiten in der Schmerzwahrnehmung der behandelten Tiere festgestellt werden <sup>[135]</sup>. Eine begleitende Behandlung mit Morphin reduzierte diesen Effekt <sup>[136]</sup>. Dieses Erkenntnis lässt vermuten, dass die Langzeitfolgen von Anästhetika davon abhängen, ob sie in Gegenwart oder in Abwesenheit von Schmerzreizen verabreicht werden. Das bedeutet, dass ein Eingriff ohne Anästhesie eine ebenso schädigende Wirkung auf das sich entwickelnde Gehirn ausüben kann wie eine Behandlung mit anästhetischen Substanzen mit folglich Schmerzfreiheit <sup>[137]</sup>.

In den durchgeführten Untersuchungen mit Sevofluran wurden die neugeborenen Ratten einer Anästhesie ohne regelmäßige zusätzliche Schmerzreize ausgesetzt. Damit bleibt die Frage offen, welche zusätzlichen Auswirkungen additive Schmerzstimuli während der Narkose auf die neuronale Entwicklung der Jungtiere gehabt hätten.

---

## 4.8 KLINISCHE RELEVANZ

Die vorliegenden Ergebnisse lassen vermuten, dass Sevofluran im reifenden Gehirn des Menschen wahrscheinlich ebenfalls keine wesentlichen toxischen Effekte zur Folge hat und zeit- und dosisabhängig sogar neuroprotektiv wirken kann. Jedoch sind Schlussfolgerungen dieser Art aufgrund fehlender weiterführender Studien zu diesem Zeitpunkt nicht möglich.

### 4.8.1 ÜBERTRAGBARKEIT DER EXPERIMENTELLEN ERGEBNISSE

Die Ergebnisse dieser Versuche lassen sich nicht ohne Weiteres auf die klinische Situation übertragen, da erhebliche pharmakokinetische Unterschiede zwischen Nagetieren und Menschen bestehen.

Die in dieser Studie verwendete Dosierung von Sevofluran lag bei drei bis fünf Vol.%, da sich in Dosisfindungsstudien zeigte, dass die Versuchstiere bei dieser Konzentration des Inhalationsnarkotikums fest schliefen, ohne Zeichen kardiovaskulärer bzw. respiratorischer Insuffizienz zu zeigen. Diese Dosierung lässt sich nicht ohne Weiteres auf Säuglinge und Kleinkinder übertragen, diese variiert individuell und altersabhängig.

Im weiteren Verlauf der Untersuchung von Sevofluran auf mögliche neurotoxische Effekte sind Verhaltensstudien an mit Sevofluran behandelten Tieren unabdingbar, um potentielle langfristige Hirnschäden, Verhaltensänderungen und Störungen von Gedächtnisleistungen zu untersuchen.

Nachdem sich in den bisherigen Untersuchungen kein Hinweis auf neurotoxische Effekte von Sevofluran an neugeborenen Ratten gezeigt hat, sollte ein nächster Schritt die Testung des Medikamentes an anderen Spezies sein. Die Zielsetzung ist hierbei, sicherere Rahmenbedingungen für den Gebrauch am Menschen zu schaffen. In einer vorhergegangenen Studie wurde beispielsweise bereits Ketamin an pränatalen und an jungen Affen auf mögliche neurodegenerative Effekte untersucht. Hier konnte altersabhängig eine erhöhte Apoptoserate verzeichnet werden <sup>[138]</sup>. Rizzi et al. veröffentlichten eine Studie, die sich mit der Wirkung von Anästhetika auf das unreife Gehirn von Meerschweinchen beschäftigte. Hierzu wurden fetale Meerschweinchen über das Muttertier einer kurzen Narkose mit Isofluran, entweder alleine oder in Kombination mit Lachgas und/oder Midazolam ausgesetzt. Diese Exposition erfolgte zum Zeitpunkt

---

der größten Vulnerabilität des Gehirns des Meerschweins. Im Rahmen dieser Studie konnte ein ausgeprägter neuronaler Zelluntergang nachgewiesen werden <sup>[139]</sup>.

#### **4.8.2 MEDIKAMENTENKOMBINATIONEN IN DER ANÄSTHESIE**

In der perioperativen Phase sind Patienten gewöhnlich simultan oder aufeinanderfolgend einer Kombination von verschiedenen Anästhetika ausgesetzt. Da die Mehrheit dieser Substanzen GABA<sub>A</sub>-mimetische und/oder NMDA-antagonistische Eigenschaften hat, bleibt die Frage offen, ob diese Substanzen synergistisch oder additiv neurotoxische Effekte hervorrufen. Das Hauptargument für die Verwendung von Kombinationsnarkosen ist, dass durch den verminderten Bedarf des einzelnen Anästhetikums potentielle Nebenwirkungen, hervorgerufen durch erhöhte Konzentrationen einer Substanz, vermieden werden können. Dieses Argument wird kontrovers diskutiert, da in experimentellen Studien gezeigt werden konnte, dass die Anwendung mehrerer Anästhetika neurotoxische Effekte verstärken kann <sup>[80],[140]</sup>, die mit Folgeschäden wie persistierenden kognitiven Defiziten einhergehen können <sup>[65]</sup>.

Das in dieser Arbeit untersuchte Medikament Sevofluran, wird im klinischen Gebrauch in der perioperativen Phase ebenfalls häufig in Kombination mit anderen Substanzen verwendet. Dazu gehören unter anderem Benzodiazepine (z.B. Midazolam), Opioide (z.B. Remifentanyl) und intravenöse Narkotika (z.B. Propofol). Um neurodegenerative Effekte dieser Medikamentenkombinationen nachzuweisen oder auszuschließen, bedarf es zunächst Untersuchungen jedes einzelnen Medikamentes auf potentielle neurotoxische Effekte. Zudem sollte in Folgeuntersuchungen die Kombination dieser Substanzen auf mögliche neurotoxische Effekte getestet werden, um für die Zukunft möglichst sichere Regime für die Anästhesie von Früh- und Neugeborenen zu entwickeln.

---

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Jedes Jahr werden etwa 1,5 Millionen Feten und Neugeborene anästhetischen Substanzen ausgesetzt <sup>[141]</sup>. Hierbei ist der GABA<sub>A</sub>-Agonist Sevofluran aufgrund seiner guten Verträglichkeit ein häufig verwendetes Narkotikum.

Da GABA eine wichtige trophische Rolle während der frühen Hirnentwicklung spielt, kann eine Beeinträchtigung der Funktion der GABAergen Transmission während dieser Periode die Entwicklung neuronaler Vernetzungen und die Plastizität neuronaler Netzwerke erheblich beeinträchtigen. Dieser Entwicklungszeitraum, welcher auch als Phase des rapiden Hirnwachstums bezeichnet wird, umfasst bei der Ratte die ersten drei Lebenswochen. Das Maximum dieser Phase wird für das Tiermodell der Ratte zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag erreicht. Beim Menschen befindet sich dieser Zeitraum zwischen dem dritten Trimenon der Schwangerschaft und dem Ende des zweiten Lebensjahres.

In der vorliegenden Arbeit wurde Sevofluran auf mögliche neurodegenerative Effekte auf das Gehirn der neugeborenen Ratte untersucht.

Nach variiert Dauer einer Inhalationsnarkose mit Sevofluran von zwei bis sechs Stunden wurden null bis 21 Tage alte Ratten nach 24 Stunden Überlebenszeit getötet und deren Gehirne nach deOlmos-Kupfersilberfärbung bzw. TUNEL-Färbung lichtmikroskopisch untersucht und ausgewertet. Dazu wurde die stereologische Dissektionsmethode nach *Gundersen* verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Methode, bei der die numerische Dichte der degenerierten Zellen in 17 verschiedenen Gehirnregionen ermittelt, anschließend pro Tier ein kumulativer Score addiert und schließlich statistisch ausgewertet wird.

Sevofluran löste am Tiermodell der neugeborenen Ratte keine neurodegenerativen Effekte aus. Hierbei wurden sowohl das Alter der Ratte als auch die Dauer der Narkose variiert. Mit steigendem Alter der Ratten zeigte sich sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei der Gruppe der behandelten Tiere eine Abnahme des neurodegenerativen Summenscores. Mit zunehmender Dauer der Versuche konnte eine Erhöhung der neurodegenerativen Scores verzeichnet werden.

Die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die klinische Praxis beim Menschen ist durch einige Sachverhalte wie z.B. die pharmakodynamischen und –kinetischen Unterschiede im Vergleich zum Menschen nicht ohne Weiteres möglich.

Zukünftig sind klinische Studien zur Bewertung des Ausmaßes einer Neurotoxizität von Anästhetika erforderlich, um noch sicherere Strategien für die Narkose von Früh- und Neugeborenen zu entwickeln.

---

## 6 ANHANG

### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Loepke WL, Soriano SG: An Assessment of the Effects of General Anesthetics on Developing Brain Structure and Neurocognitive Function. *Anesthesia & Analgesia* 106(6) (2008) 1681-1707
- [2] Long CW: An account of the first use of sulphuric ether by inhalation as an anesthetic in surgical operations. *South Med J.* 5 (1849) 710
- [3] Steward DJ: History of Pediatric Anesthesia. In: Gregory GA. Ed. *Pediatric Anesthesia*. Second Edition. New York, NY: Churchill Livingstone Inc. (1983) 1-14
- [4] Avery ME: Milestones in Pediatric Research. *Biol Neonate* (2001) 80: 3-6
- [5] Simic D, Dragovic S, Budic I: History of Pediatric Anesthesiology. *Srp Arh Celok Lek.* (2007) 135(1-2): 111-117
- [6] Larsen: *Anästhesie*. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München (2006) 1081-1139
- [7] Striebel HW: *Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin*. Schattauer Verlag Stuttgart. 6. Auflage (2005) 231-245
- [8] Frei FJ, Erb T, Jonmarker C, et al.: *Kinderanästhesie*. Springer Verlag (2004) 17-39
- [9] Bihlmayr J, Craß D, Sollmann V: *Kinderanästhesie (Kompendium)*. Klinikum Augsburg; Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin. 5. Auflage (2006) 1-99
- [10] Kretz FJ, Schäffer J: *Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin Schmerztherapie*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, 4. Auflage (2006) 200-207
- [11] Jöhr M: Tiny patients – big problems. *Anästh.Intensivmed* 46 (2005) 358-372
- [12] Kretz, FJ, Becke K: *Anästhesie und Intensivmedizin bei Kindern*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2. Auflage (2006) 26-32
- [13] Mellon RD, Simone AF, Rappaport BA: Use of anesthetic agents in neonates and young children. *Anesth and Analg* 104(3) (2007) 509-520

- 
- [14] Arzneimittel für Kinder: Häufig am Rand der Legalität. Deutsches Ärzteblatt 105(6) (2008) 257-258
- [15] Scholz J: Sevoflurane in pediatric anesthesia. Malignant hyperthermia. Anästhesist 47 (1998) S43 - S48
- [16] Strauss JM, Giest J: Total intravenous anesthesia. On the way to standard practice in pediatrics. Anaesthesist 52(9) (2003) 763-777
- [17] Grundmann U, Uth M, Eichner A, Wilhelm W, Larsen R: Total intravenous anaesthesia with propofol and remifentanyl in paediatric patients: a comparison with a desflurane-nitrous oxide inhalation anaesthesia. Acta Anaesthesiol Scand. 42(7) (1998) 845-850
- [18] Hachenberg T: Perioperative management with short-acting intravenous anesthetics. Anaesthesiol Reanim 25(6) (2000) 144-150
- [19] Anand KJS, Coskun V, et al.: Long-Term Behavioral Effects of Repetitive Pain in Neonatal Rat Pups. Physiology & Behavior 66 (1999) 627-637
- [20] 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 79 (1998) F40 – F43
- [21] Angeles DM, Wycliffe N, Michelson D, et al.: Use of Opioids in Asphyxiated Term Neonates: Effects on Neuroimaging and Clinical Outcome. Pediatric Research 57 (2005) 873-878
- [22] Rudolph U., Antkowiak B: Molecular and neuronal substrates for general anaesthetics. Nature Rev Neuroscience 5 (2004) 709-720
- [23] Franks NP, Lieb WR: Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. Nature 367 (1994) 607-614
- [24] Franks NP, Dickinson R, de Sousa SL, et al.: How does xenon produce anaesthesia? 396 Nature 1998 324
- [25] Hecker K, Baumert JH, Horn N, Rossaint R: Xenon, a modern anaesthesia gas. Minerva Anesthesiol 70 (2004) 255-260
- [26] Owens DF, Kriegstein AR: Is there more to GABA than synaptic inhibition? Nat Rev Neurosci 3 (2002) 715-727
- [27] Mehta AK, Ticku MK: An update on GABA<sub>A</sub> receptors. Brain Res Brain Res Rev 29 (1999) 196-217

- 
- [28] Obrietan K, van den Pol AN: GABA neurotransmission in the hypothalamus: developmental reversal from Ca<sup>2+</sup> elevating to depressing. *J Neurosci* 15 (1995) 5065-5077
- [29] Sebel LE, Richardson JE, Singh SP, Bell SV, Jenkins A, et al.: Additive effects of sevoflurane and propofol on  $\gamma$ -aminobutyric acid receptor function. *Anesthesiology* 104 (2006) 1176-1183
- [30] Lerman J: Inhalational anesthetics. *Pediatric Anesthesia* 14 (2004) 380-383
- [31] Owens DF, Kriegstein A.R: Developmental neurotransmitters? *Neuron* 36 (2002) 989-991
- [32] Herlenius E, Lagercrantz H: Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology* 190 (2004) S8-S21
- [33] Represa A, Ben-Ari Y: Trophic actions of GABA on neuronal development. *TRENDS in Neurosciences* 29(6) (2005) 278-283
- [34] Rivera C, Voipio J, Pane JA, et al.: The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> cotransporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397 (1999) 251-255
- [35] McCance-Katz EF: The consequences of maternal substance abuse for the child exposed in utero. *Psychosomatics* 32(3) (1991) 268-274
- [36] Kerr JFR, et al.: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26 (1972) 239-257
- [37] Ishmaru M, et al.: Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 408 (1999) 461-476
- [38] Dikranian K, Ishmaru MJ, Tenkova T, et al.: Apoptosis in the in Vivo Mammalian Forebrain. *Neurobiology of Disease* 8 (2001) 359-379
- [39] Krammer PH: CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407 (2000) 789-795
- [40] Nagata S: Apoptosis by death factor. *Cell* 88 (1998) 355-365
- [41] Barinaga M: Forging a path to cell death. *Science* 273 (1996) 735-737
- [42] Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: Enemies within. *Science* 281 (1998) 1312-1316
- [43] Nunez G, Benedict MA, et al.: Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17 (1998) 3237-3245
- [44] Green DR, et al.: Mitochondria and Apoptosis. *Science* 281 (1998) 1309-1313

- 
- [45] Adams JM, Cory S: Apoptosomes: engines for caspase activation. *Curr Opin Cell Biol* 14 (2002) 715-720
- [46] Dobbing J, et al.: The later growth of the brain and its vulnerability. *Scientific Foundations of Pediatrics* (1974) 565-577
- [47] Dobbing J, Sands J: Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 3 (1979) 79-83
- [48] Conzen P, Hobbhahn J: Sevofluran Kompendium. Wissenschaftliche Verlagsabteilung Abbott GmbH Wiesbaden (2001) 7-126
- [49] Goa KL, Noble S, Spencer CM: Sevoflurane in paediatric anaesthesia: a review. *Paediatr Drugs* 1(2) (1999) 127 – 153
- [50] Schwender D, End H, et al.: Sevofluran und Nervensystem. *Anaesthesist (Suppl 1)* 47 (1998) S37-S42
- [51] Scholz J: Sevofluran in der Kinderanästhesie. *Anaesthesist (Suppl 1)* 47 (1998) S43-S48
- [52] Veyckemans F: Excitation phenomena during sevoflurane anaesthesia in children. *Current Opinion in Anaesthesiology* 14 (2001) 339-343
- [53] Jöhr M: Exzitation nach Sevofluran: Ein Problem in der Kinderanästhesie? *Anaesthesist* 48 (1999) 917-918
- [54] Yamashita M: Postanaesthetic excitation and agitation. *Paediatric Anaesthesia* 13 (2003) 641-642
- [55] Keaney A, Diviney D, Harte S, Lyons B: Postoperative behavioural changes following anesthesia with sevoflurane. *Paediatr Anaesth* 14 (2004) 866-870
- [56] Lindahl H: Long-term prognosis of successfully operated oesophageal atresia – with aspects on physical and psychological development. *Z Kinderchir* 39 (1984) 6-10
- [57] Walsh MC, Kliegman RM, Hack M: Severity of necrotizing enterocolitis: influence on outcome at 2 years of age. *Pediatrics* 39 (1989) 808-814
- [58] The Victorian Infant Collaborative Study Group: Surgery and the tiny baby: sensorineural outcome at 5 years of age. *J Paediatr Child Health* 32 (1996) 167-172
- [59] Ikonomidou C, et al.: Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283 (1999) 70-74

- 
- [60] Scallet AC, Schmued LC, Slikker W Jr, et al.: Developmental neurotoxicity of ketamine: morphometric confirmation, exposure parameters, and multiple fluorescent labeling of apoptotic neurons. *Toxicol Sci* 81 (2004) 364-370
- [61] Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, et al.: Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287 (2000) 1056-1060
- [62] Bittigau P, Sifinger M, Genz, et al.: Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 (2002) 15089-15094
- [63] Asimiadou S, Bittigau P, Felderhoff-Mueser, et al.: Protection with estradiol in developmental models of apoptotic neurodegeneration. *Ann Neurol* 58 (2005) 266-276
- [64] Ma D, Williamson P, Januszewski A, et al.: Xenon mitigates isoflurane-induced neuronal apoptosis in the developing rodent brain. *Anesthesiology* 106 (2007) 746-753
- [65] Jevtovic-Todorovic V, et al.: Early exposure to common anesthetic agents causes widespread neurodegeneration in the developing rat brain and persistent learning deficits. *J Neurosci* 23 (2003) 876-882
- [66] Abernethy LJ, Palaniappan M, Cooke RW: Quantitative magnetic resonance imaging of the brain in survivors of very low birth weight. *Arch Dis Child* 87 (2002) 279-283
- [67] Nosarti C, Al-Asady M, Frangou S, et al.: Adolescents who were born very preterm have decreased brain volumes. *Brain* 125 (2002) 1616-1623
- [68] Olney JW, Young C, Woznia DF, et al.: Do pediatric drugs cause developing neurons to commit suicide? *Trends in Pharmacological Sciences* 25(3) (2004) 135-139
- [69] DeOlmos JS, Ingram WR: An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration. *Brain Res* 33(2) (1971) 523-529
- [70] Liu X, Zou H, et al.: DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA-fragmentation during apoptosis. *Cell* 89(2) (1997) 175-184
- [71] Hengartner MO: The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407 (2000) 770-776
- [72] Gavrieli Y, Sherman Y, et al.: Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119(3) (1992) 493-501

- 
- [73] Dikranian K, et al.: Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis* 8(3) (2001) 359-379
- [74] 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* 21(5) (1995) 1465-1468
- [75] Charriaout-Marlangue C, et al.: A cautionary note on the use of TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport* 7 (1995) 61-64
- [76] Gundersen HJ, Bendtsen TF, et al.: Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96(5) (1988) 379-394
- [77] Cruz-Orive LM, et al.: Recent stereological methods for cell biology: a brief survey. *Am J Physiol* 258 (1990) L148-L156
- [78] Swanson LW: *Structure of the Rat Brain*. Elsevier (2003)
- [79] Sherwood NM, Timiras PS: *A stereotaxic atlas of the developing rat brain*. University of California Press (1970)
- [80] Young C, Jevtovic-Todorovic V, Qin YQ, et al.: Potential of ketamine and midazolam, individually or in combination, to induce apoptotic neurodegeneration in the infant mouse brain. *Br J Pharmacol* 146 (2005) 189-197
- [81] Scallet AC, Divine R, Wang C et al.: Ketamine-induced neurotoxicity in prenatal rhesus monkeys: distribution of neuronal damage. *Soc Neurosci Abst* (2005) 251.15
- [82] Fredriksson A, Ponten E, Gordh T and Eriksson P: Neonatal exposure to a combination of N-methyl-D-aspartate and gamma-aminobutyric acid type A receptor anesthetic agents potentiates apoptotic neurodegeneration and persistent behavioral deficits. *Anesthesiology* 107 (2007) 427-436
- [83] Bercker S, Bert B, Bittigau P, et al.: Neurodegeneration in newborn rats following Propofol and Sevoflurane anesthesia. *Neurotox Res.* 16(2) (2009) 140-147
- [84] Uemura E, Bowman RE: Effects of halothane on cerebral synaptic density. *Exp Neurol* 69 (1980) 135-142
- [85] Uemura E, Levin ED, Bowman RE: Effects of halothane on synaptogenesis and learning behavior in rats. *Exp Neurol* 89 (1985) 520-529
- [86] Levin ED, Uemura E, Bowman RE: Neurobehavioral toxicology of halothane in rats. *Neurotoxicol Teratol* 13 (1991) 461-470
-

- 
- [87] Wise-Faberowski L, Zhang H, et al.: Isoflurane-Induced Neuronal Degeneration: An Evaluation in Organotypic Hippocampal Slice Cultures. *Anesth Analg* 101 (2005) 651–657
- [88] Berns M, Zacharias R et al.: Effects of sevoflurane on primary neuronal cultures of embryonic rats. *Eur J Anaesthesiol* 26(7) (2009) 597-602
- [89] Miura Y, Amagasa S: Perioperative cerebral ischemia and the possibility of neuroprotection by inhalational anesthetics. *Masui* 52(2) (2003) 116-27
- [90] Canas PT, Velly LJ, Labrande CN, Guillet BA et al.: Sevoflurane protects rat mixed cerebrocortical neuronal-glia cell cultures against transient oxygen-glucose deprivation: involvement of glutamate uptake and reactive oxygen species. *Anesthesiology* 105(5) (2006) 990-998
- [91] Kitano H, Kirsch JR, Hurn PD, Murphy SJ: Inhalational anesthetics as neuroprotectants or chemical preconditioning agents in ischemic brain. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 27 (2007) 1108–1128
- [92] Pape M, Engelhard K, Eberspächer E et al.: The Long-Term Effect of Sevoflurane on Neuronal Cell Damage and Expression of Apoptotic Factors After Cerebral Ischemia and Reperfusion in Rats. *Anesth Analg* 103 (2006) 173-179
- [93] Kehl F, Payne RS, Roewer N, Schurr A: Sevoflurane induced preconditioning of rat brain in vitro and the role of KATP channels. *Brain Res* 1021 (2004) 76–81
- [94] Kehl F, Smul T, Lange M, Redel A, Roewer N: Organprotektion durch volatile Anästhetika. *Anästh Intensivmed, DIOMed Verlags GmbH* 46 (2005) 491-507
- [95] Matei G, Pavlik R, McCadden T et al.: Sevoflurane Improves Electrophysiological Recovery of Rat Hippocampal Slice CA1 Pyramidal Neurons After Hypoxia. *Journal of Neurosurgical Anesthesiology* 14(4) (2002) 293-298
- [96] Burek MJ, Oppenheim RW: Programmed Cell Death in the developing nervous system. *Brain Pathology* 6 (1996) 427-446
- [97] Strasser A, O'Connor L, Dixit VM: Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69 (2000) 217-245
- [98] Gelbard HA, Boustany RM, Schor NF: Apoptosis in development and disease of the nervous system: II. Apoptosis in childhood neurologic disease. *Pediatr Neurol* 16(2) (1997) 93-97
- [99] Boustany RM, Hannun Y: Apoptosis in Neurobiology: Concepts and Methods. CRC Press (1999) 3-4

- 
- [100] Barinaga M: Is Apoptosis Key in Alzheimer's Disease? *Science* 281 (1998) 1303-1304
- [101] Urban BW, Friederich P: Anesthetic mechanisms in-vitro and in general anesthesia. *Toxicology Letters* 100-101 (1998) 9-16
- [102] Campagna JA, Miller KW, Forman SA: Mechanisms of Actions of Inhaled Anesthetics. *New England Journal of Medicine* 348 (2003) 2110-2124
- [103] Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Elsevier GmbH München (2005) 263-282
- [104] Gascon E, Klauser P, et al.: Potentially toxic effects of anaesthetics on the developing central nervous system. *European Journal of Anaesthesiology* (2007) 1-12
- [105] Duarte R, McNeill A, Drummond G, Tiplady B: Comparison of the sedative, cognitive, and analgesic effects of nitrous oxide, sevoflurane, and ethanol. *British Journal of Anaesthesia* 100 (2008) 203-210
- [106] Hentschke H, Schwarz C, Antkowiak B: Neocortex is the major target of sedative concentrations of volatile anaesthetics: strong depression of firing rates and increase of GABA<sub>A</sub> receptor-mediated inhibition. *European Journal of Neuroscience* 21 (2005) 93-102
- [107] Jurd R, Arra M, Lambert S, et al.: General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABA<sub>A</sub> receptor  $\beta_3$  subunit. *FASEB J.* 17 (2003) 250-252
- [108] Reynolds DS, Rosahl TW, et al.: Sedation and anesthesia mediated by distinct GABA<sub>A</sub> receptor isoforms. *J. Neuroscience* 23 (2003) 8608-8617
- [109] Krasowski MD, Harrison NL: General anaesthetic actions on ligand-gated ion channels.
- [110] Nguyen L, Rigo JM, et al.: Neurotransmitters as early signals for central nervous system development. *Cell Tissue Res.* 305 (2001) 187-202
- [111] Grasshoff C, Rudolph U, Antkowiak B: Molecular and systemic mechanisms of general anaesthesia: the 'multi-site and multiple mechanisms' concept. *Current Opinon in Anaesthesiology* 18 (2005) 386-391
- [112] Zhang Y, Laster MJ, et al.: Glycine Receptors Mediate Part of the Immobility Produced by Inhaled Anesthetics. *Anesth Analg* 96 (2003) 97-103

- 
- [113] Hollinger MA: Introduction to Pharmacology. Taylor & Francis Group, London and New York (2003) 184-215
- [114] Orser BA, Canning KJ, MacDonald JF: Mechanisms of general anesthesia. *Current Opinion in Anaesthesiology* 15 (2002) 427-433
- [115] Sarner JB, Levine M, Davis P et al.: Clinical characteristics of Sevoflurane in Children: A Comparison with Halothane. *Anesthesiology* 82(1) (1995) 38-46
- [116] Shulman M, Braverman B, et al.: Sevoflurane triggers malignant hyperthermia in swine. *Anesthesiology* 54 (1981) 259-260
- [117] Constant I, Seeman R, Murat I: Sevoflurane and epileptiform EEG changes. *Paediatr Anaesth* 15 (2005) 266-274
- [118] Adachi M, Ikemoto Y, Kubo K, Takuma C: Seizure-like movements during induction of anaesthesia with sevoflurane. *Br J Anaesth* 68 (1992) 214-215
- [119] Johnson, S.A., Young C, Olney JW: Isoflurane-induced neuroapoptosis in the developing brain of nonhypoglycemic mice. *J Neurosurg Anesthesiol.* 20(1) (2008) 21-28
- [120] Oppenheim RW: Cell death during development of the nervous system. *Ann Rev Neurosci* 14 (1991) 453-501
- [121] Ikonomidou C, Bittigau P, Ishmaru MJ et al.: Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283 (1999) 70-74
- [122] Ikonomidou C, Bittigau P, et al.: Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrom. *Science* 287 (2000) 1056-1060
- [123] Bittigau P, Pohl D, et al.: Modeling Pediatric Head Trauma: Mechanisms of Degeneration and Potential Strategies for Neuroprotection. *Restor Neurol Neurosci* 13 (1998) 11-23
- [124] Bittigau P, Sifringer M, et al.: Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol* 45(6) (1999) 724-735
- [125] Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Farber NB, Bittigau P, Ikonomidou C: Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol* 12 (2002) 488-498
- [126] Anand K, Soriano SG: Anesthetic Agents and the Immature Brain: Are These Toxic or Therapeutic? *Anesthesiology* 101 (2004) 527-530
- [127] Clancy B, Darlington RB, Finlay BL: Translating developmental time across mammalian species. *Neuroscience* 105 (2001) 7-17

- 
- [128] Hayashi H, Dikkes P, Soriano SG: Repeated administration of ketamine may lead to neuronal degeneration in the developing rat brain. *Pediatric Anesthesia* 12(9) (2002) 770–774
- [129] Olney JW: Perinatal drug/alcohol exposure and neuronal suicide – Public health implications. American Association for the Advancement of Science (AAAS) Annual Meeting, Seattle (2004) 1073
- [130] Latham MC, Cobos F: The effects of malnutrition on intellectual development and learning. *Am J Public Health* 61(7), (1971), 1307-1324
- [131] Culley WJ, Lineberger RO: Effect of undernutrition on the size and composition of the rat brain. *J Nutr* 96(3) (1968) 375-381
- [132] Hsueh AM, Simonson M, Chow BF, Hanson HM: The importance of the period of dietary restriction of the dam on behavior and growth in the rat. *J Nutr* 104(1) (1974) 37-46
- [133] Dobbing J: Undernutrition and the developing brain: the relevance of animal models to the human problems. *Am J Dis Child* 120 (1970) 411-415
- [134] Nagata N, Saji M, et al.: Repetitive intermittent hypoxia-ischemia and brain damage in neonatal rats. *Brain Dev.* 22 (2000) 315 –320
- [135] Ruda MA, Ling QD, Hohmann AG, et al.: Altered nociceptive neuronal circuits after neonatal peripheral inflammation. *Science* 289 (2000) 628-631
- [136] Bhutta AT, Rovnaghi CR, Simpson PM, et al.: Interactions of inflammatory pain and morphine treatment in infant rats: Long-term behavioural effects. *Physiol Behav* 73 (2001) 51-58
- [137] Soriano SG, Anand KJ: Anesthetics and brain toxicity. *Curr Opin Anaesthesiol* 18 (2005) 293-297
- [138] Slikker W Jr, Zou X, Hotchkiss CE, et al.: Ketamine-Induced Neuronal Cell Death in the Perinatal Rhesus Monkey. *Toxicological Sciences* 98(1) (2007) 145-158
- [139] Rizzi S, Carter LB, Ori C, Jevtovic-Todorovic V: Clinical Anesthesia Causes Permanent Damage to the Fetal Guinea Pig. *Brain.Pathol.* [Epub ahead of print] (2008)
- [140] Jevtovic-Todorovic V, Benshoff N, Olney JW: Ketamine potentiates cerebrocortical damage induced by the common anaesthetic agent nitrous oxide in adult rats. *Tr J Paharmacol* 130 (2000) 1692-1698

---

[141] AHRQ: HCUPnet: Healthcare Cost and Utilisation Project. Rockville. MD. Agency for Healthcare Research and Quality. (2001)

---

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abb. 1: Effekte von Anästhetika an liganden-gesteuerten Ionenkanälen.....	5
Abb. 2: Schematische Darstellung des GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Komplexes .....	6
Abb. 3: Die Periode des rapiden Hirnwachstums „Brain growth spurt period“ beim Menschen.....	11
Abb. 4: Strukturformel Sevofluran.....	11
Abb. 5: Rattenhirn nach Lagerung in Paraformaldehydlösung .....	18
Abb. 6: Grobschnitt der Rattenhirne in zwei koronare Teile.....	19
Abb. 7: Gehirne nach Grobschnitt in Agar eingebettet .....	19
Abb. 8: Hirnschnitte nach De Olmos Kupfer-Silberfärbung auf gedeckelten Objektträgern .....	21
Abb. 9: Schematische Darstellung der ausgezählten Hirnregionen zur Errechnung der numerischen Dichte untergegangener Zellen pro mm <sup>3</sup> .....	23
Abb. 10: Mikroskopisches Bild nach De Olmos Kupfer-Silberfärbung .....	24
Abb. 11: Anzahl degenerierter Nervenzellen pro mm <sup>3</sup> im Hirn sechs Tage alter Ratten (2h).....	27
Abb. 12: Anzahl degenerierter Nervenzellen pro mm <sup>3</sup> im Hirn sechs Tage alter Ratten (4h).....	28
Abb. 13: Anzahl degenerierter Nervenzellen pro mm <sup>3</sup> im Hirn sechs Tage alter Ratten (6h).....	29
Abb. 14: Neurodegenerative Effekte nicht behandelter Kontrolltiere in Abhängigkeit von der Dauer der Trennung vom Muttertier .....	32
Abb. 15: Neurodegenerative Effekte von Sevofluran in Abhängigkeit von der Dauer der Exposition. ....	32
Abb. 16: Neurodegenerative Effekte nicht behandelter Kontrolltiere in Abhängigkeit vom Alter der Ratten. ....	35

---

Abb. 17: Neurodegenerative Effekte von Sevofluran in Abhängigkeit vom Alter der Ratten. ....	35
Abb. 18: Gewichtszunahme sechs Tage alter Kontrolltiere 24 Stunden nach Versuchsbeginn in Abhängigkeit von der Dauer der Trennung vom Muttertier.....	37
Abb. 19: Gewichtszunahme sechs Tage alter, mit Sevofluran behandelter Ratten 24 Stunden nach Versuchsbeginn in Abhängigkeit von der Dauer der Narkose. ....	37

---

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tab. 1: Übersicht des Versuchsaufbaus in Abhängigkeit vom Alter der Tiere .....	17
Tab. 2: Übersicht des Versuchsaufbaus in Abhängigkeit von der Dauer der Narkose .....	17
Tab. 3: Zeitabhängige Wirkung von Sevofluran im sich entwickelnden Gehirn der Ratte auf die einzeln untersuchten Hirnregionen .....	29
Tab. 4: Altersabhängige Wirkung von Sevofluran im sich entwickelnden Gehirn der Ratte .....	34

---

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
AMPA	$\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
Apaf	<i>Apoptotic protease activating factor</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bidest.	bidestilliert
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DNA	<i>Desoxyribonucleineacid</i>
Fas	<i>Fibroblast associated</i>
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
h	Stunde(n)
5-HT <sub>3</sub>	5-Hydroxytryptamin-3
i.m.	intramuskulär
i.v.	intravenös
KCC	Kalium-Chlorid-Cotransporter
kg	Kilogramm
lat.	lateinische Sprache
l	Liter
M	Molar

---

M.	Morbus
MAC	Minimale Alveoläre Konzentration
Mdm-2	<i>murine double minute 2</i>
MK 801	Dizocilpin
ml	Milliliter
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	pondus Hydrogenii
Tab.	Tabelle
tDT	terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
TIVA	Totale Intravenöse Anästhesie
TM	Transmembrandomäne
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	<i>terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling</i>
usw.	und so weiter
v.a.	vor allem
Vol. %	Volumenprozent
z.B.	zum Beispiel

**LEBENS LAUF**

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

## DANKSAGUNG

Für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, die fortwährende Unterstützung und Betreuung und das kritische Lesen des Manuskriptes möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn PD Dr. med. Thoralf Kerner bedanken.

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

Herrn Dr. Sven Bercker möchte ich besonders für das kritische Lesen meiner Arbeit danken.

Ich möchte Frau Prof. Dr. Hrissanthi Ikonomidou danken, die mir die Möglichkeit gab, meine Promotion in ihrem Labor durchzuführen.

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe *Ikonomidou* für viele methodische Ratschläge und Hilfestellungen bei der Durchführung der Experimente. Für die Einführung und Hilfe bei der Einarbeitung in die Methodik der experimentellen Arbeit danke ich besonders Frau Dr. Vanya Stefovskaja und Frau Jessica Vöckler.

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

Meiner Freundin Mirjam Weise danke ich herzlich für Ihre Unterstützung. Dazu gehörten insbesondere fachliche Diskussionen, Kritik und Ratschläge, moralische Aufbauarbeit und Toleranz.

Zu guter Letzt, im Herzen aber an erster Stelle, möchte ich meiner Familie und meinem Lebensgefährten Dirk danken. Ohne deren ausdauernde und vielseitige Unterstützung wäre die Umsetzung meiner Promotion kaum möglich gewesen. Ich widme diese Arbeit meinem Vater, der mir die nötige Motivation und Kraft mit auf den Weg gegeben hat.

Ich danke meinem Lebensgefährten Dirk insbesondere für ein jederzeit ausgeglichenes Lebensklima, für die fortwährend geleistete Aufbauarbeit, das geduldige Zuhören und die Unterstützung, ohne zu drängen. Ein besonderer Dank gilt ihm für die Hilfe bei der Formatierung dieser Arbeit.

**ERKLÄRUNG**

Ich, Christiane Dreykluff, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Evaluation neurodegenerativer Effekte von Sevofluran im unreifen 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.

Braunschweig, den 04.08.2009

Christiane Dreykluff