

Aus der Klinik für Anästhesiologie
des Universitätsklinikums Düsseldorf
(Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. J. Tarnow, FRCA)

Neue klinische und experimentelle Aspekte der Regionalanästhesie

Habilitationsschrift
zur Erlangung der Venia Legendi an der Hohen Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von
Markus Florian Stevens

2007

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Einleitung und Fragestellungen	3
II. Material und Methoden	13
1 Klinische Untersuchungen zur Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien	
1a Anstieg der Hauttemperatur als Indikator für eine beginnende periphere Nervenblockade	13
1b Ausdehnung der Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien	14
1c Sympathikolyse durch Spinalanästhesie bei Säuglingen	15
2 Sedierung durch Spinalanästhesie bei Säuglingen	16
3 Verbesserung der Regionalanästhesie durch elektrische Stimulation	
3a Beeinflussung der Anschlagzeit und Ausdehnung von Nervenblockaden durch elektrische Reizung der Haut und transkutane elektrische Nervenstimulation	17
3b Verbesserung des funktionellen Ergebnisses von Schulteroperationen durch stimulierbare Katheter zur postoperativen Analgesie	19
4 <i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Untersuchungen zur Toxizität von Lokalanästhetika	
4a Elektrische Inaktivierung peripherer Nerven <i>in vivo</i>	21
4b <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch Lidocain	22
4c Vergleich der Toxizität verschiedener Lokalanästhetika <i>in vitro</i>	25
4d <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Reduktion der Toxizität von Lidocain	26
4e Toxizität von Lidocain an Nervenzellen <i>in vitro</i>	27
III. Ergebnisse	29
1 Klinische Untersuchungen zur Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien	
1a Anstieg der Hauttemperatur als Indikator für eine beginnende periphere Nervenblockade	29
1b Ausdehnung der Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien	37
1c Sympathikolyse durch Spinalanästhesie bei Säuglingen	39
2 Sedierung durch Spinalanästhesie bei Säuglingen	41
3 Verbesserung der Regionalanästhesie durch elektrische Stimulation	
3a Beeinflussung der Anschlagzeit und Ausdehnung von Nervenblockaden durch elektrische Reizung der Haut und transkutane elektrische Nervenstimulation	44

3b Verbesserung des funktionellen Ergebnisses von Schulteroperationen durch stimulierbare Katheter zur postoperativen Analgesie	49
4 <i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Untersuchungen zur Toxizität von Lokalanästhetika	
4a Elektrische Inaktivierung peripherer Nerven <i>in vivo</i>	52
4b <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch Lidocain	56
4c Vergleich der Toxizität verschiedener Lokalanästhetika <i>in vitro</i>	62
4d <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Reduktion der Toxizität von Lidocain	64
4e Toxizität von Lidocain an Nervenzellen <i>in vitro</i>	65
IV. Diskussion	68
1 Klinische Untersuchungen zur Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien	
1a Anstieg der Hauttemperatur als Indikator für eine beginnende periphere Nervenblockade	69
1b Ausdehnung der Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien	71
1c Sympathikolyse durch Spinalanästhesie bei Säuglingen	73
2 Sedierung durch Spinalanästhesie bei Säuglingen	74
3 Verbesserung der Regionalanästhesie durch elektrische Stimulation	
3a Beeinflussung der Anschlagzeit und Ausdehnung von Nervenblockaden durch elektrische Reizung der Haut und transkutane elektrische Nervenstimulation	75
3b Verbesserung des funktionellen Ergebnisses von Schulteroperationen durch stimulierbare Katheter zur postoperativen Analgesie	77
4 <i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> Untersuchungen zur Toxizität von Lokalanästhetika	
4a Elektrische Inaktivierung peripherer Nerven <i>in vivo</i>	79
4b <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch Lidocain	81
4c Vergleich der Toxizität verschiedener Lokalanästhetika <i>in vitro</i>	83
4d <i>In vitro</i> Untersuchungen zur Reduktion der Toxizität von Lidocain	84
4e Toxizität von Lidocain an Nervenzellen <i>in vitro</i>	85
V. Zusammenfassung	87
VI. Literatur	91
VII. Danksagung	99
VIII. Lebenslauf	100

I. Einleitung und Fragestellungen

Nach der ersten Oberflächenanästhesie durch Carl Koller im Jahre 1884 und der ersten Spinalanästhesie durch August Bier 14 Jahre später ist die Regionalanästhesie heute zu einem Standardverfahren geworden¹. Dazu haben wesentlich die Einführung von Kathetern und atraumatischen Kanülen sowie die Entwicklung neuer Lokalanästhetika mit besserer Steuerbarkeit und größerer therapeutischer Breite beigetragen. Kein anderes Verfahren vermag derzeit postoperative Schmerzen so wirksam zu reduzieren und das Operationsergebnis günstig zu beeinflussen^{2,3}. Darüber hinaus sinkt unter perioperativer Regionalanästhesie die Häufigkeit von Venenthrombosen, Lungenembolien, Myokardinfarkten, Pneumonien und Atemdepressionen. Regionale Anästhesieverfahren können sich deshalb günstig auf die perioperative Morbidität und Letalität auswirken^{4,5}.

Diesen unbestreitbaren Vorteilen stehen jedoch immer noch eine Reihe von Nachteilen gegenüber:

- Ein langsamer Wirkungseintritt insbesondere bei Nervenblockaden, der klinisch unerwünscht ist
- Eine erhebliche Versagerquote sowohl bei „Single shot-“ als auch bei kontinuierlichen Verfahren
- Nebenwirkungen - insbesondere bei neuroaxialen Blockaden durch Sympathikolyse und Deafferenzierung
- Passagere und/oder permanente Nervenschädigung durch Toxizität von Lokalanästhetika

Die vorliegende Habilitationsarbeit setzt sich mit den genannten Nachteilen auseinander und sucht nach Ursachen bzw. Lösungsansätzen durch klinische Untersuchungen an Probanden und Patienten sowie durch experimentelle Studien an Tieren und verschiedenen Zellkulturen.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen in der vorliegenden Arbeit untersucht:

- *Ist der Anstieg der Hauttemperatur ein guter Prädiktor für eine suffiziente periphere Nervenblockade?*
- *Lässt sich der Wirkungseintritt von peripheren Nervenblockaden beschleunigen und die Versagerquote nach „Single shot-“ bzw. kontinuierlichen Nervenblockaden reduzieren?*
- *Ist bei Säuglingen nach Spinalanästhesien eine Sympathikolyse und Sedierung ähnlich wie bei Erwachsenen zu beobachten?*
- *Was sind die Mechanismen der Lokalanästhetika-induzierten Zyto- bzw. Neurotoxizität?*

Bis zu 20% der peripheren Nervenblockaden (Single shot) und bis zu 75% der Katheterverfahren zur Schmerztherapie sind mit einer unzureichenden Analgesie verbunden⁶⁻⁹. Darüber hinaus tritt die Wirkung selbst der modernen Lokalanästhetika erst 20 - 30 Minuten nach der Injektion ein. Wünschenswert wären also frühzeitige und sichere Prädiktoren einer ausreichenden Blockade. Die Fasern des sympathischen Nervensystems sind am empfindlichsten gegenüber der Wirkung von Lokalanästhetika^{10,11}. Die frühzeitige Blockade sympathischer Fasern führt zur Vasodilatation der oberflächlichen Arteriolen, wodurch die Haut rasch erwärmt wird (mikroneurographische Studien^{12,13}). Somit könnte der Anstieg der Hauttemperatur ein früher und sicherer Prädiktor für eine erfolgreiche Blockade sein. Nach Spinalanästhesien tritt eine Erwärmung der Haut nach 60 - 90 Sekunden auf (häufig vor Beginn der sensorischen und motorischen Blockade), bei Periduralanästhesien nach 10 bis 15 Minuten¹⁴⁻¹⁷. Deshalb wurde bei Patienten mit Eingriffen an der unteren Extremität untersucht, ob der Anstieg der Hauttemperatur ein sicherer und früher Indikator für eine beginnende Blockade der beiden Hauptnerven des Beines, nämlich der Nn. ischiadici und femorales, ist. Als Vergleichsgruppe dienten hierbei Patienten mit Periduralanästhesie.

Da die Hauttemperatur an unterschiedlichen Arealen des Beines trotz offensichtlicher Denervierung stark variierte, ergab sich die Frage, ob die Erwärmung von der Struktur der

Nerven oder aber vom Gefäßreichtum der Haut bzw. Subcutis abhängt. Nach bisheriger Lehrmeinung hängt die Erwärmung der Haut in erster Linie von der Ausdehnung der Blockade ab¹⁸. Nach dieser Theorie müsste die Hauttemperatur nach Spinal- oder Periduralanästhesie in einem größeren Hautareal ansteigen als nach einer peripheren Nervenblockade. Zur Beantwortung dieser Frage wurde in einer prospektiven Studie an Patienten die Temperatur der Beine mittels einer Thermographie-Kamera untersucht, und zwar nach Spinal-, Periduralanästhesie sowie kombinierter Femoralis- und Ischiadicus-Blockade. Die Thermographie erlaubt eine kontinuierliche, zwei-dimensionale Messung der zeitlichen und räumlichen Veränderungen der Hauttemperatur.

Spinalanästhesien werden bei Frühgeborenen und ehemaligen Frühgeborenen durchgeführt, weil in dieser Altersgruppe aufgrund der Unreife des Zentralnervensystems nach Allgemeinanästhesien postoperativ häufig lebensbedrohliche Apnoen beobachtet wurden¹⁹. Hingegen wurden nach alleiniger Spinalanästhesie bei diesen Patienten keine Apnoen beobachtet^{20,21}. Daher führten wir Spinalanästhesien bei Kindern vor der 60. postkonzeptionellen Woche durch. Verfahren der Regionalanästhesien werden in dieser Altersgruppe trotz der oben genannten Vorteile aufgrund technischer Schwierigkeiten kaum angewendet²².

Im Gegensatz zu Erwachsenen, bei denen eine ausgeprägte Sympathikolyse nach Spinalanästhesien zu bedrohlichen Blutdruckabfällen bis hin zum Kreislaufstillstand führen kann^{23,24}, wurden bei Säuglingen keine wesentlichen Änderungen von Blutdruck und Herzfrequenz beobachtet^{25,26}. Dieses Phänomen wurde mit der Unreife des sympathischen Nervensystems bzw. einer geringeren Kapazität des venösen Systems erklärt²⁶. In neueren Untersuchungen wurde allerdings ein Abfall des arteriellen Mitteldrucks nachgewiesen^{27,28}. Deshalb wurde an Säuglingen untersucht, ob und inwieweit eine Spinalanästhesie zu einer Sympathikolyse der unteren Extremitäten führt. Als primärer Indikator für die Sympathikolyse diente wiederum die Hauttemperatur, als sekundäres Zeichen wurden Herzfrequenz und Blutdruck vor und nach Anlage der Spinalanästhesie gemessen. Somit wurde die Fragestellung untersucht, ob

das Ausmaß der Sympathikolyse nach Spinalanästhesie bei Säuglingen und Erwachsenen ähnlich ist.

Spinalanästhesien führen bei Erwachsenen per se zu einer leicht- bis mittelgradigen Sedierung^{29,30}. Dieser Effekt wird mit einer Deafferenzierung durch die Spinalanästhesie erklärt, wodurch das aufsteigende retikuläre Aktivierungssystem weniger stimuliert wird, was zu einer Sedierung führt. Ob und inwieweit dieser Effekt auch bei Säuglingen mit einem deutlich unreiferen Zentralnervensystem nachweisbar ist, ist unbekannt. Eine solche Nebenwirkung einer Spinalanästhesie müsste bei einer zusätzlichen Sedierung berücksichtigt werden, zumal Säuglinge und Frühgeborene postoperativ besonders durch Apnoen gefährdet sind²⁰. Hierzu wurde der Wachheitsgrad von Säuglingen in einer prospektiven, einfach blinden Studie wurde mit Hilfe des bispektralen Index und der spektralen Eckfrequenz bestimmt. Diese beiden abgeleiteten Größen des Elektroenzephalogramms werden am häufigsten zur Messung von Anästhesie- bzw. Sedierungstiefe verwendet³¹. Ergänzend wurde der Verlauf von Blutdruck und Herzfrequenz registriert, um eine Sedierung durch eine arterielle Hypotonie bzw. Bradykardie auszuschließen. Darüber hinaus wurde beobachtet, ob es bei den Patienten perioperativ zu Apnoen kam. Spinalanästhesien bei Säuglingen sind technisch anspruchsvoller als bei Erwachsenen, die primäre Erfolgsquote liegt bei Ungeübten bei nur 80%²⁵. Daher könnte sich die durch Spinalanästhesie ausgelöste Sedierung auch als Prädiktor für eine erfolgreiche Blockade nützlich erweisen.

In den bisher genannten Projekten sollten mögliche Prädiktoren untersucht werden, die eine Aussage über Erfolg bzw. Misserfolg einer Blockade zulassen. In den vorgestellten Untersuchungen sind Methoden evaluiert worden, die den Wirkungseintritt einer Blockade verkürzen sowie ihre Ausdehnung und Erfolgsquote verbessern könnten. Im Mittelpunkt stand zunächst eine pharmakologische Eigenschaft vieler Lokalanästhetika: Sie unterbrechen die Nervenlei-

tung durch Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle³². Am isolierten Nerven nimmt die leitungsblockierende Wirkung von Lokalanästhetika mit steigender Stimulations- und damit Aktionspotentialfrequenz zu^{33,34}. Obwohl dieses Prinzip der frequenzabhängigen Leitungsblockade lange bekannt ist, wurde diese Eigenschaft der Lokalanästhetika bisher nicht genutzt, um die Effektivität von Leitungsblockaden zu erhöhen. Es galt deshalb zunächst an Probanden zu klären, ob Beginn und Ausdehnung einer Blockade des N. ulnaris durch eine transkutane elektrische Stimulation in Abhängigkeit von der Stimulationsfrequenz verbessert werden kann.

In einer nachfolgenden prospektiven, doppelblinden, randomisierten Studie sollte deshalb dieses Prinzip auch bei Patienten zur Blockade des Plexus brachialis genutzt werden. Als Stimulation wurde nach Injektion des Lokalanästhetikums eine transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS) verwendet, wie sie in der Schmerztherapie weit verbreitet ist³⁵. Die Zielgröße war der Wirkungseintritt der sensiblen, motorischen und sympathischen Blockade.

In einer weiteren Studie wurde die Hypothese untersucht, ob die relativ hohe sekundäre Versagerrate beim Einsatz von Nervenkathetern zur postoperativen Schmerztherapie durch Verwendung spezieller Stimulationskatheter gesenkt werden kann. In der Regel wird zwar der geeignete Nerv mit Hilfe eines Nervenstimulators lokalisiert und nach Applikation eines größeren Volumens des Lokalanästhetikums durch die Kanüle auch blockiert. Da anschließend der Katheter zur postoperativen Schmerztherapie jedoch nur „blind“ vorgeschoben werden kann, liegt dessen Spitze nicht immer nahe genug am Nerven bzw. Plexus, um dort für die postoperative Analgesie ausreichende Mengen von Lokalanästhetikum zu applizieren. Die Häufigkeit solcher sekundärer Versager wird auf bis zu 75% geschätzt und ist bei der interskalenären Blockade des Plexus brachialis am häufigsten^{9,36}. Seit wenigen Jahren stehen stimulierbare Katheter zur Verfügung³⁷, d.h. nicht nur über die isolierte Kanüle, sondern auch über den Katheter können die Nerven gezielt stimuliert werden. Solche Katheter wurden

bisher nicht an der oberen Extremität eingesetzt, insbesondere nicht bei dem als problematisch geltenden interskalenären Zugang zum Plexus brachialis. Daher wurde in einer prospektiven, randomisierten und doppelblinden Studie untersucht, ob mit Hilfe stimulierbarer Katheter bei Patienten, die sich einer Schulteroperation unterzogen, der Wirkungseintritt der Blockade verkürzt, die postoperativen Schmerzen reduziert und die Schulterfunktion langfristig verbessert werden kann.

Lokalanästhetika sind in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkdauer gewebetoxisch. So sind nach Spinalanästhesien mit Lidocain Cauda equina-Syndrome beschrieben. Bei 30% der Patienten treten transiente neurologische Syndrome auf ^{38,39}, die mit der toxischen Wirkung der Lokalanästhetika in Zusammenhang gebracht werden. Im Tierexperiment konnte für eine Reihe von Lokalanästhetika eine Schädigung verschiedener Gewebe nachgewiesen werden, insbesondere an Nerven und Muskeln⁴⁰⁻⁴⁴. Eine Erklärung für diese Gewebeschädigung könnte langfristige Unterdrückung von Aktionspotentialen sein, die über eine funktionelle Inaktivitätsatrophie des Nerven (ähnlich wie beim Muskel) zu dessen sekundärer Schädigung führt. Daher wurde untersucht, ob die elektrische Inaktivierung eines afferenten Nerven durch Ausschaltung des physiologischen Stimulus zu einer Atrophie seiner Axone und Myelinscheiden führt. Dazu wurde dem afferenten Carotissinusnerv von Kaninchen der adäquate Stimulus zur Generierung seiner typischen pulssynchronen Aktivität, nämlich die Dehnung der Gefäßwand des Carotissinus, genommen. Nach 5 bis 28 Tagen wurde die pulssynchrone Dehnung der Gefäßwand wieder ermöglicht und die Nerven erneut elektrophysiologisch untersucht. Die Auswirkungen dieser langfristigen Inaktivierung auf die Struktur der Nerven wurden mittels Morphometrie untersucht.

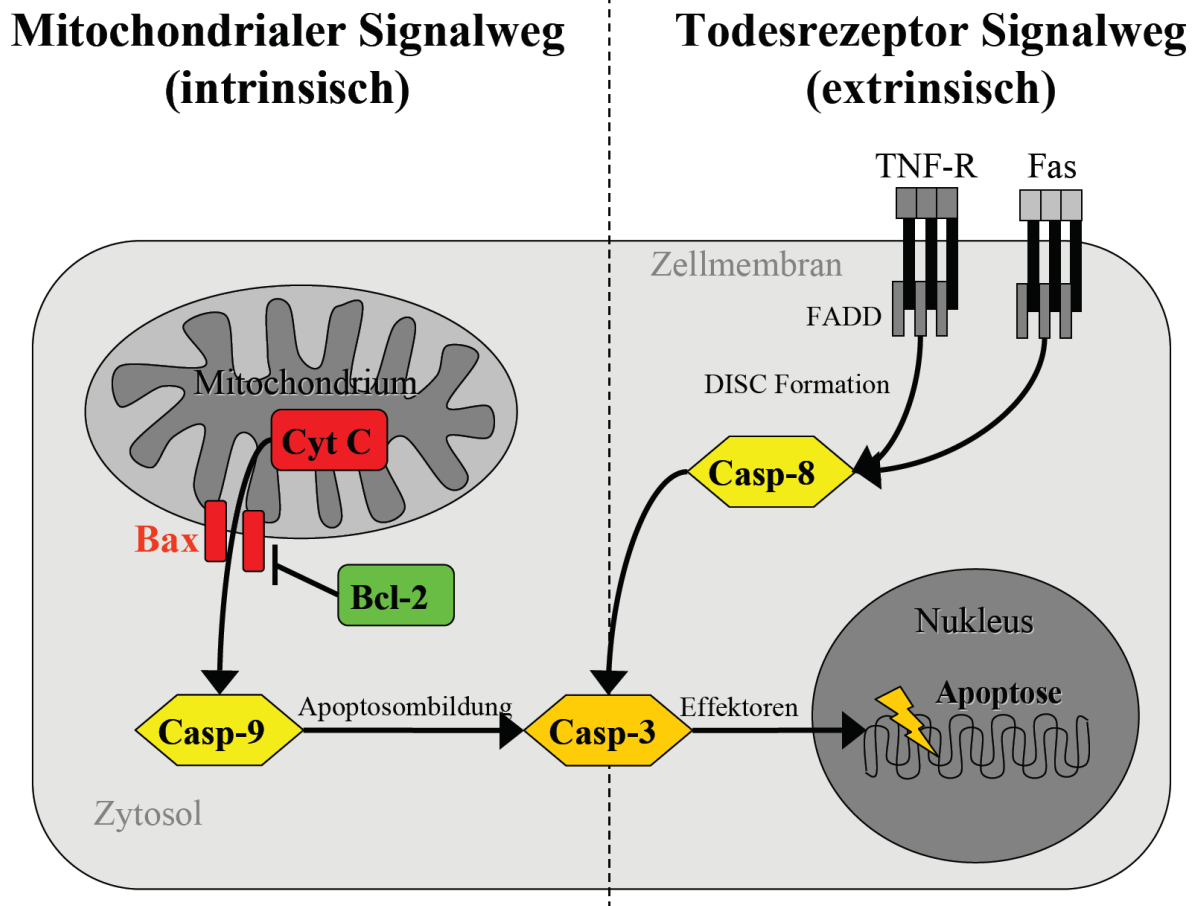
Die Blockade des spannungsabhängigen Natriumkanals ist für die Toxizität von Lokalanästhetika nicht verantwortlich, da der ausschließliche Natriumkanal-Blocker Tetrodotoxin nicht zu einer lokalen Gewebeschädigung führt^{42,45}. Auf der Suche nach Mechanismen der

Gewebsschädigung durch Lokalanästhetika konnte erst vor kurzem nachgewiesen werden, dass Lidocain Apoptose induzieren kann, eine Form des programmierten Zelltods. Allerdings lagen die Konzentrationen erheblich höher als sie bei Regionalanästhesie am Wirkort vorkommen^{46,47}. Ob Lidocain auch in klinisch wirksamen Konzentrationen Apoptose induziert und über welchen Signalweg dies geschieht, ist unbekannt, und wurde an genetisch veränderten Zellkulturen untersucht.

Dazu wurde zunächst untersucht, ob Lidocain konzentrationsabhängig Apoptose induzieren kann. Dabei wurden insbesondere Konzentrationen verwendet, wie sie nach Spinalanästhesien intrathekal auftreten⁴⁸. Zunächst wurden verschiedene Phasen der Apoptose mittels spezifischer Marker identifiziert. Die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials und Externalisierung von Phosphatidylserinen kennzeichnen frühe Phasen der Apoptose. Die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und die Aktivierung der Effektor-Caspase-3 kennzeichneten späte Phasen der Apoptose. Weiterhin wurde das generelle Auftreten von Zelltod analysiert.

Bei den Mechanismen, die zur Apoptose führen können, wird zwischen einem intrinsischen (oder mitochondrialen) und einem extrinsischen (oder Todesrezeptor-vermittelten) Signalweg unterschieden (s. Abb. 1). Generell wird Apoptose durch verschiedene spezifische Enzyme, die sogenannten Caspasen vermittelt⁴⁹. Caspasen werden wiederum in Initiator- und Effektor-Caspasen unterteilt. Caspase-8 ist die Initiator-Caspase des extrinsischen Signalweges⁵⁰, während die Caspase-9 die zentrale Initiator-Caspase des intrinsischen Signalweges darstellt⁵¹. Beide Initiator-Caspasen führen zu einer Aktivierung der Effektor-Caspasen, die zu der für die Apoptose typischen spezifischen Fragmentierung der DNA führen⁵². Es wurde daher an Jurkat-T-Lymphomzellen des Menschen untersucht, über welchen der beiden Signalwege Apoptose durch Lidocain induziert wird. Jurkat-Zellen wurden verwendet, da an ihnen die Mechanismen der Apoptose sehr gut untersucht sind und die Bedeutung einzelner Proteine mit Hilfe genetisch veränderter Stämme dieser Zelllinie zu ermitteln ist.

Abbildung 1: Signalwege der Apoptose (vereinfachtes Schema)



Der mitochondriale (intrinsische) Signalweg der Apoptose ist auf der linken Seite dargestellt. Durch eine Dysfunktion des Mitochondriums kommt es zum Einbau von Bax-Kanälen (Bax = Bcl-2 assoziiertes X Protein) in die Mitochondrienmembran. Dies wird durch das antiapoptotische Protein Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) inhibiert. Durch diese Kanäle in der äußeren Mitochondrienmembran kommt es zur Freisetzung Apoptose-induzierende Mediatoren (z.B. Cytochrom C = Cyt C). Diese Substanzen aktivieren die Initiator-Caspase-9 (Casp-9), welche zusammen mit anderen Faktoren das Apoptosom bildet. Das Apoptosom wiederum aktiviert die Effektor-Caspase-3 (Casp-3).

Der Todesrezeptor vermittelte (extrinsische) Signalweg beginnt mit der Aktivierung von Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor Familie (TNF-R) in der Zellmembran (z.B. Fas = Fibroblast assoziiertes Protein). Intrazellulär wird das FADD-Protein (Fas-assoziiated protein with death domain) zur Bildung des Death-Inducing Signaling Complex (DISC) benötigt, der die Initiator-Caspase-8 (Casp-8) des extrinsischen Signalwegs aktiviert. Die aktivierte Caspase-8 führt wiederum zur Aktivierung der Caspase-3 und mündet mit dem intrinsischen Weg in einer gemeinsamen Signalkascade, die letztendlich zur Apoptose-typischen Fragmentierung der DNA an spezifischen Stellen führt.

Dabei wurde die Apoptose-Induktion durch Lidocain an genetisch veränderten Stämmen immer mit den parental Wildtyp-Zellen verglichen. So wurde der intrinsische Signalweg an Zellen, die das antiapoptotischen Protein Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) überexprimieren, sowie an Caspase-9-defizienten Zellen untersucht. Die Bedeutung des extrinsischen Signalweges wurde an FADD- (Fas-associated protein with death domain) und Caspase-8-defizienten Zelllinien untersucht.

Nach Aufklärung des Mechanismus der Apoptose-Induktion durch Lidocain wurde die apoptotische und toxische Potenz anderer Lokalanästhetika an Jurkat-Zellen untersucht. Speziell galt es zu klären, ob die Toxizität mit bestimmten physikochemischen Eigenschaften wie z. B. der Lipophilie korreliert, was für die Kardiotoxizität von Lokalanästhetika nachgewiesen ist^{53,54}. Dabei sollte auch die Frage geklärt werden, ob die Toxizität stereospezifisch ist, d.h. ob es einen stereoselektiven Rezeptor gibt, der die Apoptose-Induktion durch Lidocain vermittelt.

Nach dem Vergleich der Toxizitäten verschiedener Lokalanästhetika wurde untersucht, ob sich die Apoptose-Induktion durch Lidocain beeinflussen lässt. Es ist bekannt, dass eine durch Radikale induzierte Apoptose durch Antioxidantien unterdrückt wird⁵⁵. Daher wurde der Einfluss verschiedener Radikalfänger auf die Toxizität von Lidocain an Jurkat-Zellen evaluiert. Somit würde sich eine prophylaktische und vielleicht therapeutische Möglichkeit ergeben, die Toxizität von Lokalanästhetika zu verringern.

Prophylaktische und therapeutische Interventionen setzen jedoch voraus, dass die an Jurkat-Zellen gefundenen Ergebnisse auch auf Nervenzellen des Menschen übertragbar sind. Zur Beantwortung dieser Frage wurden Neuroblastomzellen (SH-SY5Y) verwendet und eine Reihe der oben genannten Untersuchungen durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Bildung von mitochondrialen Bax-Kanälen mit Hilfe spezifischer Antikörper mittels Fluoreszenz-Mikroskop untersucht. Die Aggregation von Bax-Proteinen zu mitochondrialen Kanälen ist ein wesentlicher Mechanismus für die Apoptose-Induktion, insbesondere für den mito-

chondrialen Signalweg der Apoptose. Bax-Kanäle werden in die äußere Mitochondrienmembran inkorporiert und setzen Apoptose-induzierende Mediatoren wie z.B. Cytochrom C aus dem intermembranösen Raum ins Zytosol frei (s. Abb. 1). Cytochrom C wiederum bildet zusammen mit Caspase-9 die sogenannten Apoptosomen, welche die Effektor-Caspasen aktivieren. Die Aktivierung der bedeutendsten Effektor-Caspase (Caspase-3) wurde mittels Durchflusszytometrie nach Exposition mit Lidocain gemessen.

Die vorliegende Habilitationsschrift beschreibt somit im klinischen Teil Prädiktoren einer beginnenden Leitungsblockade, Techniken zur Erhöhung der Effektivität von Regionalanästhesien und Auswirkungen der Sympathikolyse bzw. Deafferenzierung durch neuroaxiale Blockaden.

Im experimentellen Teil wird die funktionelle Inaktivität des Nerven als möglicher Mechanismus der Neurotoxizität von Lokalanästhetika evaluiert, der Signalweg der Apoptose-Induktion durch Lidocain genauer untersucht und die Toxizitäten verschiedener Lokalanästhetika miteinander verglichen, sowohl an Jurkat- als auch an Neuroblastom-Zellen.

II. Material und Methoden

Die klinischen Untersuchungen wurden prospektiv an insgesamt 205 Patienten und 7 Probanden durchgeführt. Bei allen Studien lag eine Genehmigung der Ethikkommission und eine schriftliche Einwilligung der Patienten bzw. deren Erziehungsberechtigten oder der Probanden vor. Als Ausschlusskriterien galten immer ein ASA-Status > III (American Society of Anesthesiologists; Klassifikation des körperlichen Zustands), Kontraindikationen der Regionalanästhesien, Blutgerinnungsstörungen, Schwangerschaft oder Stillzeit, klinisch manifeste Zeichen einer peripheren Neuropathie und höhergradige periphere arterielle Verschlusskrankheiten.

1 Klinische Untersuchungen zur Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien

1a) Anstieg der Hauttemperatur als Indikator für eine beginnende periphere Nervenblockade

Diese Untersuchung wurde an 43 Patienten durchgeführt. Davon war bei 33 Patienten ein orthopädischer Eingriff am Knie oder Fuß in kombinierter Blockade des N. ischiadicus und des N. femoralis geplant. Bei den übrigen 10 Patienten wurde eine Hüftoperation in Epiduralanästhesie durchgeführt. Die Nn. femoralis und ischiadicus wurden wie folgt blockiert^{56,57}: Mit Hilfe eines Nervenstimulators (Stimuplex® HNS 11; B.Braun, Melsungen) und einer isolierten Kanüle (Contiplex® C 110mm, B. Braun) konnten die Nerven identifiziert werden. Sobald bei einem Reizstrom von $\leq 0,4$ mA und einer Reizbreite von 100 μ s Kontraktionen der entsprechenden Kennmuskeln auftraten wurden an den N. femoralis 30 ml Prilocain 1% und 10 ml Ropivacain 0,75% appliziert bzw. 20 ml Prilocain 1% und 10 ml Ropivacain 0,75% an den N. ischiadicus.

Bei Patienten, die eine Epiduralanästhesie erhielten, wurde der Epiduralraum mit Hilfe der Widerstandsverlustmethode aufgesucht und 10 ml Naropin 0,75% injiziert.

Mit dem Injektionsende wurden bei allen Patienten fünf-minütlich die Motorik und Sensibilität der Beine untersucht sowie die Haut- und Körperkerntemperatur (Trommelfell) mit einem Infrarot-Thermometer (C600-M Biotherm, Linear Laboratories, Fremont, Canada) gemessen. Die Hauttemperatur wurde mit dem Ausgangswert mittels Student's t-Test verglichen und für multiples Testen korrigiert (Bonferroni). Ein Anstieg der Hauttemperatur um mindestens 1°C wurde als Test-Kriterium definiert. Die Sensitivität dieses Test-Kriteriums wurde definiert als die Anzahl der Patienten mit Anstieg der Hauttemperatur und Empfindungsverlust dividiert durch die Anzahl aller Patienten mit Empfindungsverlust. Die Spezifität ergab sich aus der Anzahl der Patienten ohne Anstieg der Hauttemperatur oder Empfindungsverlust dividiert durch die Anzahl der Patienten ohne Empfindungsverlust.

1b) Ausdehnung der Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien

Es wurden 24 Patienten, bei denen eine Regionalanästhesie indiziert war, eingeschlossen. Die Nervenblockaden sowie die Periduralanästhesie wurden wie oben beschrieben durchgeführt. Zur Spinalanästhesie wurden 3 ml hyperbares Bupivacain 0,5% intrathekal injiziert. Anschließend wurde die Hauttemperatur der Beine mit einer Thermographie-Kamera (ThermaCAM® THV 550; Flir Systems, Portland, Oregon, USA) erfasst und mit Hilfe einer Bildanalyse-Software (ThermaCAM® Reporter 2000 Basic; Flir Systems) analysiert. Um die Messung der Hauttemperatur nicht durch sensible oder motorische Testungen zu beeinflussen, wurde erst nach Abschluß der Thermographie getestet.

In vier Hautarealen wurde die Hauttemperatur gemessen:

- Proximaler lateraler Unterschenkel, innerviert vom N. ischiadicus bzw. dem Segment L5
- Distaler lateraler Unterschenkel, innerviert vom N. ischiadicus bzw. dem Segment S1
- Distaler medialer Unterschenkel, innerviert vom N. femoralis bzw. dem Segment L4
- Großzehe, innerviert vom N. ischiadicus bzw. dem Segment L5

Anhand dieser Hautareale konnte der Anstieg der Hauttemperatur in Gebieten mit unterschiedlicher Innervation, aber gleicher Entfernung vom Stamm verglichen werden (medialer und lateraler Unterschenkel). Darüber hinaus wurde die Hauttemperatur in Arealen verglichen, die vom gleichen Nerven bzw. Segment innerviert werden, aber unterschiedlich weit vom Stamm entfernt sind. Dieser Vergleich wurde für jedes der untersuchten Regionalanästhesie-Verfahren durchgeführt.

Weiterhin wurde die Zeit bis zum Anstieg der Hauttemperatur um 1°C bzw. bis zum Erreichen der maximalen Hauttemperatur zwischen den drei Gruppen (Nervenblockade, Periduralanästhesie, Spinalanästhesie) verglichen.

Die statistischen Vergleiche wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit Bonferroni post-hoc Test bzw. mittels 2-seitigem Student's t-Test durchgeführt.

1c) Sympathikolyse durch Spinalanästhesie bei Säuglingen

Die Untersuchung wurde an 15 Säuglingen durchgeführt, die sich einer Herniotomie unterzogen. Die Patienten waren seit 2 (klare Flüssigkeiten) bzw. 4 Stunden (Milch) nüchtern und erhielten perioperativ keine Sedativa oder Anticholinergika. Die Hauttemperatur wurde im Hautsegment Th4 und an der plantaren Fußsohle mittels eines Infrarot-Thermometers mit hoher Sensitivität (C600-M Biotherm, Linear Laboratories, Fermont, Kanada) gemessen. Die Raumtemperatur wurde konstant bei $27 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Spinalanästhesie wurde zwischen dem vierten und fünften Lendenwirbel mit Bupivacain 0,5% hyperbar 1 mg/kg und Adrenalin-Zusatz (10 µg/kg) durchgeführt. Die Patienten erhielten perioperativ 6 ml/kg/h einer kristalloiden Lösung intravenös. Kontinuierlich wurde die Herzfrequenz (Elektrokardiogramm) und die pulsoximetrische Sättigung überwacht. Der arterielle Blutdruck wurde oszillometrisch (Dinamap; Critikon Inc., Tampa, Florida, USA) am Oberschenkel gemessen. Postoperativ wurden die Patienten im Aufwachraum überwacht, bis sie die Beine wieder

bewegen konnten. Die pulsoximetrische Sauerstoff-Sättigung wurde 24 Stunden postoperativ überwacht.

Zwischen den Werten vor und nach (10 bzw. 20 Minuten) nach Anlage der Spinalanästhesie wurden mittels Student's t-Test für verbundene Stichproben verglichen, korrigiert für multiple Testungen (Bonferroni).

2 Sedierung durch Spinalanästhesie bei Säuglingen

Die Untersuchung wurde an 20 Säuglingen mit einem Gestationsalter bei der Geburt von 24 – 40 Wochen (Median: 34,5) und einem postnatalen Alter von 5 – 24 Wochen (Median: 10) durchgeführt. Die Säuglinge wogen zwischen 2,2 und 5,2 kg (Median: 3,5 kg). Bei 17 Patienten wurde eine Herniotomie, bei 2 eine Ileostoma-Rückverlagerung und bei einem eine Teratom-Entfernung vorgenommen. Die Spinalanästhesie und die perioperative Überwachung wurde wie oben beschrieben durchgeführt. Darüber hinaus wurde der bispektrale Index (BIS) und die spektrale Eckfrequenz (SEF₉₅) kontinuierlich überwacht. Die SEF₉₅ ist die Frequenz unterhalb der sich 95% der Gesamtaktivität des Elektroencephalogramms in der Spektralanalyse befindet⁵⁸. Inzwischen ist der dimensionslose BIS, der aus dem EEG mittels eines Algorithmus errechnet wird, die am häufigsten verwendete Messgröße zur Überwachung der Anästhesietiefe und zur Verhinderung intraoperativer Wachheit⁵⁹. Der BIS konnte mittlerweile auch zur Bestimmung der Sedierungstiefe in der Pädiatrie validiert werden⁶⁰.

Die statistische Analyse wurde mittels ANOVA für Messwiederholungen durchgeführt bzw. mit dem Student's t-Test für multiple Testungen korrigiert (Bonferroni).

3 Untersuchungen zur Verbesserung der Regionalanästhesie durch elektrische Stimulation

3a) Beeinflussung der Anschlagzeit und Ausdehnung von Nervenblockaden durch elektrische

Reizung der Haut und transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS)

In einer ersten Untersuchung wurden an sieben gesunden männlichen Probanden im Alter von 28 bis 38 Jahren drei Leitungsblockaden des N. ulnaris am Handgelenk im Abstand von mindestens einer Woche durchgeführt. Den Probanden war das Ziel der Studie nicht bekannt. Jeder Proband unterzog sich den drei Blockaden am linken Handgelenk, während eine elektrische Reizung mit einer von drei Frequenzen (0,2; 10; 50 Hz) mittels einer Elektrode an der vom N. ulnaris innervierten Haut appliziert wurde. Die Stimulationselektrode (2 x 10 cm) wurde an der Palmarseite des Kleinfingers und der Handinnenfläche aufgeklebt. Eine Neutralelektrode (75 cm²) wurde am linken Unterarm platziert. Während die Stromstärke erhöht wurde, bewerteten die Probanden die Empfindung auf einer visuellen Analogskala zwischen der Empfindungsschwelle = 0% und der Schmerzschwelle = 100%. Nach der Schwellenbestimmung für die jeweilige Frequenz durch jeden Probanden wurde die Stromstärke, die zu einer Empfindung von 80% führte, für 45 Minuten appliziert. Diese Stimulation wurde vor der Leitungsblockade durchgeführt, um mögliche Empfindungsänderungen über die Zeit auszuschließen. Zwischen der Kontrollstimulation und der Ulnarisblockade wurde mindestens 20 Minuten gewartet, um einen möglichen Einfluss der Kontrollstimulation auf die Empfindungsintensität während der Leitungsblockade auszuschließen. Der Nerv wurde am linken Handgelenk mit Hilfe eines Nervenstimulators (Stimuplex S, Braun, Melsungen, Reizstärke $\leq 0,4$ mA, Impulsbreite 100µs) aufgesucht und 2 ml Bupivacain 0,5% injiziert. Am Ende der Injektion wurde mit der elektrischen Stimulation wie oben beschrieben begonnen und diese bis zum vollständigen Empfindungsverlust durchgeführt, höchstens aber 45 Minuten. Die Hauttemperatur wurde als Indikator für eine einsetzende Sympathikolyse mittels eines Infrarot-Thermometers bestimmt. Nach jedem Experiment wurde die Ausdeh-

nung der Blockade mittels Spitz-Stumpf-Diskrimination bestimmt. Als Maß für die Geschwindigkeit der sensiblen Blockade galten die Zeiten bis zum halben bzw. kompletten Empfindungsverlust. Die Zeit bis zum maximalen Temperaturanstieg am Handballen galt als Maß für das Einsetzen der Sympathikolyse. Unterschiede der Geschwindigkeit des Wirkungseintritts bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen wurden mit dem Friedman-Test analysiert. Bei Signifikanz wurden die Zeiten unter hochfrequenter Stimulation (10, 50 Hz) mit denen nach niedrigfrequenter Stimulation (0,2 Hz) verglichen (Wilcoxon-Rangsummentest).

In einer sich anschließenden Untersuchung erhielten 60 Patienten, die sich einer Operation der Hand in Plexusanästhesie unterzogen, entweder keine Reizung (Kontrollgruppe) oder eine elektrische Reizung des Unterarmes im Hautareal des N. ulnaris oder des N. medianus. Vor Beginn der Leitungsblockade wurden bei allen Patienten Elektroden zur transkutanen Nervenstimulation (TENS) angelegt. Bei den Patienten der Kontrollgruppe wurde kein Reizstrom appliziert. Die Patienten, bei denen eine Reizung des N. medianus bzw. N. ulnaris durchgeführt wurde, erhielten eine nicht schmerzhaft TENS (Stimulationsfrequenz 100 Hz, Impulsbreite 60 μ s, Stromstärke 6 – 10 mA) für 15 Minuten nach Injektion des Lokalanästhetikums. Der axilläre Plexus brachialis wurde mit einem Nervenstimulator in oben beschriebener Weise aufgesucht und bei einer adäquaten Muskelkontraktion ($\leq 0,5$ mA) wurde ein Katheter 3 cm über die Kanülenspitze hinaus in die Gefäßnervenscheide vorgeschoben. Über diesen Katheter wurden 40 ml Mepivacain 1,5% injiziert. Im Anschluss wurde 5-minütlich mit der sensiblen (Berührung, Schmerzempfindung) und der motorischen (MRC-Skala = Graduierung der motorischen Kraft der Medical Research Council) Evaluation sowie der Messung von Sympathikolyse-Effekten (Hauttemperatur) begonnen. Patienten mit unvollständiger Blockade nach 45 Minuten wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen.

Da der größte Effekt der Stimulation nach 15 Minute zu erwarten war, wurden das Ausmaß der Blockade zwischen der Kontroll- und den Stimulationsgruppen zu diesem Zeitpunkt statistisch mittels χ^2 -Test bzw. faktorieller ANOVA analysiert.

3b) Verbesserung des funktionellen Ergebnisses von Schulteroperationen durch stimulierbare Katheter zur postoperativen Analgesie

Diese prospektive, randomisierte Doppelblindstudie wurde an 43 Patienten durchgeführt, die sich einer Schulteroperation unterzogen. Neben den oben genannten primären Ausschlusskriterien wurden hier auch drei Patienten ausgeschlossen, bei denen keine adäquate Muskelreizung bei einer Reizstärke von $\leq 0,5$ mA binnen 20 Minuten erreicht werden konnte. Die Patienten erhielten präoperativ 7,5 mg Midazolam *per os*. Die Anlage der interskalenären Katheter wurde nach Lokalanästhesie der Haut und Analgosedierung mit 1 – 2 mg Alfentanil durchgeführt. Dabei wurde der Zugangsweg nach Meier gewählt^{61,62}. In beiden Gruppen wurde der gleiche 19-gauge Katheter mit einer 17-gauge Tuohy-Nadel (StimuCath®, Arrow, Erding) verwendet. Mit Hilfe eines Nervenstimulators (Impulsbreite: 100 μ s; Stromstärke $\leq 0,5$ mA) wurde der Plexus brachialis in der Skalenuslücke aufgesucht, bis Kontraktionen des M. biceps brachii oder des M. deltoideus sichtbar waren. Dann wurden die Patienten in eine von zwei Gruppen randomisiert. In der Kontrollgruppe wurde anschließend der Katheter „blind“ 1 – 2 cm vorgeschoben. Hingegen wurde in der Stimulationsgruppe der Katheter unter kontinuierlicher Stimulation über den Katheter vorgeschoben. Falls dabei die typische Muskelkontraktionen verschwanden, wurde der Katheter neu platziert, bis adäquate Kontraktionen ausgelöst werden konnten.

In beiden Gruppen wurde der Katheter mit einer Naht fixiert und über den Katheter 40 ml Prilocain 1% und 10 ml Ropivacain 0,75% injiziert. Nach Messung des Wirkungseintritts erhielten alle Patienten eine standardisierte Allgemeinanästhesie ohne andere Analgetika. Weder der Patient noch der Anästhesist, der die Narkose und die postoperative Schmerzthe-

rapie durchführte sowie die prä- und postoperativen Schulterfunktionsscores ermittelte, wusste zu welcher Gruppe der Patient randomisiert wurde. Die postoperative Schmerztherapie wurde als Patienten-kontrollierte Analgesie (PCA) mit Hilfe einer programmierbaren Schmerzpumpe (PEGA® plus, Pegasus, Kiel) durchgeführt. Dabei erhielten die Patienten 8 ml/h Ropivacain 0,2% als Dauerinfusion über den interskalenären Katheter und konnten bei Schmerzen 2 ml alle 20 Minuten anfordern. Falls ein Patient dennoch Schmerzen hatte, erhielt er ein systemisches Analgetikum (Metamizol). Die postoperativen Schmerzen wurden 12, 24 und 48 Stunden postoperativ anhand einer numerischen Skala erfasst. Alle Patienten erhielten postoperativ eine standardisierte Physiotherapie. Die Untersuchung der Schulterfunktion wurden präoperativ und sechs Wochen postoperativ durchgeführt. Die *objektive* Schulterfunktion wurde anhand des Constant-Murley Scores untersucht, der hauptsächlich den schmerzfreien Bewegungsumfang und die Kraft der Schulter evaluiert^{63,64}. Zur Beurteilung der *subjektiven* Schulterfunktion wurde die validierte deutsche Version des DASH Scores (Disability of Shoulder, Arm and Hand) verwendet⁶⁵. Dieser Score erfasst die subjektive Behinderung der gesamten oberen Extremität. Als primäre Zielgröße galt die Verbesserung der Schulterfunktion postoperativ.

Eine Power-Analyse zeigte, dass 40 Patienten benötigt wurden, um eine klinisch relevante Verbesserung der Schulterfunktionsscores von 30% bei nicht-parametrischer Testung festzustellen ($\alpha = 0,05$; 2-seitige Testung, Power = 0,9). Der Vergleich zwischen den Gruppen hinsichtlich Beginn der Blockade, postoperativer Schmerzwerte, Anzahl der über die Schmerzpumpe angeforderten Boli, Anzahl der zusätzlich verabreichten Analgetika und die Änderung der Schulterfunktionsscores wurde mittels Mann-Whitney U-Test durchgeführt. Der Vergleich der primären Variablen (Schulterfunktionsscores) wurde für multiples Testen korrigiert (Bonferroni).

4 Experimentelle Untersuchungen zur Toxizität von Lokalanästhetika

4a) Elektrische Inaktivierung peripherer Nerven in vivo

Die Untersuchung wurde mit Genehmigung des Regierungspräsidenten an 10 Kaninchen (New Zealand White; 2,7 – 3,5 kg) durchgeführt. Alle Experimente wurden in Allgemeinanästhesie mit Pentobarbital (30 mg/kg i.v., Nachinjektionen falls erforderlich) vorgenommen. Die Tiere wurden endotracheal intubiert und mit reinem Sauerstoff kontrolliert beatmet, um möglichst keine Aktivierung der Chemoafferenzen des N. sinus caroticus zu induzieren. Unter sterilen Kautelen wurden die Carotissinus präpariert, die Nn. sinus carotici freigelegt und elektrophysiologisch (Summenaktionspotential) untersucht. Der Carotissinusnerv zeigt typische pulssynchrone Entladungen von Barorezeptoren, die in der Adventitia des Carotissinus lokalisiert sind. Auf der einen Seite wurde der Carotissinus druckentlastet und in Silikonharz eingegossen, so dass die Wand nicht mehr während der Systole gedehnt und somit die Baroafferenzen nicht mehr erregt wurden. Auf der anderen (Kontroll-) Seite wurde der Carotissinus ohne Druckentlastung ebenfalls in Silikonharz eingegossen, so dass die typischen pulssynchronen Entladungen des Nerven erhalten blieben. Anschließend erfolgte ein schichtweiser Wundverschluss und die Tiere wurden wieder in die Tierversuchsanlage gebracht. Jeweils zwei Tiere wurden nach 5, 7, 14 und 28 Tagen erneut in Allgemeinanästhesie untersucht. Dabei wurde zunächst die elektrische Aktivität der Nerven auf beiden Seiten unter Belassung der Silikonmanschette registriert. Anschließend wurden die Manschetten entfernt und die Aktivität der Nerven erneut abgeleitet. Nach Abschluss der elektrophysiologischen Untersuchung wurden die Tiere getötet (Acetat/Barbiturat-Puffer) und mit einer Paraform-/Glutaraldehyd Lösung fixiert. Die Nerven wurden entnommen und in Osmiumtetroxid nachfixiert und in Spurr-Medium eingebettet. Es wurden von jedem Nerv Ultradünnschnitte in drei verschiedenen Höhen erstellt. Diese Schnitte wurden von einem verblindeten Untersucher im Hinblick auf die Axonfläche der myelinisierten und nicht myelinisierten

Axone sowie der Myelinscheidendicke morphometrisch untersucht und mit der Gegenseite verglichen.

4b) In vitro Untersuchungen zur Induktion von Apoptose durch Lidocain

Bcl-2 überexprimierende Jurkat-T-Lymphomzellen, Caspase-9-defiziente Jurkat-Zellen und deren parentaler Wildtyp-Stamm (J16), Caspase-8-defiziente Jurkat-Zellen, FADD-defiziente und deren parentale Zelllinie (A3) wurden für die Versuche verwendet⁶⁶⁻⁶⁹. Die Zellen wurden in RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 Medium mit L-Glutamin, inaktivierten fetalen Kälberserum (10%), Penicillin (50 µg/ml) und Streptomycin (50 µg/ml) kultiviert. Alle Versuche wurden in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid bei 37°C durchgeführt.

Vor jedem Experiment wurden die Zellen über Nacht in dem kompletten Medium kultiviert und auf eine Zellzahl von 4×10^5 /ml eingestellt, um ein logarithmisches Wachstum zu ermöglichen. Anschließend wurde die Zelldichte dem jeweiligen Protokoll angepasst und die Zellen entweder nur mit Medium (Negativ-Kontrolle), mit dem Chemotherapeutikum Staurosporin (Positiv-Kontrolle) oder mit Lidocain in aufsteigenden Konzentrationen über 12 bzw. 24 Stunden inkubiert.

Bestimmung der Überlebensrate:

Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden die Zellen resuspendiert und 10 µl der jeweiligen Probe mit 90 µl einer Trypanblau-Lösung gefärbt. Anschließend wurde das Verhältnis von gefärbten (= toten) zu ungefärbten (= vitalen) Zellen lichtmikroskopisch in vier Feldern einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Mitochondriales Membranpotential:

Die Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials ist ein frühes, aber nicht spezifisches Zeichen der Apoptose. Das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) wurde mit Hilfe des spezifischen Farbstoffes JC-1 bestimmt⁷⁰. Durch Abnahme des $\Delta\Psi_m$ nimmt die Fluoreszenz im grünen Farbspektrum zu, während die Fluoreszenz im orange-roten Farbspektrum abnimmt. Die Zellen wurden gewaschen und mit JC-1 gefärbt (20 Minuten, lichtgeschützt). Nach Waschen der Zellen wurde der Anteil der grünen und roten Fluoreszenz durchflusszytometrisch (FACS = Fluorescence Activated Cell Sorting; FACScalibur, Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) bestimmt und mit demjenigen unstimulierter Zellen verglichen⁷¹.

Western-blot:

Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden bestimmt und gleiche Proteinmengen in jeder Gel-Tasche aufgetragen (20 μ g). Ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) diente zur Elektrophorese. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Polyvinylidenedifluorid-Membran transferriert. Die Elektrophorese erfolgte mit einem Stromfluß von 1 mA/cm² über eine Stunde. Die anschließende Blockierung wurde mit Phosphatpuffer (PBS), Tween-20 (0,05%) und bovines Serumalbumin (4%) durchgeführt. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper für 12 Stunden inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Blockpuffer wurde ein an Meerrettich-Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Membranen wiederholt gewaschen, und die Proteinbanden mit einem Chemolumineszenz-System (Amersham Buchler, Braunschweig, Germany) detektiert.

Cytochrom C-Bestimmung:

Die Cytochrom C-Freisetzung aus dem intermembranösen Raum des Mitochondriums ist einer der wesentlichen Schritte der Apoptose-Induktion. Daher haben wir die Zellen lysiert, in eine mitochondriale und zytosolische Fraktion aufgeteilt und die Zunahme von Cytochrom C in der zytosolischen Fraktion nach Inkubation mit Lidocain mittels Western-blot Analyse untersucht.

Nach Inkubation mit verschiedenen Lidocain-Konzentrationen wurden jeweils 3×10^7 Zellen in einem Puffer permeabilisiert (Digitonin 50 µg/ml, Sucrose 250 mM, HEPES 20 mM, MgCl₂ 1,5 mM, KCl 10 mM, EDTA 1 mM, DTT 1 mM, Phenylmethylsulfonylfluorid 1 mM und jeweils 2 µg/ml der Protease-Inhibitoren Aprotinin, Pepstatin und Leupeptin) und resuspendiert. Anschließend wurden die Zellkerne 5 Minuten bei 1000g abzentrifugiert. Im Überstand wurden die Mitochondrien mit einem hypertonen Puffer (s.o.) lysiert und 15 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert. Die Ausfällung wurde lysiert und die Protein-Konzentrationen im Überstand und in der Ausfällung wurden adjustiert und anschließend im Western-Blot analysiert.

Bestimmung der Caspase-3-Aktivierung:

Die Zellkulturen wurden nach den entsprechenden Inkubationszeiten resuspendiert, zentrifugiert, gewaschen und in einem hypertonen Puffer bei 0°C lysiert. Die Lysate wurden zentrifugiert und die Proteinkonzentrationen im Überstand auf 1 µg/ml eingestellt. Zu 50 µl von diesem Überstand wurden 150 µl Substratpuffer sowie 50 µl des Caspase-3-Substrats DEVD-AMC bei 37°C hinzugefügt. Die Fluoreszenz des Spaltprodukts AMC wurde 10-minütlich bei 440 nm gemessen (Lambda Fluro 320 Plus, Biotek, Bad Friedrichshall), bis nach 4 Stunden ein Plateau erreicht wurde. Die Zunahme der Fluoreszenz während des linearen Anstiegs war somit ein Maß für die Caspase-3-Aktivierung.

Detektion der frühen Apoptose und Überlebensrate (Annexin V/Propidiumiodid Assay):

Annexin V ist ein Farbstoff, der spezifisch an externalisierte Phosphatidylserinreste der Zellmembran bindet. Die Externalisierung von Phosphatidylserinresten, die normalerweise asymmetrisch in der Zellmembran verteilt sind, ist ein spezifischer Marker der frühen Apoptose. Propidiumiodid (PI) färbt Zellen mit intakter Zellmembran nicht an. Die Doppelfärbung mit Annexin V und PI erlaubt die Differenzierung zwischen frühapoptotischen Zellen, d.h. mit noch intakter Zellmembran (Annexin V-positiv/PI-negativ), und solchen mit zerstörter Zellmembran (Annexin V-positiv/PI-positiv)⁷². Dabei kann nicht entschieden werden, ob bei Annexin V-positiv/PI-positive Zellen der Mechanismus des Zelltods Apoptose oder Nekrose ist.

Nach den verschiedenen Inkubationen wurden die Zellen zweimal mit Pufferlösung gewaschen und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml in einen speziellen Annexin-Bindungspuffer gegeben. Anschließend wurden 5 µl Annexin-V und 10 µl PI (20 µg/ml) hinzugegeben. Die durchflusszytometrische Analyse wurde von einem FACScalibur mit Hilfe der CellQuest Analyse-Software (BD Biosciences, Franklin Lake, USA) durchgeführt. Bei jeder Bestimmung wurden 10.000 Zellen analysiert.

Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Statistische Vergleiche zwischen den verschiedenen Zelllinien wurden mit dem Mann-Whitney-U Test durchgeführt.

4c) Vergleich der Toxizität verschiedener Lokalanästhetika in vitro

Mit Hilfe des oben beschriebenen Annexin-V/PI Assays wurden verschiedene Lokalanästhetika auf ihre Toxizität und apoptotische Potenz hin untersucht. Jurkat-Zellen wurden 24 Stunden mit dem jeweiligen Lokalanästhetikum in der jeweiligen Konzentration inkubiert. Für den Vergleich der Toxizitäten wurden folgende Lokalanästhetika jeweils dreimal in mindestens fünf verschiedenen Konzentrationen untersucht: Lidocain, Tetracain, Bupivacain, Mepivacain, Ultracain, Ropivacain, Prilocain, Procain. Für jeden Versuch wurde eine Dosis-

Wirkungs-Beziehung mittels Probit-Analyse erstellt. So konnten diejenigen Dosen errechnet werden, die zu einem Zelltod bei 50% der Zellen führten (LD_{50}). Diese logarithmierten Werte wurden miteinander mittels faktorieller ANOVA mit post-hoc Bonferroni Test verglichen. So konnte eine Reihenfolge der verschiedenen Lokalanästhetika hinsichtlich ihrer Toxizität erstellt werden.

Anschließend wurden die LD_{50} -Werte mit der Lipophilie^{73,74} bzw. den minimalen Blockierungskonzentrationen des jeweiligen Lokalanästhetikums⁷⁵ korreliert.

Aufgrund eines asymmetrischen C-Atoms liegen einige der Lokalanästhetika als Stereoisomere vor. Die verschiedenen Stereoisomere unterscheiden sich z.T. hinsichtlich ihrer leitungsblockierenden Wirkung sowie ihrer Kardio- bzw. Myotoxizität^{44,76-79}. Eine unterschiedliche Gewebetoxizität der Stereoisomere würde auf einen stereospezifischen Wirkort, d.h. auf eine spezifische Bindungsstelle der Lokalanästhetika hinweisen. Daher wurde an unserem Modell die Toxizität verschiedener Stereoisomere untersucht. Verglichen wurde die Toxizität von L-Ropivacain mit der von R-Ropivacain sowie die Toxizität von Levobupivacain mit der des entsprechenden Racemats. Dabei wurden Jurkat-Zellen wiederum mindestens fünf Konzentrationen des jeweiligen Stereoisomers ausgesetzt. Alle Experimente wurden wenigstens dreimal durchgeführt. Es wurde dabei nicht nur zwischen der Gesamtzahl der toten Zellen, sondern auch dem Anteil der früh-apoptotischen Zellen differenziert.

Die statistische Analyse erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test.

4d) In vitro Untersuchungen zur Reduktion der Toxizität von Lidocain

Um den Einfluss von Radikalen auf die Apoptose-Induktion durch Lidocain zu untersuchen, wurden den Zellkulturen Radikalfänger zugesetzt. Zur Differenzierung des Wirkorts der Radikale wurden zwei unterschiedliche Antioxidantien eingesetzt: Zum einem das wasserlösliche N-Acetylcystein (2,5 mM) - zum anderen das lipophile Tempol (10 mM). So wurden Wildtyp-Jurkat-Zellen zunächst eine Stunde mit dem entsprechenden Radikalfänger und

anschließend 24 Stunden mit Lidocain in steigenden Konzentrationen inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen ohne Antioxidantien und als Positivkontrolle die Zugabe des Radikaldonors Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Die Vitalität der Zellen wurde mit dem Annexin V / PI Assay analysiert.

Der statistische Vergleich erfolgte mittels Mann-Whitney-U Test.

4e) Toxizität von Lidocain an Nervenzellen in vitro

Neuroblastomzellen der Zelllinie SH-SY5Y⁸⁰ wurden auf Gewebekulturschalen angezüchtet und über 12 Stunden mit 1:1 F12 Eagle Medium/MEM (minimal essential medium) und fetalem Kälberserum (10%) inkubiert. Alle Versuche wurden in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5% Kohlendioxid bei 37°C durchgeführt. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen Lidocain bis zu 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur weiteren Analyse mechanisch abgelöst und zentrifugiert.

Die Vitalität der Zellen wurde wiederum durchflusszytometrisch bestimmt. Hier wurde mit den Zellen in der gleichen Art verfahren, wie bei beim oben beschriebenen Annexin V/PI Assay. Aus methodologischen Gründen wurden nur die PI-positiven Zellen ausgewertet. Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials erfolgte analog zu der oben beschriebenen Methode.

Caspase-3 Aktivität FACS Assay:

Die abgelösten Zellen wurden mit Paraformaldehyd (4%) fixiert und zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die abzentrifugierten Zellen wurden anschließend in FACS-Blockpuffer (fetales Kälberserum 3%, Saponin 0,05% in PBS) mit einem fluoreszenz-konjugiertem Antikörper (Caspase-3 FITC) aufgenommen und eine Stunde lichtgeschützt inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal gewaschen, anschließend mit FACS-Blockpuffer aufgenommen

und wie oben beschrieben mit dem FACS-Gerät analysiert. Es wurden jeweils 10.000 Zellen analysiert.

Immunfluoreszenz zum Nachweis von Bax-Aktivierung:

Die Zellen wurden zunächst auf Objektträger ausgesät und 12 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Dann wurden die Zellen jeweils für 8 Stunden mit Lidocain und Staurosporin (Positivkontrolle) behandelt. Anschließend wurden die Objektträger für 15 Minuten mit Paraformaldehyd (4%) fixiert und danach zwei Stunden mit Blockpuffer behandelt. Es erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern gegen das mitochondriale Protein TOM 20 (Translocase of outer mitochondriale Membrane 20) und gegen das aktivierte proapoptotische Protein Bax (Bcl-2 assoziiertes X Protein) über 12 Stunden bei 4°C. Nach Waschen mit Blockpuffer wurden die entsprechenden fluoreszenz-konjugierten Sekundärantikörper (Anti-Mouse 592 nm zur Bindung an den TOM 20-Antikörper, Anti-Rabbit 488 nm zur Bindung an den N-terminalen Bax-Antikörper) hinzugegeben. Vor der mikroskopischen Auswertung wurden die Objektträger dreimal gewaschen. Bei 40-facher Vergrößerung wurden die Präparate im Fluoreszenz-Mikroskop bei verschiedenen Wellenlängen und mittels Phasenkontrast untersucht.

III. Ergebnisse

1 Klinische Untersuchungen zur Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien

1a) Anstieg der Hauttemperatur als Indikator für eine beginnende periphere Nervenblockade

Bei allen 33 Patienten konnte eine suffiziente Blockade des N. femoralis erzielt werden, die Blockade des N. ischiadicus war bei 3 Patienten unvollständig. Daten der Patienten mit unvollständiger Blockade wurden nicht bei der Analyse der Hauttemperatur bzw. der Blockade von Motorik und Sensibilität berücksichtigt, wohl aber bei der Berechnung der Sensitivität und Spezifität der Hauttemperaturmessung. Die demographischen Daten der Patienten, die eine kombinierte Nervenblockade erhielten, unterschieden sich nicht signifikant von denen mit Periduralanästhesie und sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Demographische Daten

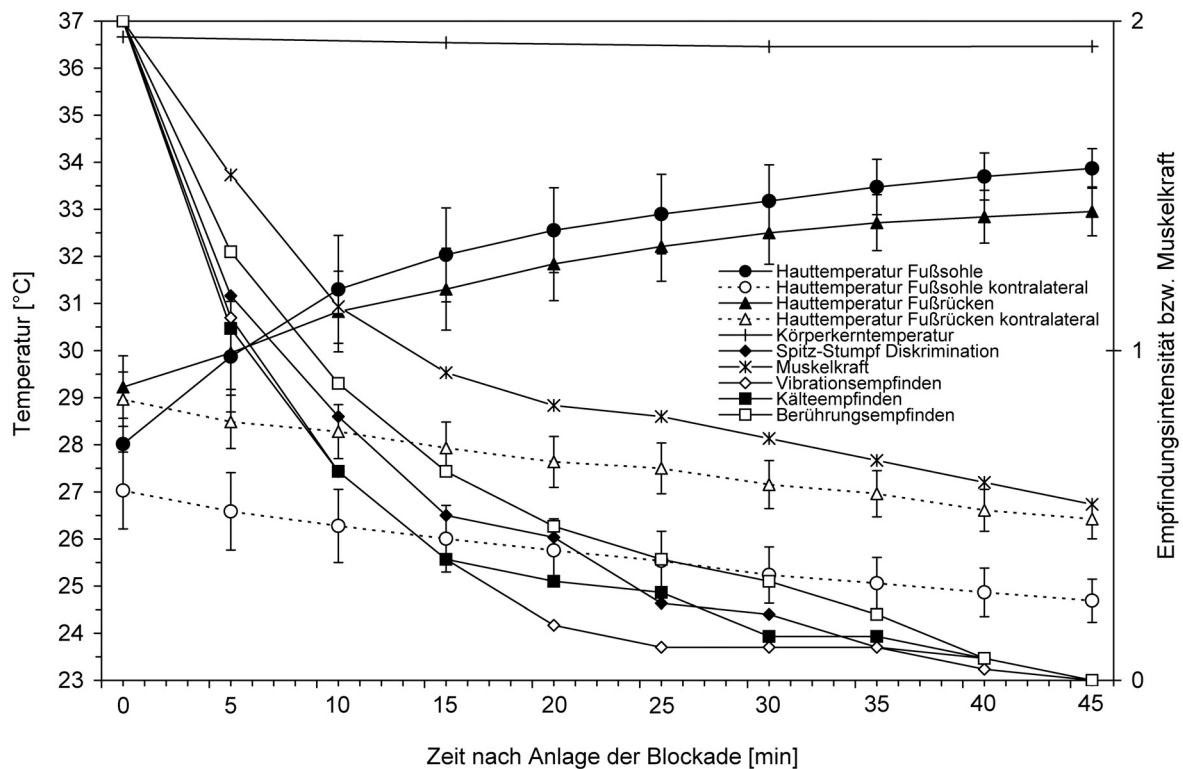
	Periphere Nervenblockaden (n = 33)	Periduralanästhesie (n = 10)
Alter [Jahre]	51 (45 - 57)	55 (43 - 66)
Gewicht [kg]	83 (77 - 89)	76 (67 - 85)
Größe [cm]	176 (173 - 180)	171 (164 - 177)
Männlich/Weiblich (n)	19 / 14	2 / 8
ASA-Status I & II	26	6
ASA-Status III	7	4

Die Daten sind als Mittelwert (95% Konfidenzintervall) dargestellt. Bei den Patienten, die periphere Nervenblockaden erhielten, wurden die Nn. ischiadici und femorales anästhesiert. Der ASA-Status ist die Klassifikation des präoperativen Allgemeinzustands der American Society of Anesthesiologists.

Die Körperkerntemperatur fiel im Mittel um $0,2^{\circ}\text{C}$ nach kombinierter Blockade des N. ischiadicus und des N. femoralis ab (Abb. 2 & 3), aber um $0,4^{\circ}\text{C}$ nach Periduralanästhesie (Abb. 4; $P < 0,05$). Die Hauttemperatur nahm 5 Minuten nach Anlage der Ischiadicusblockade um $1,8 \pm 0,9^{\circ}\text{C}$ ($P < 0,001$) an der Fußsohle und $0,7 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ($P < 0,05$) am Fußrücken zu. Die Hauttemperatur stieg im Mittel maximal um $5,9 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ an der Fußsohle und um $3,8$

$\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ am Fußrücken an. Die Zeitverläufe der Hauttemperatur sowie von Motorik und Sensibilität nach Blockade des N. ischiadicus sind in Abbildung 2 dargestellt.

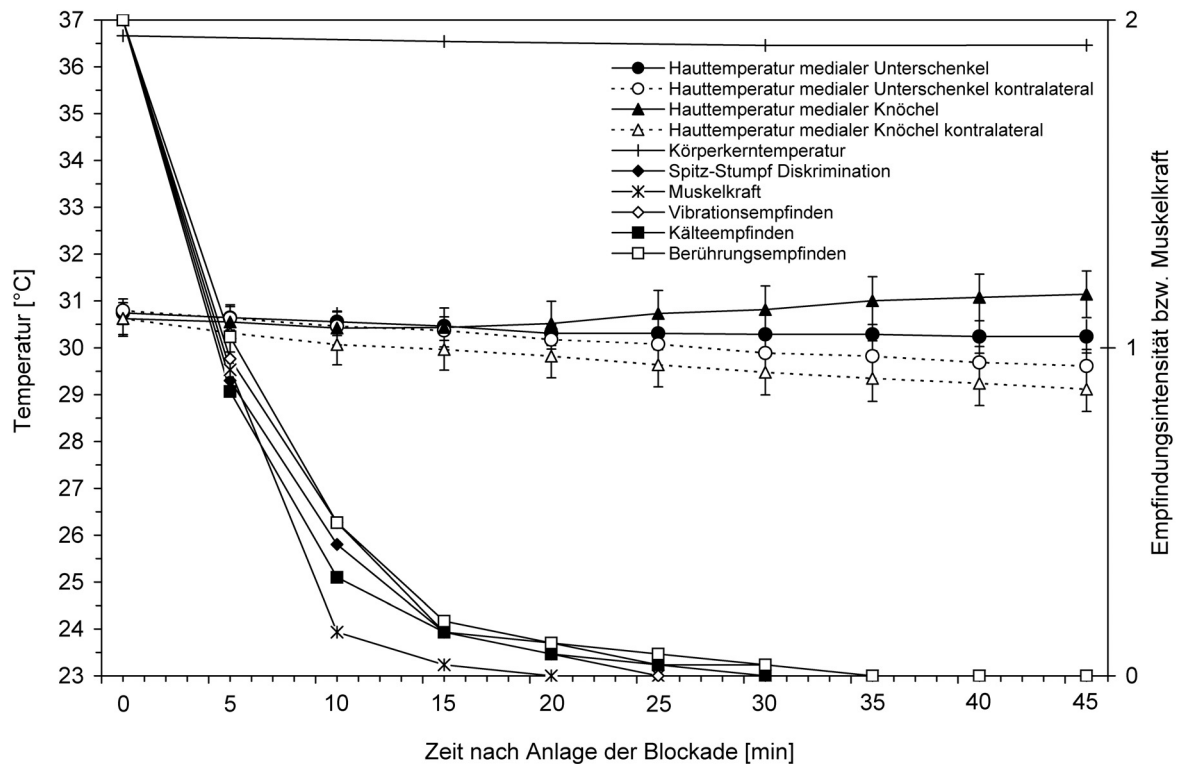
Abbildung 2: Zeitverlauf der Hauttemperatur, Motorik und Sensibilität bei beginnender Blockade des N. ischiadicus (n = 30)



Die Hauttemperatur beider Füße, Körperkerntemperatur sowie Spitz-Stumpf-Diskrimination, Vibrations-, Kälte- bzw. Berührungsempfinden und die Muskelkraft der blockierten Extremität sind im Zeitverlauf auf einer Skala von 2 (= komplett erhalten) bis 0 (= komplett blockiert) dargestellt. Schon nach 5 Minuten stieg die Hauttemperatur des Fußes der blockierten Extremität signifikant an, während die kontralaterale Extremität abkühlte. Alle gemessenen Sensibilitäten waren bereits nach 10 Minuten deutlich vermindert, die Muskelkraft blieb dagegen noch länger erhalten und war nicht bei allen Patienten nach 45 Minuten komplett blockiert.

Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ 95% Konfidenzintervall dargestellt.

Abbildung 3: Zeitverlauf der Hauttemperatur, Motorik und Sensibilität bei beginnender Blockade des N. femoralis (n = 30)



Die Hauttemperatur beider medialer Unterschenkel (Knöchel und Mitte der Tibia), Körperkerntemperatur sowie Spitz-Stumpf-Diskrimination, Vibrations-, Kälte- bzw. Berührungsempfinden und die Muskelkraft der blockierten Extremität sind im Zeitverlauf auf einer Skala von 2 (= komplett erhalten) bis 0 (= komplett blockiert) dargestellt. Die Hauttemperatur am medialen Knöchel stieg erst nach 45 Minuten im Mittel um $0,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ an ($P < 0,05$), während die Temperatur am medialen Unterschenkel auch zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant angestiegen war. Alle gemessenen Sensibilitäten waren bereits nach 5 Minuten signifikant vermindert.

Beachte: Im Gegensatz zu den Blockaden des N. ischiadicus bzw. den Periduralanästhesien trat die motorische Blockade bereits nach 5 Minuten auf und war bei allen Patienten nach 20 Minuten vollständig. Der N. femoralis teilt sich bereits am Blockadeort in verschiedene Äste auf, so dass die Lokalanästhetika dort schneller in die einzelnen Nervenäste diffundieren.

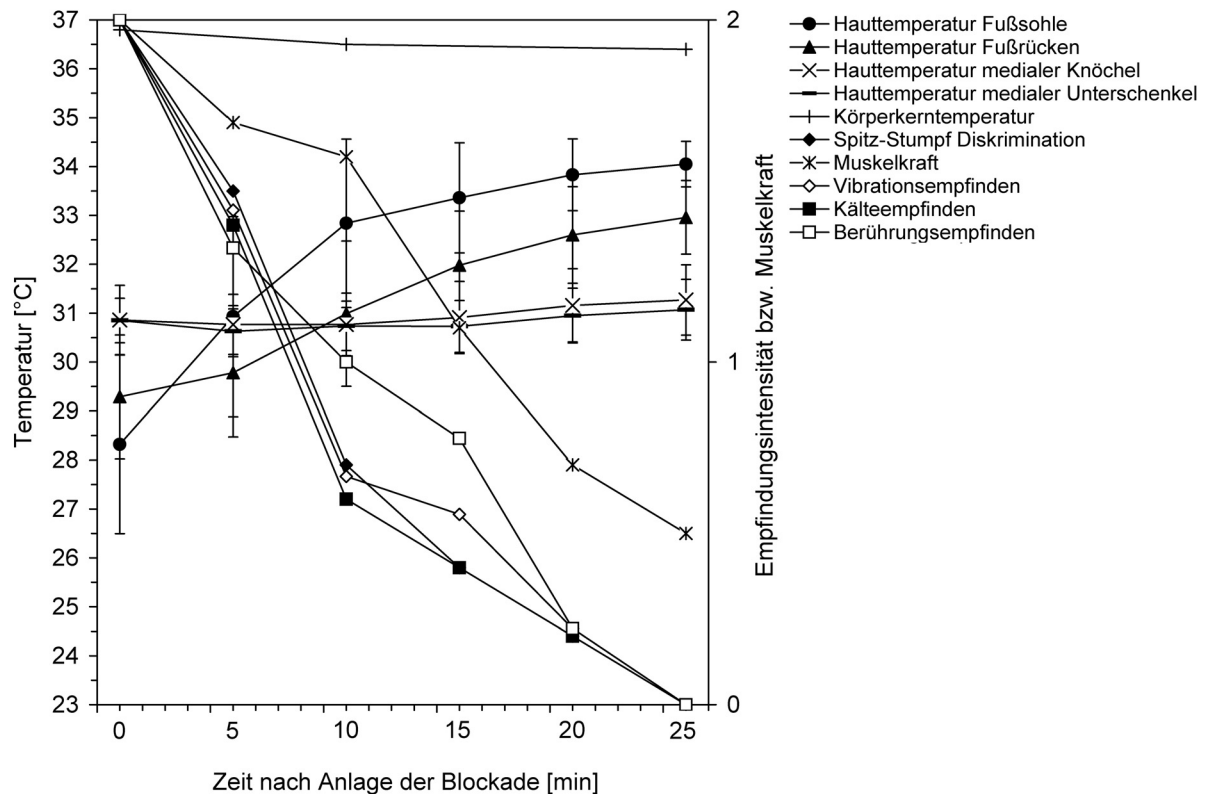
Der Anstieg der Hauttemperatur um 1°C ging dem Empfindungsverlust nur bei 2 von 30 Patienten (6,6%) voraus. Bei 17 von 30 Patienten (56,6%) trat der Temperaturanstieg zum selben Zeitpunkt ein wie der Empfindungsverlust und bei 11 Patienten (36,6%) folgte er sogar dem Empfindungsverlust. Die Hauttemperatur an der kontralateralen (nicht blockierten) Extremität nahm mit der Zeit ab. Bei allen Patienten nahmen die sensiblen Empfindungen bzw. die Muskelkraft über die Zeit ab (Abb. 2). Bei den 3 Patienten mit unzureichender Blockade des N. ischiadicus änderten sich weder Hauttemperatur noch Empfindungen über 45 Minuten. Bei diesen Patienten wurde der Eingriff in Allgemeinanästhesie durchgeführt. Die Sensitivität und Spezifität des Anstiegs der Hauttemperatur um 1°C während des Beobachtungszeitraums waren je 100% (95% Konfidenzintervall: 88 – 100%).

Die Hauttemperatur im Versorgungsgebiet des N. femoralis stieg oberhalb des medialen Knöchels erst nach 45 Minuten um lediglich $0,5 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ an, die Hauttemperatur am medialen Unterschenkel änderte sich nicht (Abb. 3). Der Empfindungsverlust trat bei der Blockade des N. femoralis ($12,3 \pm 2,3$ Minuten) eher ein als nach Blockade des N. ischiadicus ($20,3 \pm 4,2$ Minuten; $P < 0,01$). Noch größer war der Unterschied bei der motorischen Blockade: Im Durchschnitt $9,8 \pm 0,9$ Minuten nach Blockade des N. femoralis, hingegen erst $36,8 \pm 4,5$ Minuten nach Blockade des N. ischiadicus war die Motorik vollständig blockiert ($P < 0,001$).

Die Ergebnisse der Untersuchungen an Patienten mit *Periduralanästhesie* sind in der Abb. 4 zusammengefasst. Die Hauttemperatur an der Fußsohle stieg nach 5 Minuten um $2,6 \pm 1,3^{\circ}\text{C}$ ($P < 0,01$) und am Fußrücken nach 10 Minuten um $1,7 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ ($P < 0,05$) an. Der maximale Temperaturanstieg betrug $5,7 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$ an der Fußsohle und $3,7 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$ am Fußrücken. Im Unterschied zu den Ergebnissen bei den Nervenblockaden ging der Temperaturanstieg hierbei dem Empfindungsverlust bei der Hälfte der Patienten voraus. Bei der anderen Hälfte der Patienten trat der Temperaturanstieg gleichzeitig mit dem Empfindungsverlust ein. Der

schnellere Wirkungseintritt der Sympathikolyse bei Patienten mit Periduralanästhesie beruht auf der geringeren Diffusionstrecke der Lokalanästhetika zu den sympathischen Fasern.

Abbildung 4: Zeitverlauf der Hauttemperatur, Motorik und Sensibilität bei beginnender Periduralanästhesie (n = 10)



Die Hauttemperatur der Füße, Körperkerntemperatur sowie Spitz-Stumpf-Diskrimination, Vibrations-, Kälte- bzw. Berührungsempfinden und die Muskelkraft der blockierten Extremitäten sind im Zeitverlauf auf einer Skala von 2 (= komplett erhalten) bis 0 (= komplett blockiert) dargestellt. Nach 5 Minuten stieg die Hauttemperatur der Fußsohlen bzw. nach 10 Minuten die Hauttemperatur der Fußrücken signifikant an ($P < 0,05$). Alle gemessenen Sensibilitäten waren nach 10 Minuten deutlich vermindert, während wiederum die Muskelkraft noch länger erhalten blieb.

Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ 95% Konfidenzintervall dargestellt.

Bei allen Periduralanästhesien trat binnen 25 Minuten ein kompletter Empfindungsverlust ein, und die Hauttemperatur erreichte ein Plateau. Bei den Blockaden des N. ischiadicus stieg die Hauttemperatur um 1°C nach $10,3 \pm 2,8$ Minuten an, nach Periduralanästhesie bereits nach 5 Minuten ($P < 0,01$). Dagegen waren die durchschnittlichen Zeiten bis zum Empfindungsverlust nicht signifikant unterschiedlich zwischen der Blockade des N. ischiadicus und der Periduralanästhesie.

Der Anteil der Patienten, bei denen der Anstieg der Hauttemperatur dem Empfindungsverlust vorausging, war nach Periduralanästhesie (50%) signifikant höher als nach Blockade des N. ischiadicus (6,6%; $P < 0,05$; Fisher-Test).

1b) Ausdehnung der Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien

Um das Muster des Temperaturanstiegs genauer erfassen zu können, wurden mittels Video-Thermographie 24 Patienten untersucht, die verschiedene Regionalanästhesie-Verfahren erhielten (kombinierte Blockade der Nn. ischiadici und femorales, Periduralanästhesie, Spinalanästhesie). Tabelle 2 enthält die demographischen Daten der untersuchten Patienten.

Tabelle 2: Demographische Daten

	Nervenblockaden (n = 8)	Periduralanästhesie (n = 8)	Spinalanästhesie (n = 8)
Alter [Jahre]	44 (39 - 75)	45 (27 - 84)	45 (32 - 75)
Gewicht [kg]	83 (75 - 90)	85 (60 - 116)	80 (64 - 115)
Größe [cm]	177 (157 - 198)	179 (159 - 193)	178 (157 - 198)
Männlich / weiblich (n)	3 / 5	3 / 5	4 / 4
ASA-Status I & II	6	7	7
III	2	1	1

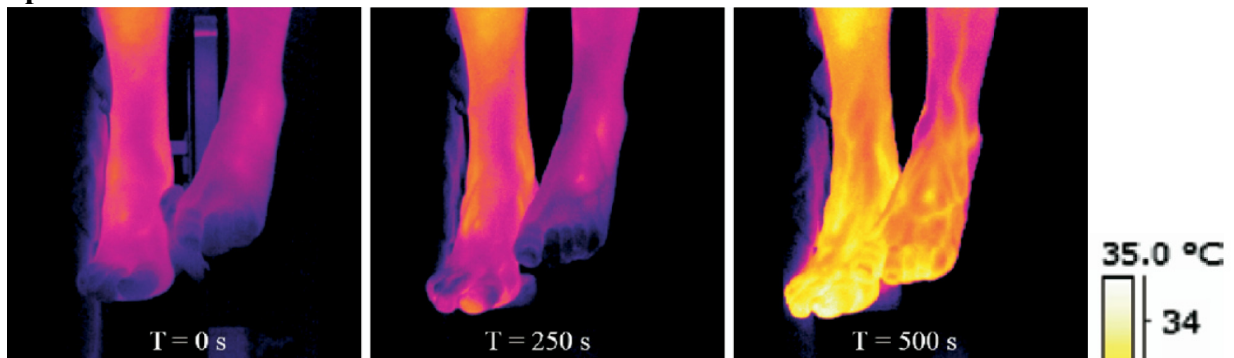
Die Daten sind als Median (Spannweite) dargestellt. Bei den Patienten, die Nervenblockaden erhielten, wurden die Nn. ischiadici und femorales anästhesiert. Der ASA-Status ist die Klassifikation des präoperativen Allgemeinzustands der American Society of Anesthesiologists.

Bei allen Patienten trat nach Anlage der Regionalanästhesie ein Empfindungsverlust in den blockierten Extremitäten ein. Unabhängig vom Regionalanästhesie-Verfahren stieg die Hauttemperatur der Großzehe bei 22 von 24 Patienten zuerst an. Der maximale Temperaturanstieg wurde bei allen Patienten an der Großzehe gemessen. Typische Beispiele des Anstiegs der Hauttemperatur für alle 3 untersuchten Regionalanästhesie-Verfahren sind in Abbildung 5 dargestellt. Oberhalb der Knöchel stieg die Hauttemperatur lediglich entlang der oberflächlichen Hautvenen an (Abb. 5). Hingegen konnte in keinem Fall eine Erwärmung der Haut beobachtet werden, die dem Versorgungsgebiet der Nerven bzw. Spinalsegmente folgt. Die Hauttemperatur am Unterschenkel blieb weitestgehend gleich am medialen (Segment L4 bzw. N. femoralis) und lateralen Unterschenkel (Segment S1 bzw. N. ischiadicus), und zwar unabhängig vom Regionalanästhesie-Verfahren (Abb. 6A). Weiterhin wurden zwei Hautareale mit gleicher Innervation (N. ischiadicus bzw. Segment L5) verglichen, die aber unterschiedlich weit vom Körperstamm entfernt liegen (Abb. 6B). Man erkennt, dass im proximalen Hautareal (lateralen Unterschenkel) die Temperatur unverändert bleibt, während distal (Großzehe) ein erheblicher Anstieg der Hauttemperatur registriert wurde ($10,6 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$; $P < 0,001$). Dieses Muster der Hauterwärmung zeigte sich bei allen untersuchten Regionalanästhesie-Verfahren gleichermaßen.

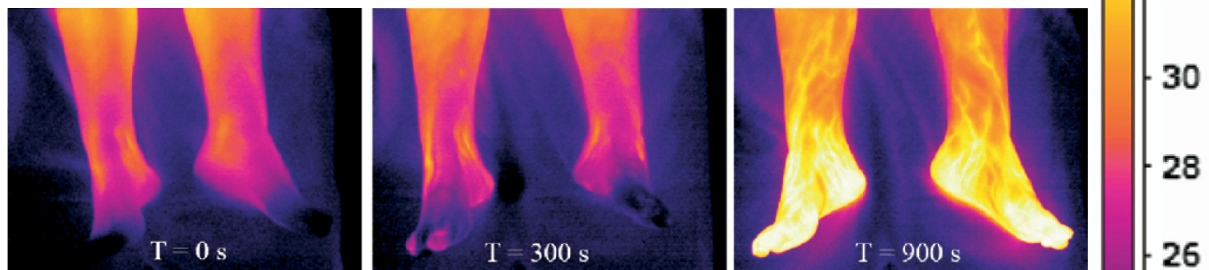
Die Zeit bis zu einem Anstieg der Hauttemperatur um 1°C betrug nach kombinierter Blockade der Nn. ischiadici und femorales 520 ± 90 Sekunden und war damit signifikant länger als nach Periduralanästhesie (256 ± 57 Sekunden) bzw. nach Spinalanästhesie (192 ± 59 Sekunden; $P < 0,05$). Ähnlich verhielt es sich mit den Zeiten bis zum maximalen Anstieg der Hauttemperatur. Die Zeit bis zum maximalen Anstieg der Hauttemperatur betrug nach den Nervenblockaden 1.113 ± 302 Sekunden, nach Periduralanästhesie 882 ± 61 Sekunden und nach Spinalanästhesie 493 ± 165 Sekunden ($P < 0,05$). Nach allen Spinalanästhesien und nach 2 von 8 Periduralanästhesien wurde nach 60 – 120 Sekunden ein initialer Abfall der Hauttemperatur am Fußrücken um $0,6 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$ beobachtet (Abb. 7).

Abbildung 5: Typische Beispiele für die Änderungen der Hauttemperatur nach verschiedenen Regionalanästhesien-Verfahren

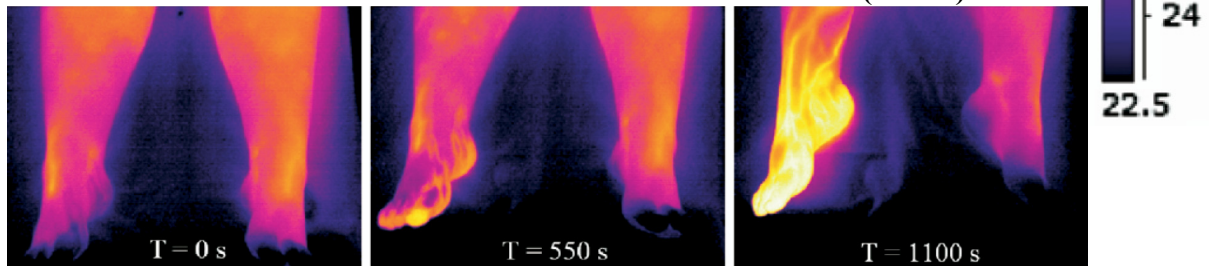
Spinalanästhesie



Periduralanästhesie

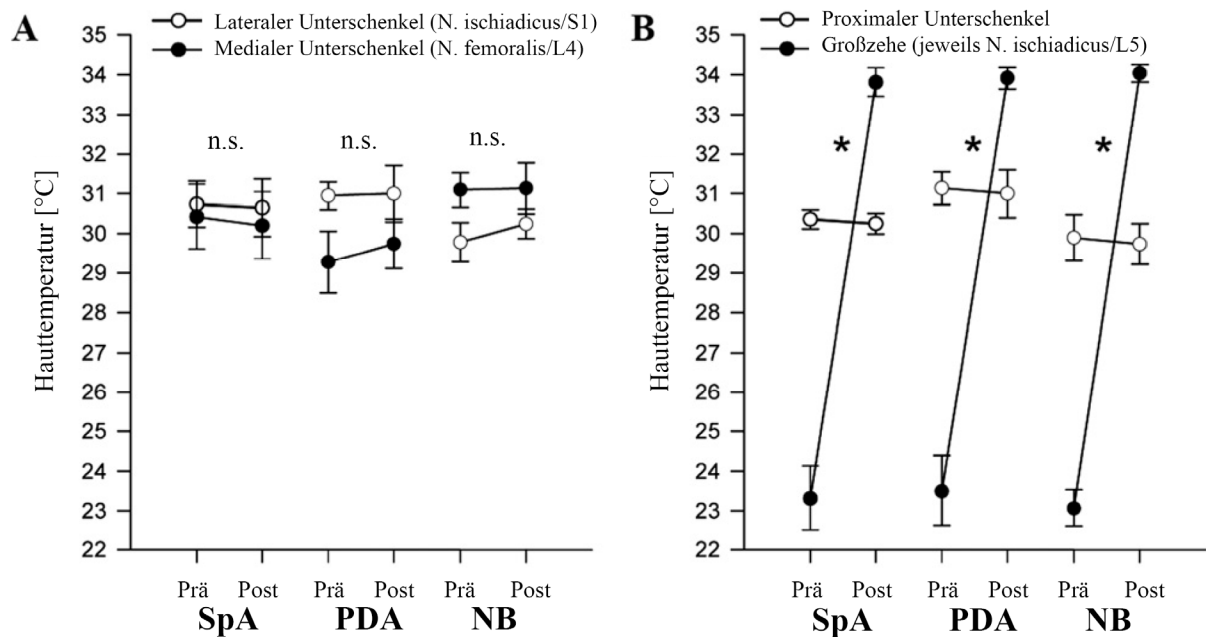


Kombinierte Blockade des N. ischiadicus und des N. femoralis (rechts)



Dargestellt sind charakteristische Thermographie-Muster direkt nach Injektion des Lokalanästhetikums zum Zeitpunkt $T = 0$ s (Sekunden) in der linken Spalte, nach Anstieg der Hauttemperatur um 1°C in der mittleren Spalte und zum Zeitpunkt der maximalen Temperaturanstiegs in der rechten Spalte. Der Anstieg der Hauttemperatur ist bei allen Verfahren weitestgehend auf den Fuß beschränkt. In der mittleren Spalte erkennt man deutlich, dass die Hauttemperatur an der Großzehe am schnellsten ansteigt. In der rechten Spalte wird deutlich, dass die Erwärmung der Haut nicht dem Versorgungsgebiet der Nerven bzw. der segmentalen Innervation folgt, sondern in erster Linie abhängig ist vom Verlauf oberflächlicher Venen.

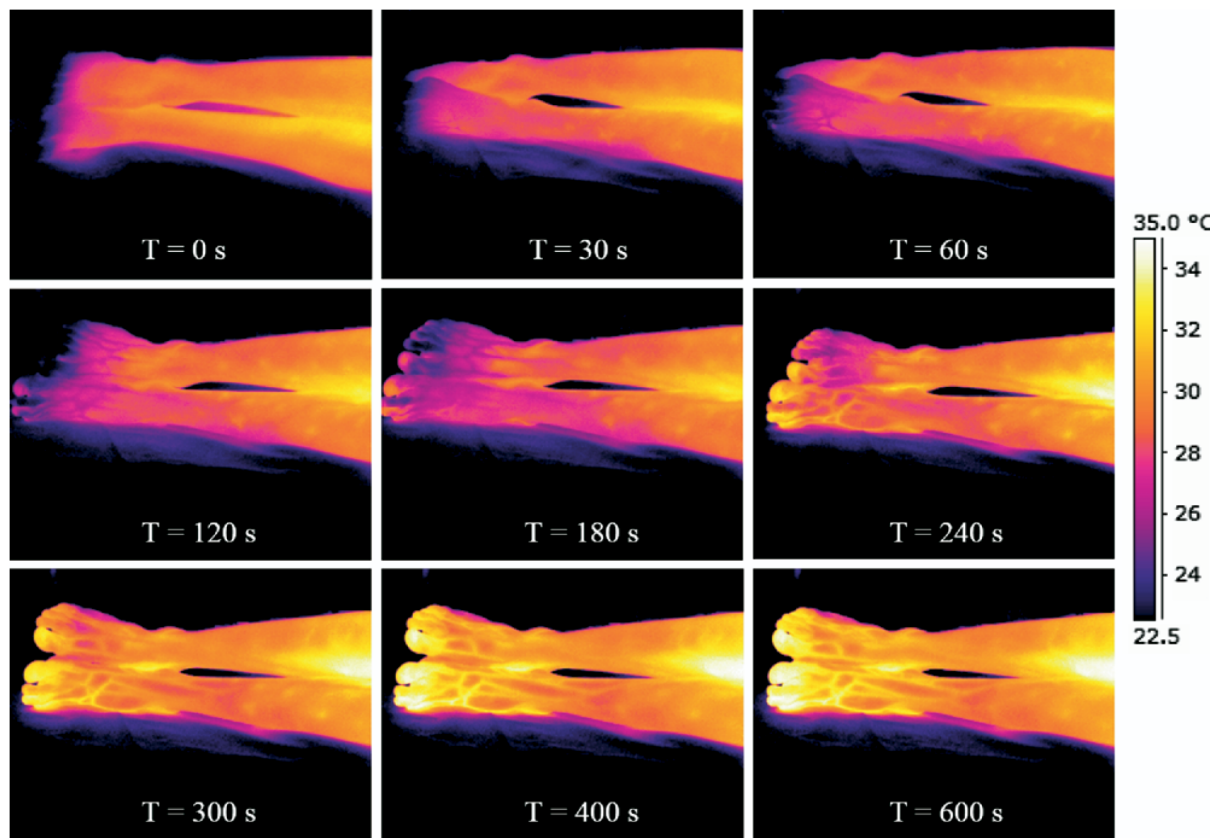
Abbildung 6: Temperatur an verschiedenen Hautarealen vor und nach Anlage der verschiedenen Regionalanästhesie-Verfahren



Die Änderungen der Hauttemperatur sind vor (Prä) und nach (Post) Anlage der verschiedenen Regionalanästhesien dargestellt (SpA = Spinalanästhesie, PDA = Peridural-anästhesie, NB = kombinierte Blockade des N. ischiadicus und des N. femoralis). Auf der linken Seite (A) wurden die Hauttemperaturänderungen am medialen und lateralen Unterschenkel verglichen. Dabei traten keine signifikanten Änderungen der Hauttemperatur auf. Auf der rechten Seite (B) wurde ein proximales Hautareal (proximaler lateraler Unterschenkel) mit einem distalen Hautareal (Großzehe) mit gleicher Innervation (N. ischiadicus bzw. Segment L5) verglichen. Dabei stieg nur die Hauttemperatur am distalen Hautareal signifikant an (* = $P < 0,001$; n.s. = nicht signifikant). Bei allen Regionalanästhesie-Verfahren blieben die Hauttemperaturen am Unterschenkel gleich, und zwar unabhängig von den verschiedenen Innervationen. Weiterhin stieg in Hautarealen, die vom N. ischiadicus bzw. dem Segment L5 versorgt werden, nur distal (Großzehe) die Temperatur signifikant an.

Alle Daten sind als Mittelwert und 95% Konfidenzintervall angegeben. Die statistische Testung erfolgte mittels Student's T-Test für verbundene Stichproben, korrigiert für multiple Testung (Bonferroni).

**Abbildung 7: Initialer Abfall der Hauttemperatur nach Spinalanästhesie
(Thermographien)**



Thermographien einer Spinalanästhesie. Die Zeitpunkte (T) der Aufnahmen nach Injektion des Lokalanästhetikums sind in Sekunden (s) auf jedem Bild angezeigt. Nach 60 bis 180 Sekunden strömt kaltes Blut aus den Akren durch die oberflächlichen Venen des Fußrückens und senkt kurzfristig die Hauttemperatur. Erst danach kommt es zu einer Erwärmung der Extremität, die wiederum von den oberflächlichen Venen ausgeht und nach 600 Sekunden ihr Maximum erreicht.

1c) Sympathikolyse durch Spinalanästhesie bei Säuglingen

Die Auswirkung der Sympathikolyse durch Spinalanästhesie auf die Hauttemperatur und den arteriellen Blutdruck wurden auch bei Säuglingen untersucht.

Die demographischen Daten der Patienten sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Demographische Daten

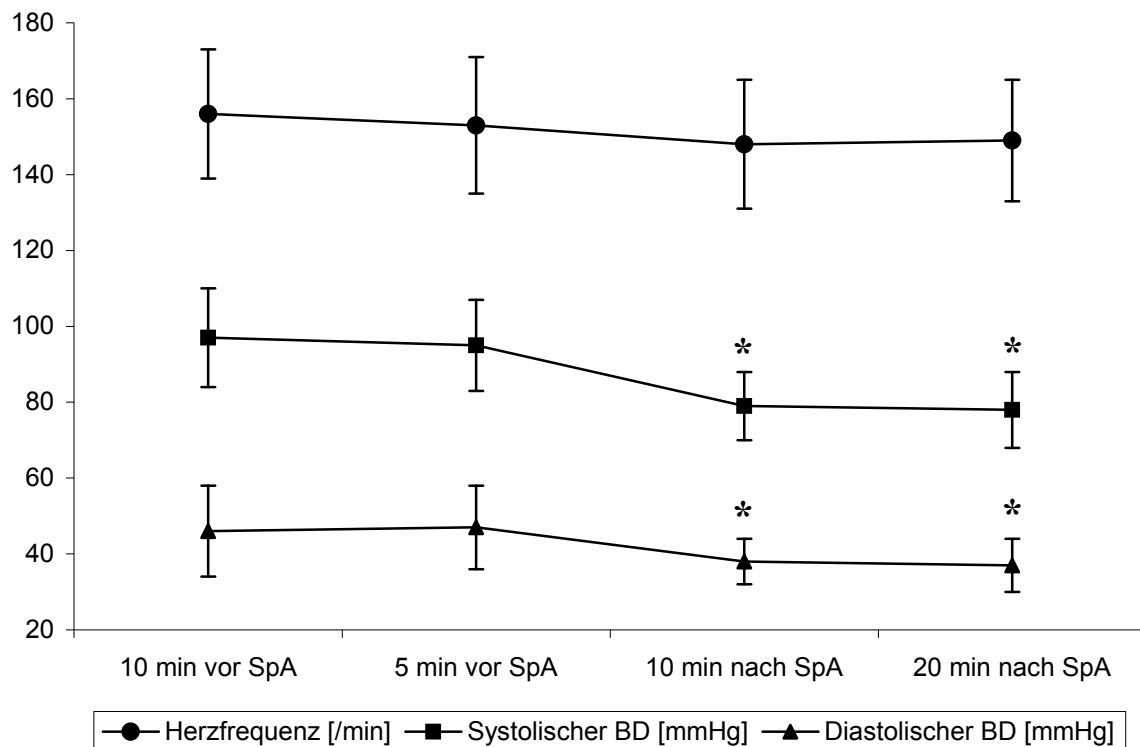
Männlich/weiblich (n)	14/1
Gestationsalter [Wochen]	33,0 ± 4,9
Postnatales Alter [Wochen]	12,0 ± 4,7
Postkonzeptionelles Alter [Wochen]	45,0 ± 4,8
Gewicht [kg]	4,0 ± 1,2
Operationen (n)	
Inguinale Hernie, einseitig	10
Inguinale Hernien, beidseitig	5
Operationsdauer [min]	34,2 ± 19,1

Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.

Blutdruck, Herzfrequenz und Hauttemperaturen waren konstant vor Beginn der Spinalanästhesie (Abb. 8 & 9). Die Anlage der Spinalanästhesie erfolgte problemlos bei allen Säuglingen und führte zu einer prompten sensiblen und motorischen Blockade der Beine. Die pulsoximetrisch bestimmte Sauerstoffsättigung war bei allen Patienten perioperativ konstant $\geq 97\%$. Der systolische Blutdruck fiel bei allen Säuglingen nach Anlage der Spinalanästhesie ab und zwar im Mittel von 95 ± 12 mmHg auf 79 ± 9 mmHg ($P < 0,0001$). Der diastolische Druck sank von 47 ± 11 mmHg auf 37 ± 6 mmHg ($P < 0,01$, Abb. 8). Die Herzfrequenz änderte sich nur unwesentlich von $153 \pm 18/\text{min}$ auf $148 \pm 17/\text{min}$ ($P = 0,2$).

Die Hauttemperatur an der Fußsohle stieg 10 Minuten nach Anlage der Spinalanästhesie von $33,0 \pm 1,3^\circ\text{C}$ auf $34,7 \pm 1,4^\circ\text{C}$ an ($P < 0,0001$), während die Hauttemperatur am Thorax unverändert blieb. Die motorische Blockade hielt $82,4 \pm 15,3$ Minuten an (Abb. 9). Postoperativ kam es bei keinem Säugling zu Apnoen oder Abfällen der pulsoximetrisch gemessenen Sauerstoffsättigung.

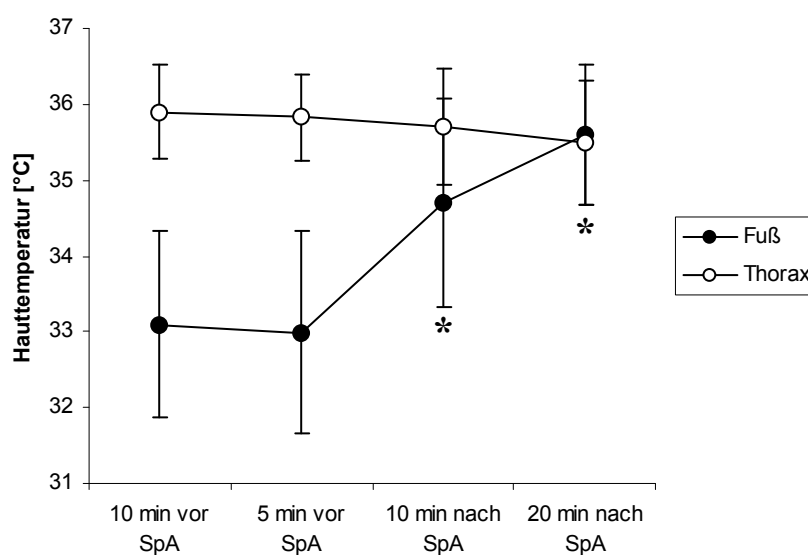
Abbildung 8: Blutdruck und Herzfrequenz vor und nach Anlage der Spinalanästhesie bei Säuglingen



Herzfrequenz und oszillometrisch gemessener Blutdruck vor und nach Anlage einer Spinalanästhesie bei Säuglingen.

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 15 Säuglingen. *P < 0,01 verglichen mit dem Ausgangswert.

Abbildung 9: Veränderungen der Hauttemperatur thorakal und plantar



Änderungen der Hauttemperatur der Dermatomer Th4 (Thorax) und L5/S1 (Fußsohle) nach Spinalanästhesie (SpA). Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung von 15 Säuglingen.

*P < 0,0001 verglichen mit dem Ausgangswert (Student's T-Test).

2 Sedierung durch Spinalanästhesie bei Säuglingen

An weiteren 20 Säuglingen wurde untersucht, ob eine Spinalanästhesie *per se* - ähnlich wie bei Erwachsenen - eine Sedierung hervorruft. Die demographischen Charakteristika der Patienten sind Tabelle 4 zusammengefasst.

Tabelle 4: Demographische Daten

Männlich/weiblich (n)	14/6
Gestationsalter [Wochen]	34,5 ± 4,8
Postnatales Alter [Wochen]	10,0 ± 4,6
Gewicht [kg]	3,5 ± 1,7
Operationsdauer [min]	40,5 ± 19,1

Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.

Die Anlage der Spinalanästhesien war bei allen 20 Säuglingen erfolgreich und führte binnen 1-2 Minuten zu einer kompletten sensiblen und motorischen Blockade der unteren Extremität. Einer der Säuglinge war nach Anlage der Spinalanästhesie so agitiert, dass er intravenös mit Propofol sediert werden musste. Er wurde von der weiteren Analyse ausgeschlossen.

Systolischer und diastolischer Blutdruck nahmen nach Anlage der Spinalanästhesie signifikant ab (Tab. 5).

Tabelle 5: Hämodynamik vor und nach Spinalanästhesie

Hämodynamische Variable	5 Minuten vor Spinalanästhesie	10 Minuten nach Spinalanästhesie
Systolischer Blutdruck [mmHg]	94 ± 6	81 ± 7 *
Arterieller Mitteldruck [mmHg]	67 ± 5	56 ± 6 *
Diastolischer Blutdruck [mmHg]	54 ± 6	43 ± 7 *
Herzfrequenz [/min]	160 ± 16	157 ± 17

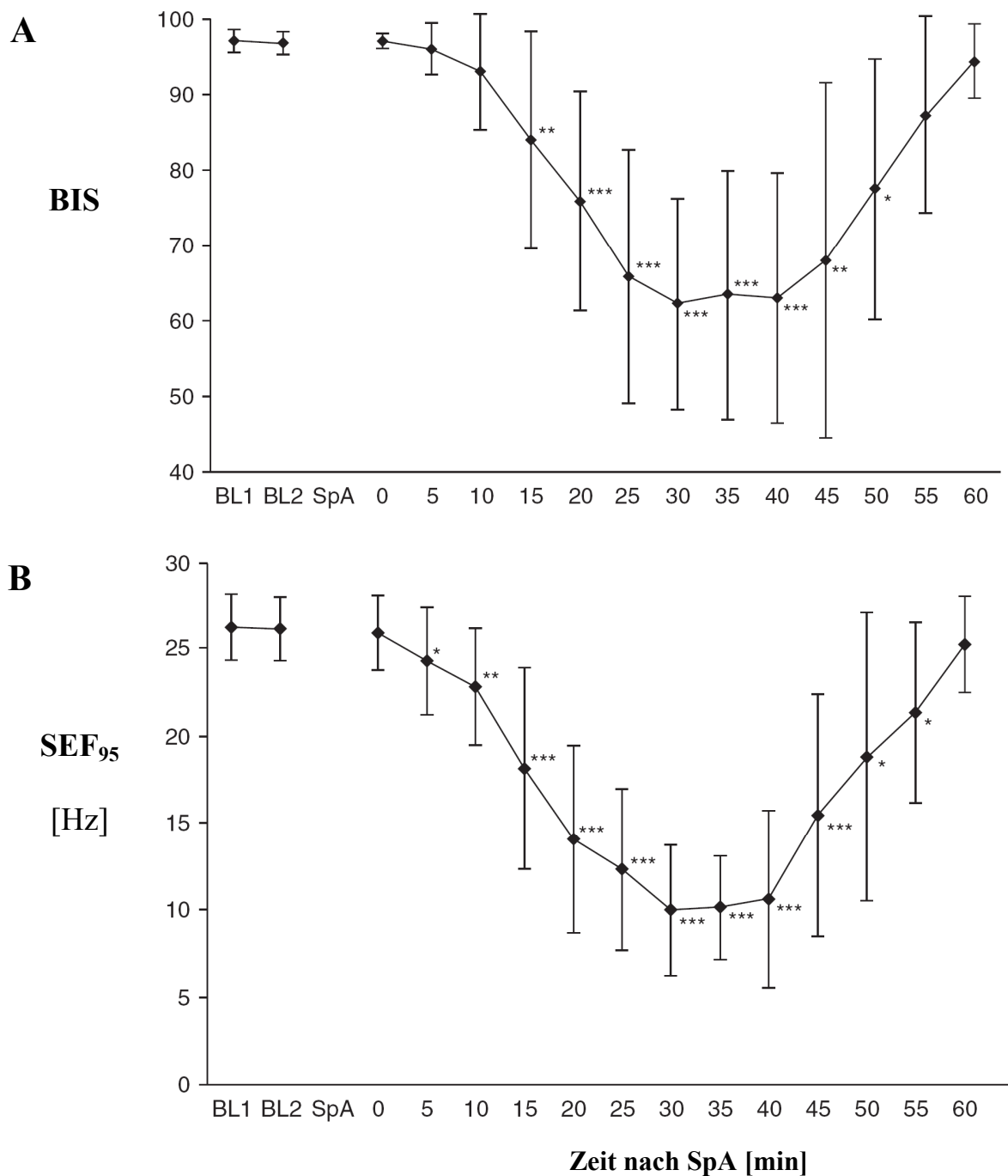
Alle Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. * P < 0,001 (Student's T-Test)

Die Ausgangswerte des bispektralen Index (BIS) und der spektralen Eckfrequenz (SEF₉₅) blieben konstant vor der Anlage der Spinalanästhesie. Der BIS fiel nach 15 Minuten signifikant (P < 0,01) gegenüber dem Ausgangswert ab. Bei allen Säuglingen kam es perioperativ

zu einem Abfall des BIS auf Werte von durchschnittlich $62,2 \pm 14$ nach 30 Minuten (Abb. 10 A). Ebenso fielen die SEF_{95} -Werte schon nach 5 Minuten signifikant ab, und ein Minimum wurde nach 30 Minuten erreicht (Abb. 10 B). Beide Werte stiegen zum Ende der Operation wieder an und erreichten nach 60 Minuten fast wieder den Ausgangswert.

Dem Abfall von BIS und SEF_{95} entsprechend schliefen alle Säuglinge nach Anlage der Spinalanästhesie ein und waren nur schwer weckbar. Die motorische Blockade hielt im Durchschnitt $96,6 \pm 23$ Minuten an. In den ersten 24 postoperativen Stunden wurden bei keinem Säugling ein Abfall der pulsoximeterisch gemessenen Sauerstoffsättigung, eine Apnoe oder andere kardiopulmonale Auffälligkeiten beobachtet.

Abbildung 10: Bispektraler Index (BIS) und 95% spektrale Eckfrequenz (SEF₉₅) nach Spinalanästhesie (SpA) bei Säuglingen



Dargestellt sind die Zeitverläufe des bispektralen Index (BIS) und der spektralen Eckfrequenz 95% (SEF₉₅) zu 2 Zeitpunkten vor der Spinalanästhesie (BL1 bzw. BL2), sowie alle 5 Minuten nach Anlage der Spinalanästhesie (SpA). Deutlich erkennbar ist der rasche und signifikante Abfall beider Variablen kurz nach Anlage der Spinalanästhesie als Zeichen eines zentralen Effektes (Sedierung). Daten als Mittelwerte und Standardabweichung. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 verglichen mit dem jeweiligen Ausgangswert (Student's T-Test mit Bonferroni-Korrektur).

3 Untersuchungen zur Verbesserung der Regionalanästhesie durch elektrische Stimulation

3a) Beeinflussung der Anschlagzeit und Ausdehnung von Nervenblockaden durch elektrische Reizung der Haut und transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS)

In dieser Studie an Probanden wurde mittels einer großflächigen, hochfrequenten elektrischen Stimulation des sensiblen Innervationsgebiets des N. ulnaris der Wirkungseintritt einer Leitungsblockade beschleunigt. Nach Blockade des N. ulnaris nahm die Empfindungsintensität der elektrischen Stimulation frühzeitig und abhängig von der Stimulationsfrequenz ab (Abb. 11). Dadurch verkürzten sich bei hohen Stimulationsfrequenzen (10 bzw. 50 Hz) die Zeiten bis zum halben bzw. kompletten Empfindungsverlust (Abb. 12). Weiterhin trat bei hochfrequenter Stimulation (10 bzw. 50 Hz) bei 5 bzw. 6 Probanden ein kompletter Empfindungsverlust im Beobachtungszeitraum auf. Hingegen aber bei keinem Probanden unter einer Stimulation mit einer Frequenz von 0,2 Hz. Auch die Ausdehnung der sensiblen Blockade wurde durch die hochfrequente Stimulation verbessert, und zwar bemerkenswerterweise innerhalb kürzerer Zeiträume (Abb. 13).

Während der Kontrollstimulation ohne Leitungsblockade änderte sich die Hauttemperatur nicht. Hingegen stieg sie am der Kleinfingerseite der Handfläche nach Blockade um im Median 4,4°C an. Die verschiedenen Stimulationsfrequenzen beeinflussten aber nicht den Wirkungseintritt der Sympathikolyse (Tab. 6).

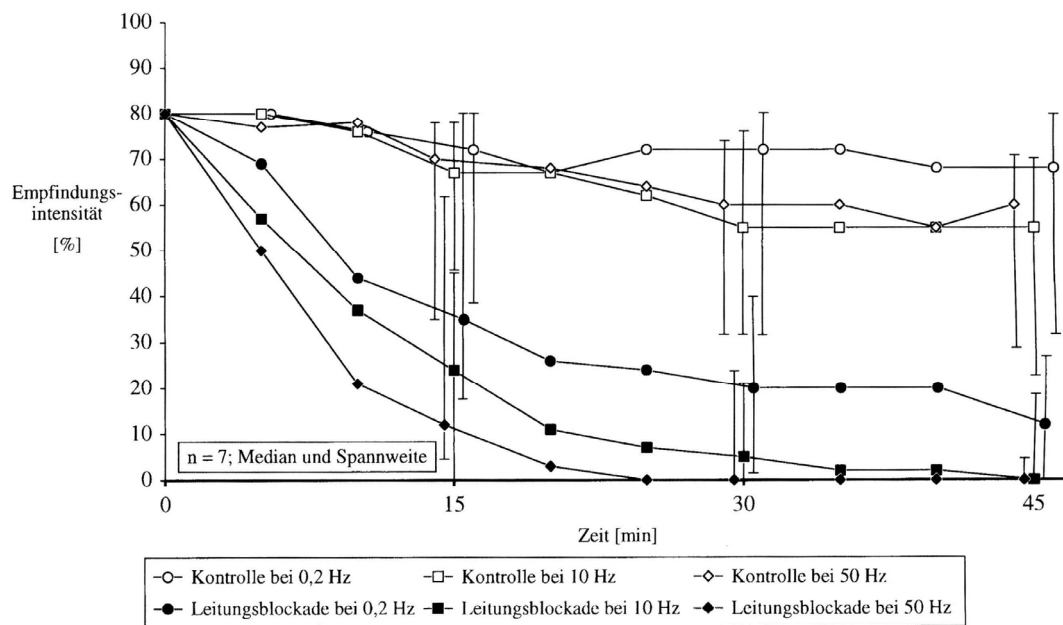
Tabelle 6: Anschlagzeiten der Sympathikolyse bei verschiedenen Frequenzen

Stimulationsfrequenz	0,2 Hz	10 Hz	50 Hz
Zeit bis zum maximalen Temperaturanstieg [min]	9 (3-12)	10 (3-14)	6 (3-16)

Zeiten als Median (Spannweite). Die Zeiten unterschieden sich nicht statistisch (Friedman-Test).

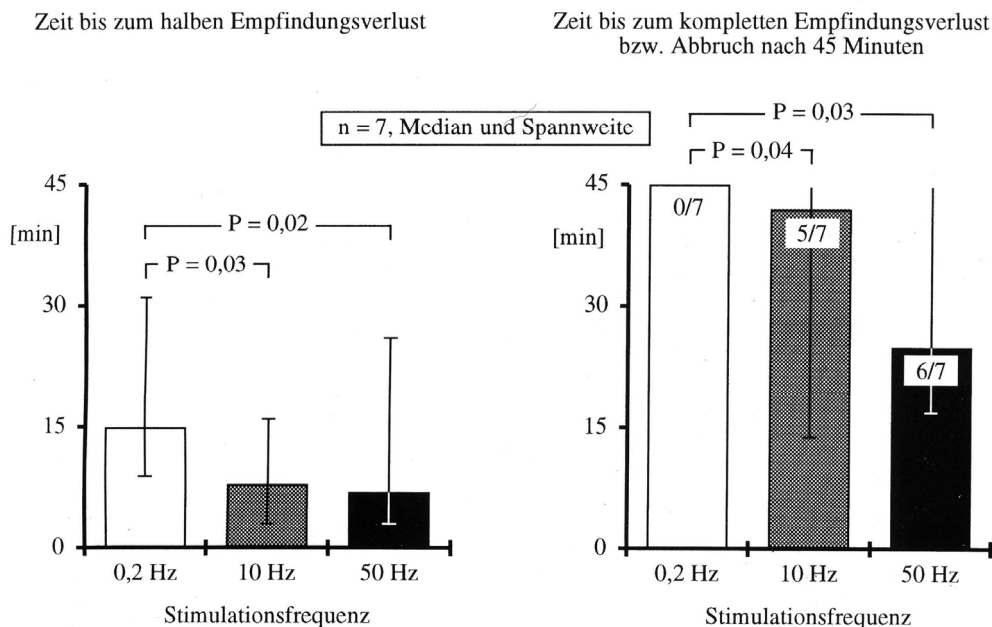
Bei jedem Probanden trat innerhalb von 90 Minuten eine komplette Leitungsblockade des N. ulnaris ein. Sie hielt maximal 22 Stunden an, wobei die Dauer unabhängig von der verwendeten Stimulationsfrequenz war.

Abbildung 11: Zeitverlauf der Empfindungsintensität



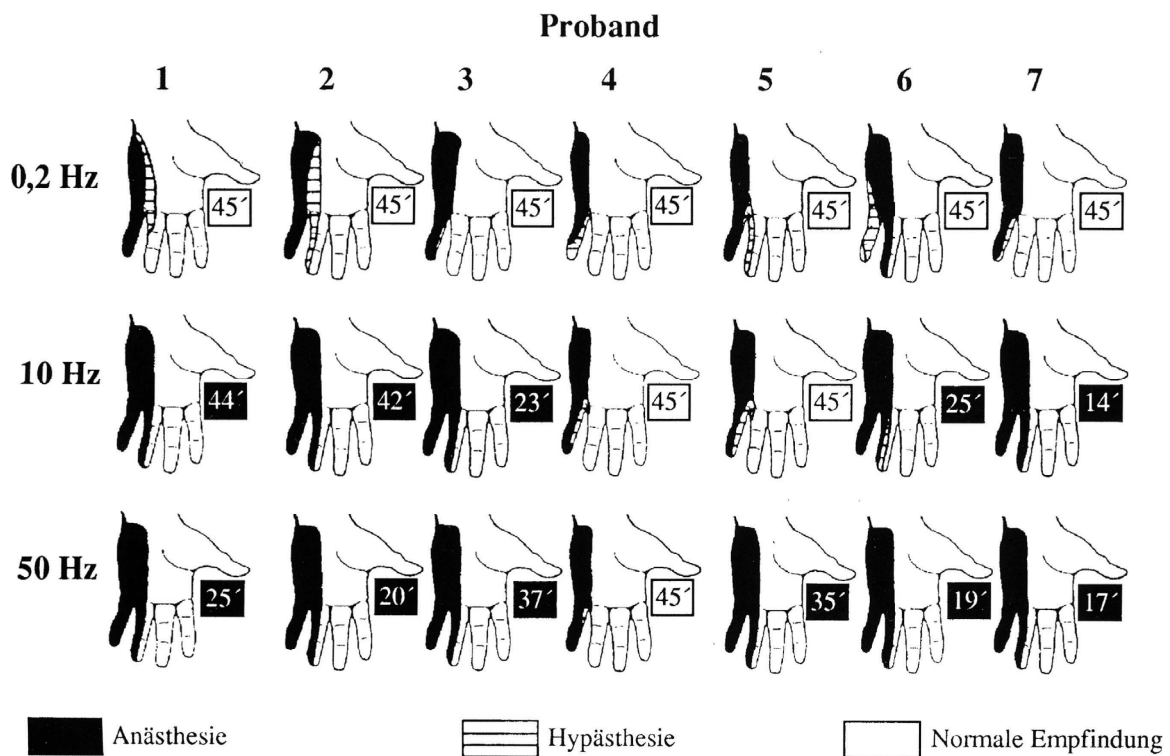
Zeitverlauf der Empfindungsintensität während der Kontrollstimulation und der Stimulation nach Ulnarisblockade für jede Stimulationsfrequenz. Im Gegensatz zur Kontrollstimulation ist eine frühe frequenzabhängige Abnahme der Empfindungsintensität nach Leitungsblockade zu beobachten.

Abbildung 12: Zeiten bis zum halben bzw. kompletten Empfindungsverlust bei verschiedenen Stimulationsfrequenzen



Ein kompletter Empfindungsverlust trat innerhalb von 45 Minuten in keinem Fall (0/7) während Stimulation mit 0,2 Hz auf, hingegen in 5 bzw. 6 von 7 Fällen während Stimulation mit 10 bzw. 50 Hz. P-Werte des Wilcoxon-Rangsummentests.

Abbildung 13: Ausdehnung der sensiblen Blockaden



Ausdehnung der sensiblen Blockaden am Ende eines jeden Experiments. Die Hautareale mit verminderter Empfindung (Hypästhesie = schraffiert) bzw. aufgehobener Empfindung (Anästhesie = schwarz) sind kenntlich gemacht. Die Ausdehnung der Leitungsblockaden für jede Stimulationsfrequenz ist in den Zeilen, für jeden Probanden in den Spalten wiedergegeben. Die Ausdehnung wurde mittels Spitz-Stumpf-Diskrimination getestet. Jeder abgebildeten Hand sind die Minuten bis zum kompletten Empfindungsverlust für die elektrische Stimulation zugeordnet: Schwarze Zahlen auf weißem Grund, falls die Stimulation nach 45 Minuten noch wahrgenommen wurde, weiße Zahlen auf schwarzem Grund, falls eine Empfindungsverlust früher auftrat.

In der sich anschließenden Studie an Patienten, die eine Blockade des axillären Plexus erhielten, wurde der Effekt einer kleinflächigen transkutanen elektrischen Nervenstimulation (TENS) entlang des oberflächlichen Verlauf des N. medianus bzw. des N. ulnaris auf den Blockadebeginn der Regionalanästhesie mit einer Kontrollgruppe ohne Stimulation verglichen. Die demographischen Charakteristika der Patienten unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen (Tab. 7).

Tabelle 7: Demographische Daten

	TENS des N. medianus	TENS des N. ulnaris	Kein TENS (Kontrolle)
Männlich/weiblich	6/10	6/9	7/9
Alter [Jahre]	40 ± 17,6	36 ± 15,8	50 ± 14,9
Körpergewicht [kg]	67 ± 12,9	75 ± 18,3	75 ± 13,2
Größe [cm]	168 ± 9,0	173 ± 9,2	175 ± 12,7

Daten als Mittelwerte ± Standardabweichung.

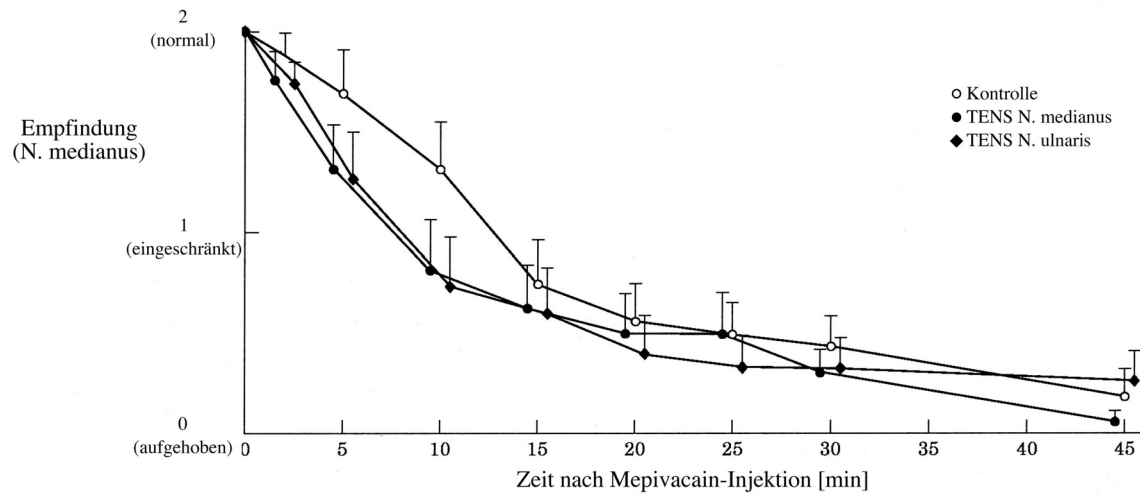
Der Zeitverlauf des Empfindungsverlustes unterschied sich nicht zwischen den verschiedenen Gruppen für die Hautareale der Nn. mediani und ulnares (Abb. 14 & 15). Ebenso gab es keine Unterschiede hinsichtlich des Ausmaßes der sensiblen und motorischen Blockade zwischen den Gruppen direkt nach Beendigung der TENS (Tab. 8).

Tabelle 8: Sensible und motorische Blockade 15 Minuten nach Injektion

Nerv		TENS des N. medianus	TENS des N. ulnaris	Kein TENS (Kontrolle)
N. medianus	- sensibel	0,37 ± 0,72	0,53 ± 0,74	0,5 ± 0,73
	- motorisch	1,31 ± 1,66	1,4 ± 1,35	1,56 ± 1,71
N. ulnaris	- sensibel	0,56 ± 0,89	0,33 ± 0,72	0,5 ± 0,73
	- motorisch	1,06 ± 1,29	1,15 ± 1,28	1,12 ± 1,54
N. radialis	- sensibel	0,69 ± 0,87	0,6 ± 0,82	0,81 ± 0,75
	- motorisch	1,25 ± 1,44	1,8 ± 1,32	1,94 ± 1,8
N. musculocutaneus	- sensibel	1,0 ± 0,96	1,06 ± 0,88	0,94 ± 0,93
	- motorisch	2,12 ± 1,71	2,66 ± 1,51	2,62 ± 1,63

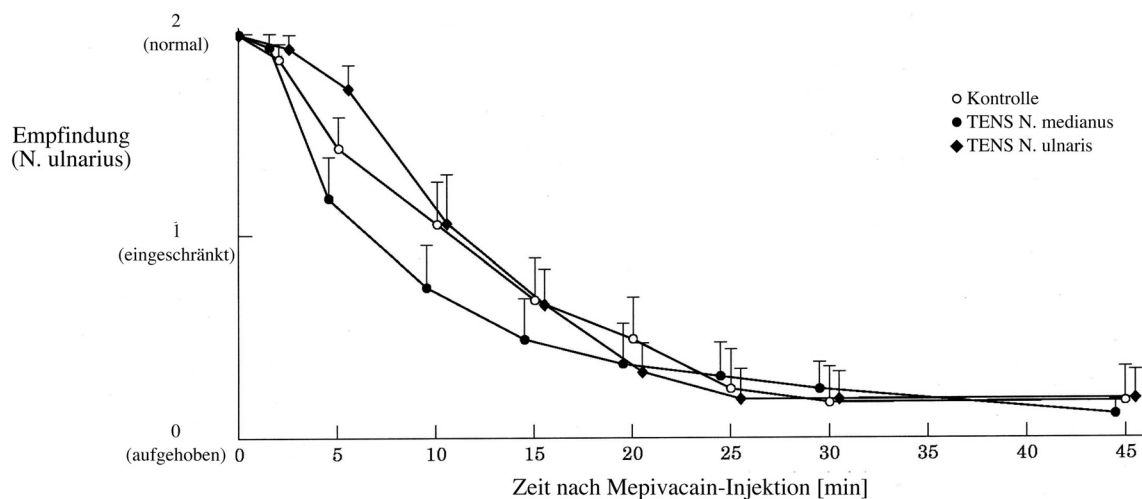
Mittlere Schmerzempfindungen (= sensibel) auf einer Skala von 0 = keine Empfindung bis 2 = normale Empfindung für jeden der 4 Nerven des axillären Plexus brachialis 15 Minuten nach Beginn der TENS bzw. nach Injektion des Lokalanästhetikums. Analog wurde die motorische Kraft in den Kennmuskeln jedes Nerven auf einer Skala von 0 = keine Kontraktionen bis 5 = normale Kraft ermittelt (Skala der motorischen Kraft der Medical Research Council = MRC). Die Daten sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt. Die Werte für sensible Empfindung und Kraft unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Friedman-Test).

Abbildung 14: Zeitverlauf der Berührungsempfindung im Bereich des N. medianus für alle 3 Gruppen



Zeitverlauf der Berührungsempfindung (eingeteilt in normal = 2, eingeschränkt = 1 und aufgehoben = 0) im Hautareal des N. medianus. Die Patienten wurden randomisiert folgenden Gruppen zugeteilt: - Transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS) im Bereich des N. medianus (●), - TENS im Bereich des N. ulnaris (◆), - keine elektrische Stimulation (○). Die Daten sind als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Abbildung 15: Zeitverlauf der Berührungsempfindung im Bereich des N. ulnaris für alle 3 Gruppen



Zeitverlauf der Berührungsempfindung (eingeteilt in normal = 2, eingeschränkt = 1 und aufgehoben = 0) im Hautareal des N. ulnaris. Die Patienten wurden randomisiert folgenden Gruppen zugeteilt: - Transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS) im Bereich des N. medianus (●), - TENS im Bereich des N. ulnaris (◆), - keine elektrische Stimulation (○). Die Daten sind als Mittelwert und Standardfehler dargestellt. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

b) Verbesserung des funktionellen Ergebnisses von Schulteroperationen durch stimulierbare Katheter zur postoperativen Analgesie

Von den 43 Patienten wurden 40 randomisiert und in die Studie eingeschlossen, da bei 3 Patienten in der vorgegebenen Zeit keine adäquate Stimulation des M. deltoideus bzw. des M. biceps erzielt werden konnte.

Bei 4 Patienten kam es in den ersten 48 Stunden zu einer Dislokation des Katheters (3 in der Stimulationskatheter-Gruppe, 1 in der Kontrollgruppe). Diese Patienten wurden in die Auswertung aufgenommen (intention-to-treat analysis). Eine Patientin erlitt ein Trauma der operierten Schulter 4 Wochen nach der Operation und ein Patient erschien nicht zur postoperativen Untersuchung. Beide Patienten waren in der Stimulationskatheter-Gruppe und konnten nicht in die Auswertung der Schulterfunktions-Scores einbezogen werden. Die Gruppen unterschieden sich nicht hinsichtlich der demographischen Daten, der durchgeführten Operationen sowie der Operationsdauer. Weiterhin gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Dauer der Katheter-Anlage, der Patientenzufriedenheit mit der Katheter-Anlage und der Anzahl der akzidentellen Gefäßpunktionen bei Katheter-Anlage (4 je Gruppe).

Die mediane Dauer bis zur kompletten motorischen Blockade war in der Stimulationskatheter-Gruppe signifikant kürzer als in der der Kontrollgruppe (10 vs. 20 Minuten, $P < 0,05$). Hingegen waren die medianen Zeiten bis zum kompletten Empfindungsverlust sowohl für Schmerz- als auch für Berührungsempfindung in beiden Gruppen 20 Minuten und damit nicht unterschiedlich.

Generell waren die postoperativen Schmerzscores in beiden Gruppen sehr niedrig. Die erhobenen Variablen zur Qualität der postoperativen Schmerztherapie unterschieden sich nicht zwischen den beiden Gruppen: Die medianen postoperativen Schmerzscores in Ruhe und während passiver Mobilisation, die Anzahl der über eine Patienten-kontrollierte Schmerzpumpe angeforderten und gegebenen Ropivacain-Boli, die Anzahl der zusätzlich verabreichten systemischen Analgetika, die Bewertung der Schmerztherapie durch die

Patienten und die Anzahl der Patienten, die die gleiche Schmerztherapie wieder wählen würden, waren in beiden Gruppen gleich (Tab. 9).

Tabelle 9: Postoperative Schmerzscores und analgetische Therapie

	Stimulationskatheter- Gruppe (n = 20)	Kontrollgruppe (n = 20)
Schmerzscores in Ruhe (NRS-AUC)	3	4
Schmerzscores während Mobilisation (NRS-AUC)	0 (0/1,6)	0,3 (0/1,3)
Anzahl Ropivacain Boli (Patienten-kontrollierte Schmerzpumpe)	1,2 (0,4/2,4)	1,5 (0,3/2,9)
Anzahl systemischer Analgetikagaben	1 (1/2)	0 (0/4)
Gesamtdauer [Stunden] der Therapie über den interskalenären Katheter	50 (35/74)	53 (50/77)
Beurteilung der Schmerztherapie durch die Patienten (Schulnoten)	1 (1/2)	1 (1/1,25)
Anzahl der Patienten, die die Therapie wieder wählen würden (n)	19	19

Variablen zur Beurteilung der postoperativen Schmerztherapie: Die Schmerzscores wurden anhand einer numerischen Skala (NRS) 12-stündlich bzw. die Fläche unter der Kurve (AUC) über 48 Stunden erhoben. Die Daten sind dargestellt als Median (25 / 75% Perzentilen). Es ergaben sich keine statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen (Mann-Whitney-U-Test bzw. Fisher-Test).

Hingegen verbesserten sich die Funktion der Schulter 6 Wochen postoperativ nur in der Stimulationskatheter-Gruppe. Beim *objektiven* Constant-Murley-Score war diese Verbesserung signifikant ($P < 0,01$), beim *subjektiven* DASH-Score tendenziell (Tab. 10).

Tabelle 10: Funktionelle Verbesserungen nach 6 Wochen

Verbesserung der Schmerzscores	Stimulationskatheter- Gruppe (n = 20)	Kontrollgruppe (n = 18)
DASH-Score	- 29,4 (- 39,4/-4,2)	- 10,3 (-35,0/12,4)
CMS*	34,5 (8,5/51,5)	4,0 (- 15,8/19,5)

Der Disability of Arm, Shoulder and Hand-Score (DASH-Score) beruht auf der subjektiven Beurteilung der Schulterfunktion durch die Patienten, während der Constant-Murley-Score (CMS) sich vor allem aus objektivierbaren Funktionsuntersuchungen errechnet. Beide Scores liefern Werte zwischen 0 und 100, wobei zu beachten ist, dass eine Verbesserung der Schulterfunktion den DASH-Score vermindert (negative Werte), den CMS aber erhöht (positive Werte). Die Daten sind als Median (25 / 75% Perzentilen) dargestellt. * $P < 0,01$ (Mann-Whitney-U-Test mit Bonferroni-Korrektur).

Ein Patient (Stimulationskatheter-Gruppe) hatte postoperativ Parästhesien im Kleinfinger, die über die nächsten 4 Monate verschwanden. Zwei Patienten (aus jeder Gruppe einer) hatten erhebliche Schmerzen in der operierten Schulter über die Dauer von 4 Monaten. Eine Patientin (Kontrollgruppe) hatte starke Schmerzen beim Entfernen des Katheters. Diese 4 Patienten wurden eingehend neurologisch und neurophysiologisch untersucht. Dennoch konnte bei keinem dieser Patienten die Ätiologie der Beschwerden geklärt werden. Bei keinem dieser Patienten waren objektivierbare Zeichen einer Nervenschädigung nachweisbar (Hyp- bzw. Anästhesie, Schwäche, Änderung der Nervenleitungsgeschwindigkeit, Denervierungspotentiale).

4 Experimentelle Untersuchungen zur Toxizität von Lokalanästhetika

Zunächst wurde untersucht, ob die Inaktivierung eines Nerven selber und nicht die Lokalanästhetika zu einem morphologischen Schaden des Nerven führen. Denn es wäre vorstellbar, dass die Inaktivierung von Nerven ähnlich wie die Inaktivitätsatrophie der Muskulatur zu morphologischen und funktionellen Alterationen führt.

4a) Elektrische Inaktivierung peripherer Nerven in vivo

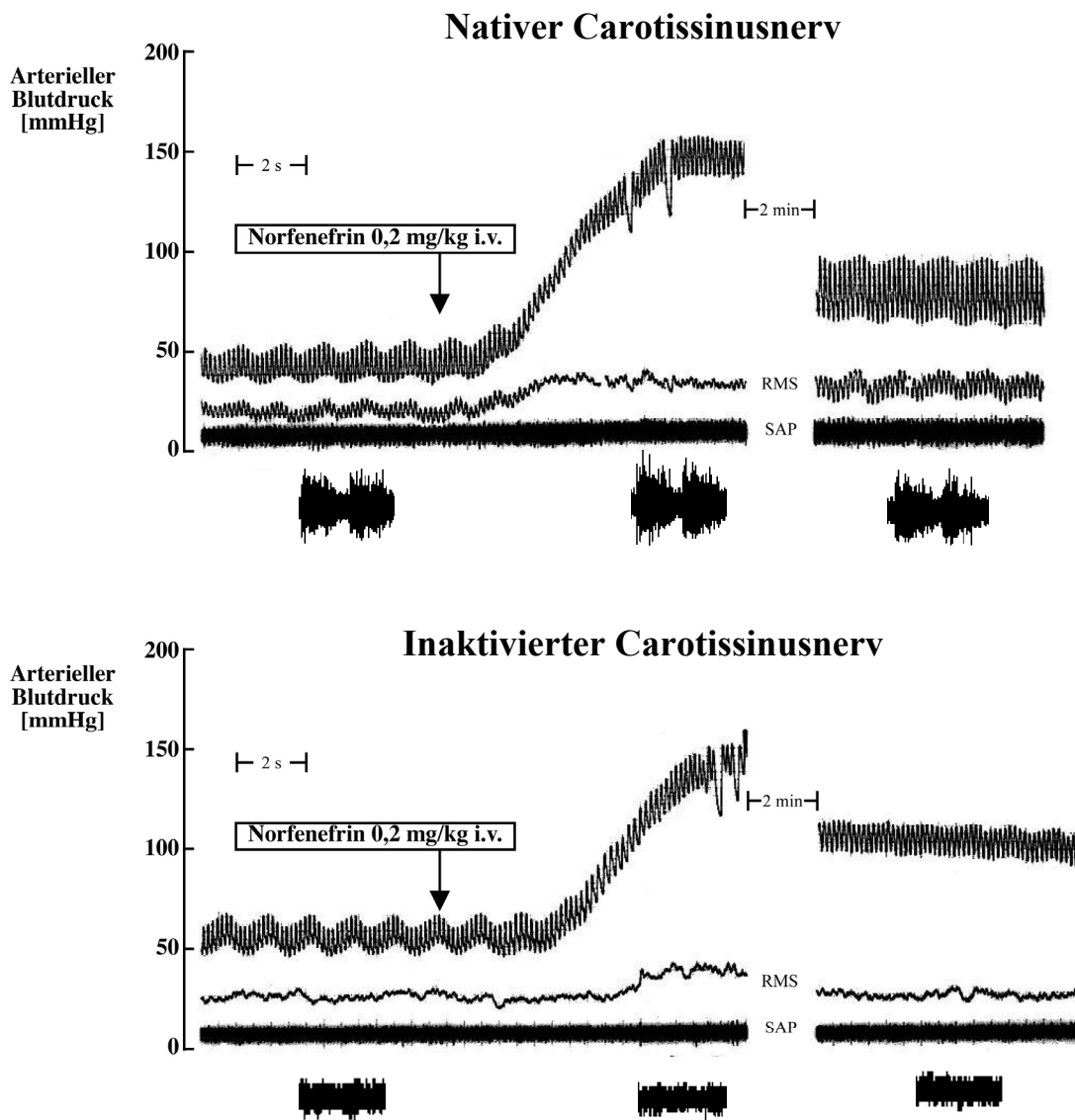
Nach Immobilisierung der Carotissinuswand war keine baroafferente Aktivität mehr nachweisbar, weder bei normalen noch bei pharmakologisch erhöhten Blutdruckwerten (Abb. 16). Hingegen kam es trotz der eingebrachten Silikon-Manschette auf der Kontrollseite nicht zu einer Veränderung des Summenaktionspotentials. Somit waren die Methoden zur elektrischen Inaktivierung der Nerven effektiv.

Bei der erneuten neurophysiologischen Untersuchung nach 5 bis 28 Tagen zeigte keiner der inaktivierten Nerven die für ihn typische pulssynchrone Aktivität. Auch bei pharmakologischer Anhebung des Blutdrucks kam es nicht zu den typischen Summenaktionspotentialen (Abb. 17 links). Im Gegensatz dazu waren nach diesen Zeiträumen die Kontrollnerven trotz Silikon-Manschette noch unverändert aktiv.

Nach Aufhebung der Immobilisation durch Entfernen der Silikon-Manschette wurde nach 5 Tagen wieder die typische pulssynchrone Aktivität abgeleitet. Nach 7 Tagen war nur bei einem von 3 Nerven eine schwache pulssynchrone Aktivität nachzuweisen. Zu jedem späteren Zeitpunkt ließ sich keine Aktivität mehr nachweisen. Typische Beispiele sind in der Abbildung 17 auf der rechten Seite dargestellt. Somit führt eine Inaktivierung der Baroafferenzen über mehr als eine Woche zum Funktionsverlust.

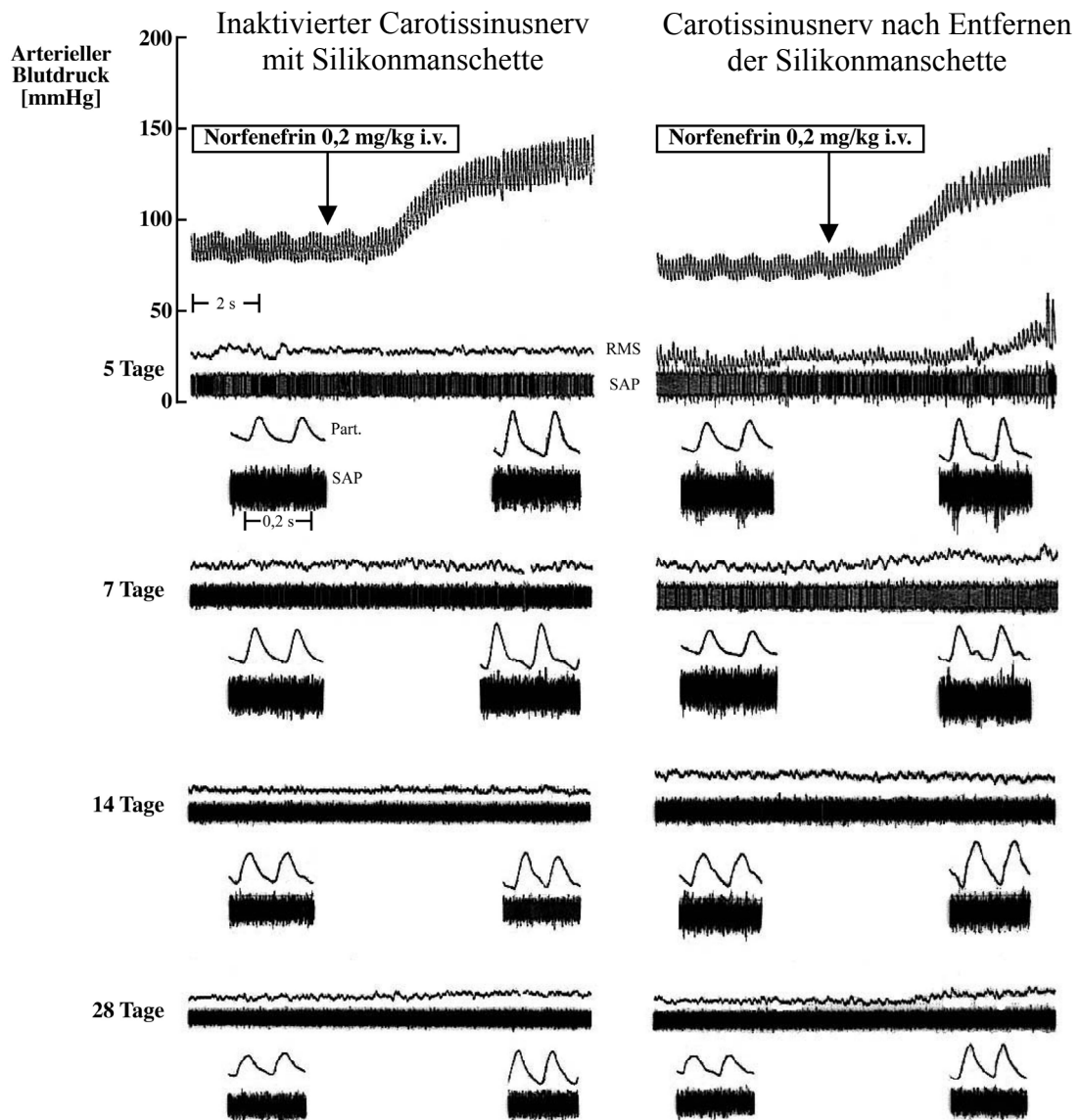
Ob die Inaktivierung ähnlich wie eine lang andauernde Leitungsblockade mit Lokalanästhetika zu einer morphologischen Schädigung der Nerven führt, wurde nun ultrastrukturell (Elektronenmikroskopie) untersucht. Die Morphometrie der elektronenmikroskopischen Nervenquerschnitte ergab keine Unterschiede hinsichtlich der Axonfläche der nicht myelinisierten und myelinisierten Fasern sowie der Myelinscheidendicke (Abb. 18).

Abbildung 16: Summenaktionspotential vor und nach Inaktivierung



Die obere Originalregistrierung zeigt den arteriellen Blutdruck (Part.) und das Summenaktionspotential (SAP) eines Carotissinusnerven nach pharmakologischer Anhebung des Blutdrucks (Norfenefrin). Das Summenaktionspotential wurde außerdem mittels der root-mean-square (RMS) Technik analysiert. Das Summenaktionspotential wurde mit einer größeren Spreizung unterhalb der Originalregistrierung noch einmal eingefügt, um die typische pulssynchrone Aktivität besser darzustellen. Die untere Originalregistrierung zeigt, dass die Immobilisierung effektiv war und die typischen pulssynchronen Entladungen der Baroaferenzen nicht mehr auftraten.

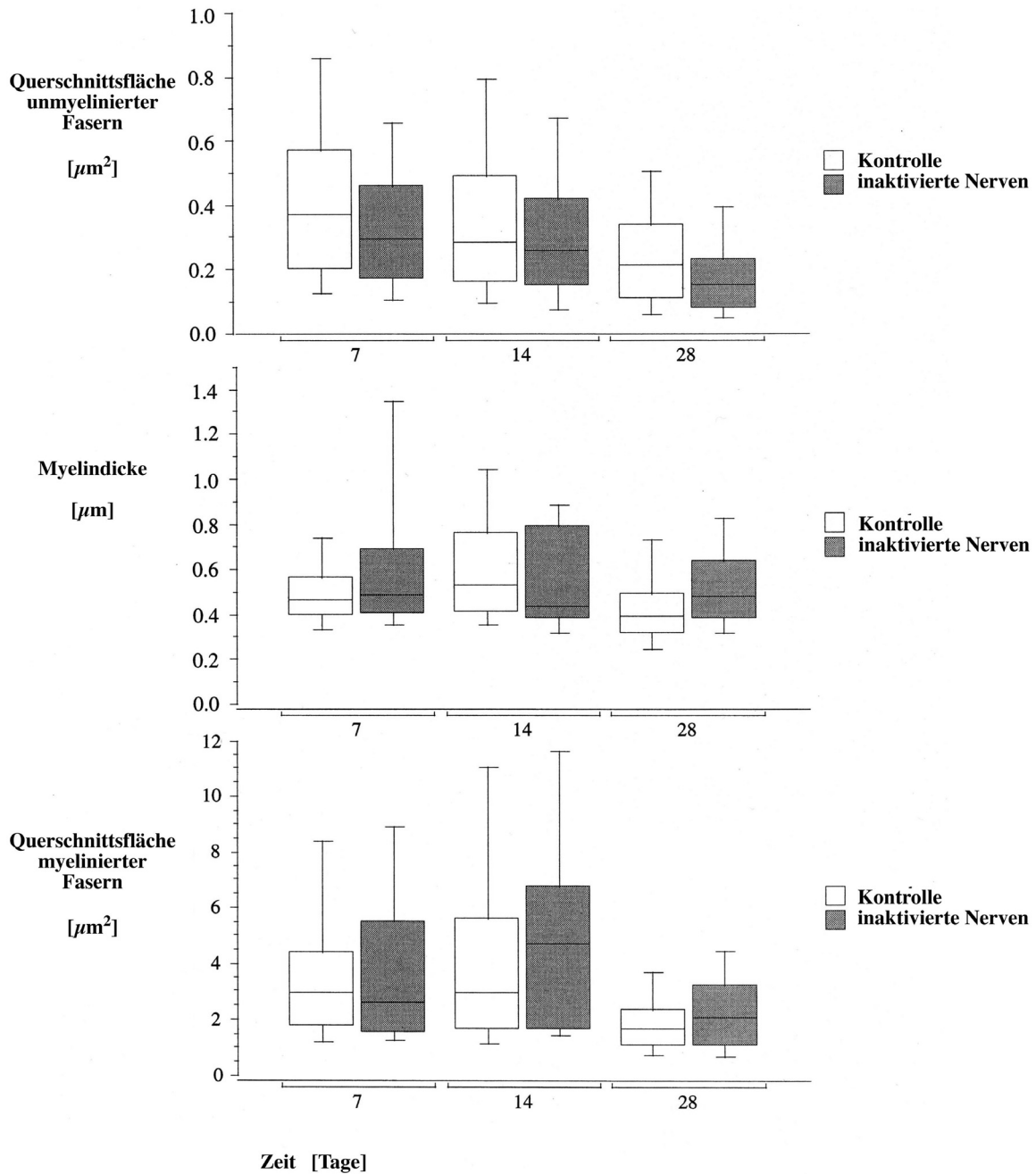
Abbildung 17: Summenaktionspotentiale nach Inaktivierung der Nerven über verschiedene Zeiträume



Originalregistrierung der Summenaktionspotentiale (SAP), der abgeleiteten Signale (RMS = root mean square-Technik) und des arteriellen Blutdrucks (Part.) unter Immobilisation der Carotissinuswand (links) und nach Entfernung der Silikon-Manschette (rechts). Verschieden lange Zeiträume der Immobilisation sind von oben nach unten dargestellt.

Unter Immobilisation konnte zu keinem Zeitpunkt baroafferente Aktivität nachgewiesen werden. Nach 5 Tagen Immobilisation kam es nach Entfernen der Silikon-Manschette wieder zu pulssynchroner Aktivität. Zu keinem späteren Zeitpunkt konnte auch nach Entfernen der Silikon-Manschette baroafferente Aktivität der Nerven nachgewiesen werden.

Abbildung 18: Morphometrie der Kontrollnerven sowie der inaktivierten Nerven



Die Ergebnisse der Morphometrie der Kontroll- und inaktivierten Nerven sind als Box Plots der 10, 25, 50, 75 und 90% Perzentilen zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Die Axonflächen der nicht-myelinisierten und myelinisierten Fasern sowie die Myelinscheidendicke unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt zwischen Kontroll- und inaktivierten Nerven.

4b) In vitro Untersuchungen zur Frage der Induktion von Apoptose durch Lidocain

Lidocain induzierte nach 24 Stunden dosisabhängig Zelltod an Jurkat-Zellen, nachgewiesen mit der Trypan-Blau-Färbung (Abb. 19). Als eines der frühesten und sensitivsten, aber nicht spezifischen Zeichen für Apoptose wurde der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials gemessen. Lidocain führt dosisabhängig zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 20).

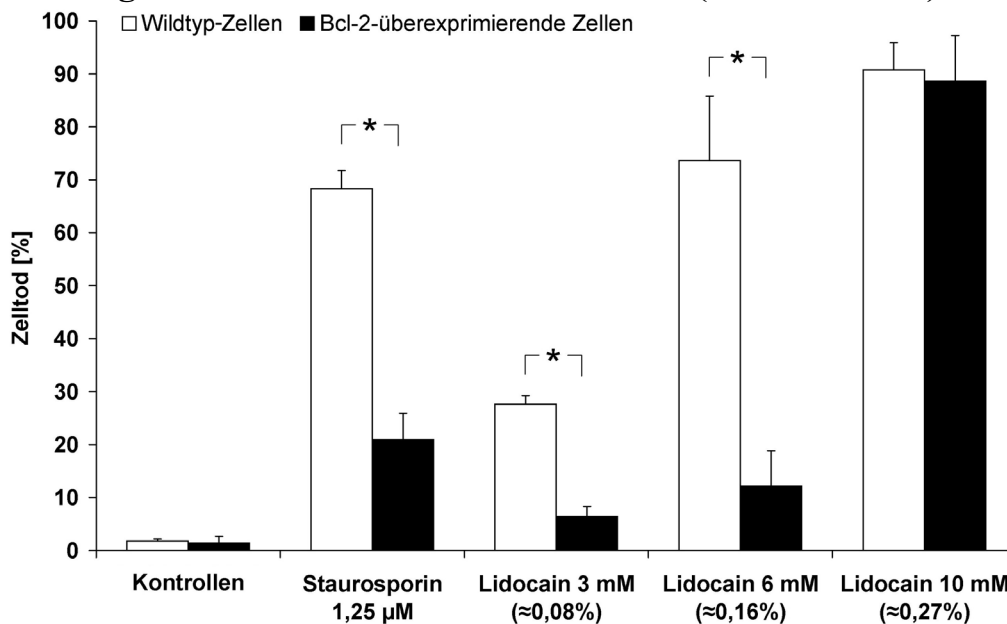
Die Aktivierung der Caspase-3 ist ein spezifisches Zeichen der Apoptose. Die Aktivierung der Caspase-3 wurde anhand eines Substrat-Assays bestimmt. Dabei kam es nach niedrigen Lidocainkonzentrationen (3 bzw. 6 mM) bei Wildtyp-Zellen zu einer ausgeprägten Aktivierung der Caspase-3 im Vergleich mit den unbehandelten Kontrollen. Hingegen konnte bei 10 mM Lidocain keine Caspase-3-Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 21). Somit kommt es bei hohen Konzentrationen von Lidocain zum Zelltod durch Nekrose und nicht durch Apoptose.

Dieses Ergebnis bestätigte sich auch im Western Blot, in dem ebenfalls nur bei 3 und 6 mM eine Aktivierung der Caspase-3 nachgewiesen wurde (Abb. 22). Außerdem konnte nur bei niedrigen Konzentrationen, nicht aber nach Exposition mit 10 mM Lidocain eine Abnahme der Procaspase-3 nachgewiesen werden (Abb. 22). Das spricht dafür, dass der Mechanismus des Zelltods bei der hohen Konzentration (10mM) nicht Apoptose sondern Nekrose ist.

Die Analyse der zytoplasmatischen Zellfraktion im Western Blot zeigte eine Freisetzung von Cytochrom C ins Zytoplasma insbesondere bei den niedrigen Konzentrationen (3 bzw. 6 mM) von Lidocain (Abb. 23).

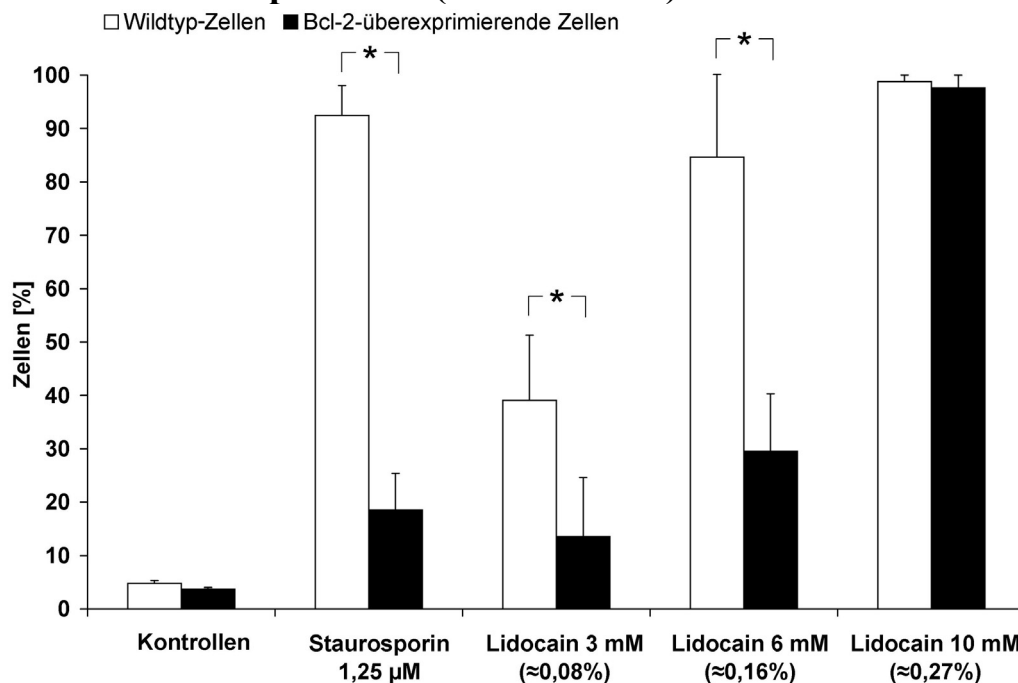
Externalisierung von Phosphatidylserin, kenntlich gemacht durch den Farbstoff Annexin V, ist ein frühes Zeichen der Apoptose. Frühapoptotische Zellen (Annexin V positiv / PI negativ) wurden bei den niedrigen Lidocainkonzentrationen nach Behandlungszeiten von 2 - 24 Stunden nachgewiesen. Der höchste Anteil frühapoptotischer Zellen trat dabei nach 12 Stunden mit 6 mM Lidocain auf. Nach 10 mM Lidocain konnte zu keinem Zeitpunkt ein erhöhter Anteil frühapoptotischer Zellen nachgewiesen werden.

Abbildung 19: Lidocain-induzierter Zelltod (Jurkat-Zellen)



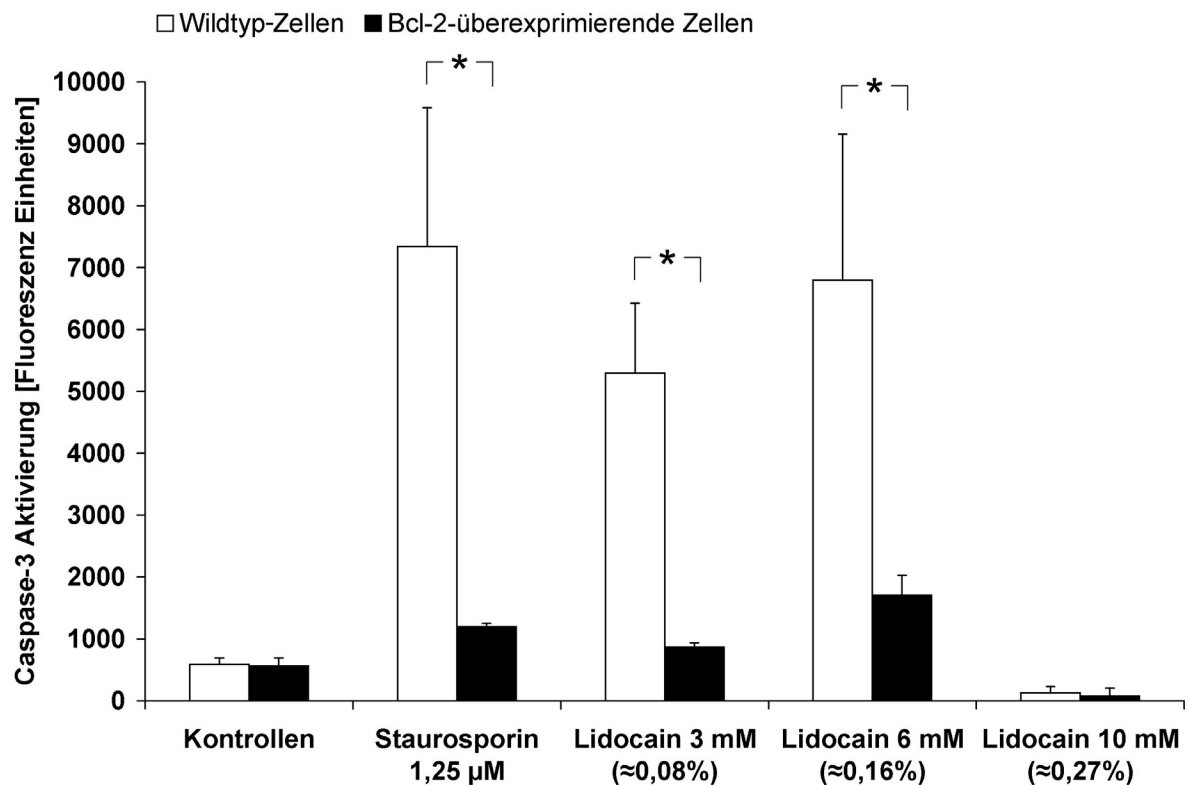
Lidocain induziert nach 24 Stunden konzentrationsabhängig Zelltod bei Wildtyp-Zellen, hingegen sind Bcl-2 überexprimierende Zellen vor 3 und 6 mM, nicht aber vor 10 mM Lidocain geschützt (Trypan-Blau Färbung). Werte als Mittelwerte und Standardabweichung. *P < 0,05.

Abbildung 20: Lidocain-induzierter Verlust des mitochondrialen Membranpotentials (Jurkat-Zellen)



Der Anteil der Zellen mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials durch Lidocain bei Wildtyp-Zellen ist konzentrationsabhängig, Bcl-2 überexprimierende Zellen sind hingegen bei niedrigen, nicht aber bei der hohen Konzentration (10 mM) geschützt. Werte als Mittelwerte und Standardabweichung. *P < 0,05.

Abbildung 21: Caspase-3-Aktivierung durch Lidocain (Jurkat-Zellen)

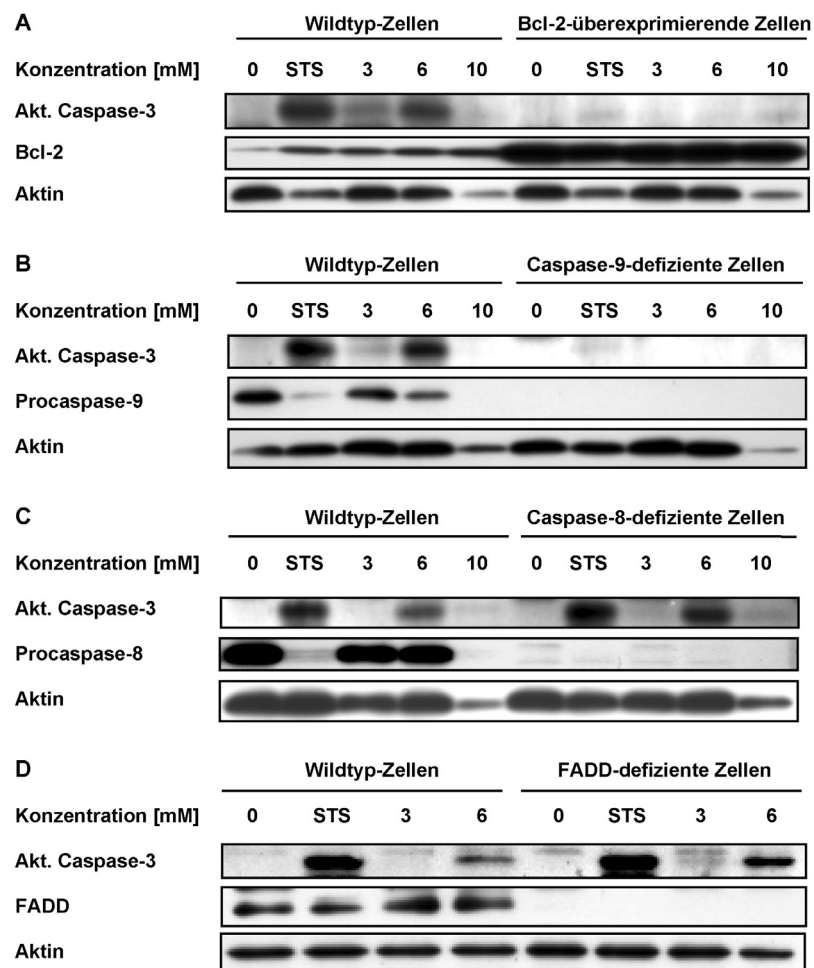


Caspase-3-Aktivierung durch 3 und 6 mM Lidocain war bei den Wildtyp-Zellen ca. zehnfach stärker ausgeprägt als bei den Bcl-2 überexprimierenden Zellen. Dagegen kam es unter 10 mM Lidocain in beiden Zelllinien nicht zu einer Aktivierung. Werte als Mittelwerte und Standardabweichung. *P < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test).

Lidocain-induzierte Apoptose wird durch Bcl-2 unterdrückt

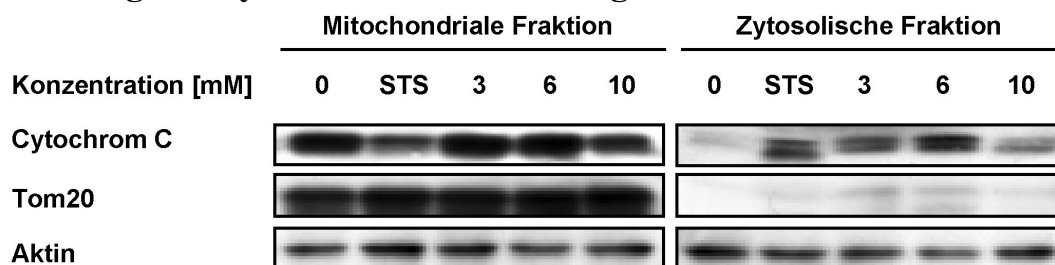
Bcl-2-Überexpression verbessert das Überleben der Zellen nach Exposition mit Lidocain in niedrigen Konzentrationen (3 und 6 mM) im Vergleich mit den Wildtyp-Zellen, nicht aber in hohen Konzentrationen (Abb. 19). Das mitochondriale Membranpotential der Bcl-2-überexprimierenden Zellen blieb bei 3 und 6 mM Lidocain erhalten, während bei 10 mM keine protektive Wirkung von Bcl-2 nachweisbar war (Abb. 20). Ebenso war die Caspase-3-Aktivierung nach niedrigen Konzentrationen Lidocain (3 und 6 mM) im Substrat-Assay (Abb. 21) und im Western Blot bei den Bcl-2 Zellen inhibiert (Abb. 22). Hingegen konnte kein Schutz durch Bcl-2-Überexpression nach Exposition mit 10 mM Lidocain mehr nachgewiesen werden (Abb. 21 & 22).

Abbildung 22: Caspase-3-Aktivierung nach Lidocain (Western Blot)



Aktiviert Caspase-3 konnte nach 12 Stunden Inkubation mit 3 bzw. 6 mM Lidocain an Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden, während keine Aktivierung bei den Bcl-2 überexprimierenden und Caspase-9-defizienten Zellen nachzuweisen war. Bei Caspase-8-defizienten und FADD-defizienten Zellen wurde Caspase-3 ähnlich wie bei den Wildtyp-Zellen aktiviert. Somit induziert Lidocain Apoptose über den mitochondrialen Signalweg und nicht über den Todesrezeptor-Signalweg.

Abbildung 23: Cytochrom C-Freisetzung durch Lidocain



Immunoblot der mitochondrialen und zytosolischen Zellfraktion nach 12 Stunden Inkubation mit Lidocain. Durch 3 und 6 mM Lidocain kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C ins Zytosol. Der Nachweis des mitochondrialen Proteins Tom20 (Translocase der äußeren mitochondrialen Membran 20) beweist die selektive Aufteilung der Zellfraktionen.

Der Anteil frühapoptotischer Zellen (Annexin V positiv / PI negativ) und der Anteil aller toten Zellen (PI negativ) nach 12 Stunden Behandlung mit niedrigen Lidocainkonzentrationen war bei den Bcl-2-überexprimierenden Zellen reduziert (Abb. 24). Bei der hohen Konzentration (10 mM) wiederum kam es nicht zu einer Überlebensverbesserung durch Bcl-2-Überexpression. Somit schützt Bcl-2-Überexpression nur vor Lidocain-induzierter Apoptose, nicht aber vor Nekrose.

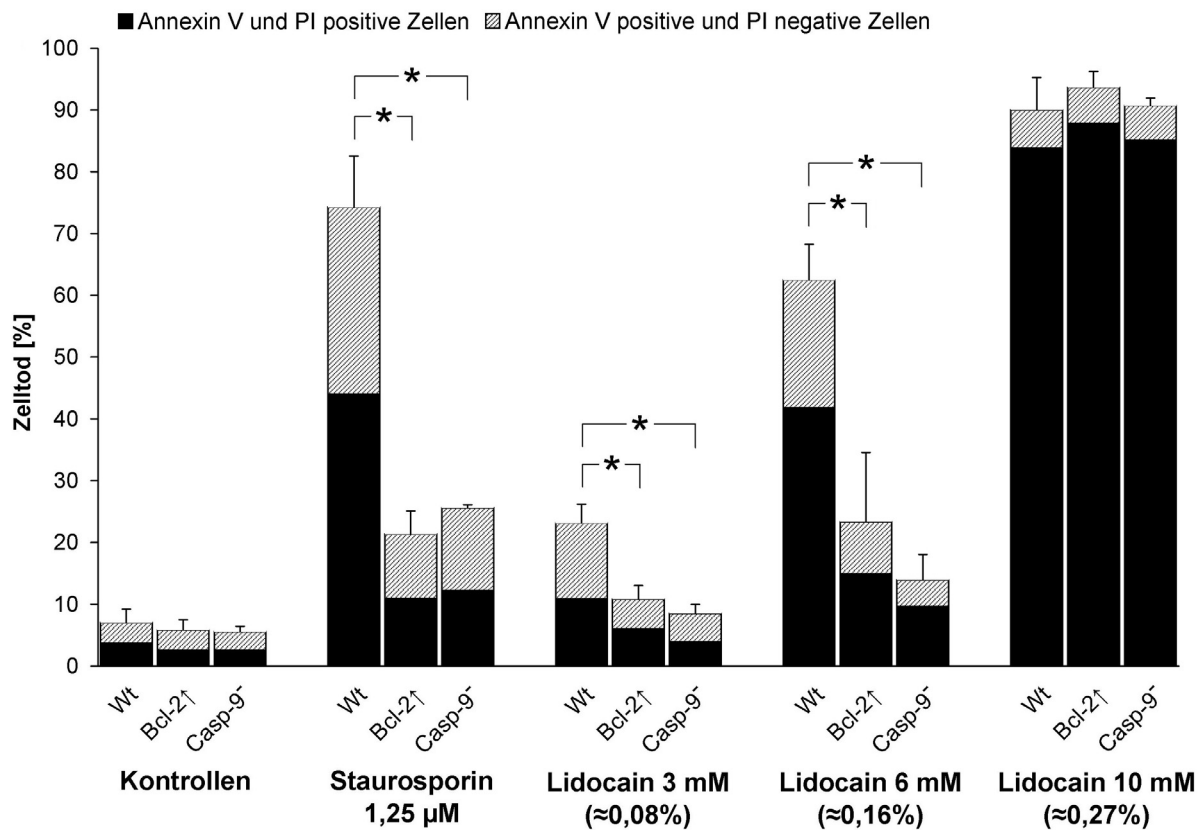
Caspase-9-defiziente Zellen sind geschützt vor Lidocain-induzierter Apoptose

Ähnlich wie Bcl-2-überexprimierenden Zellen zeigten Caspase-9-defiziente Zellen kaum eine Aktivierung von Caspase-3 nach Lidocain-Exposition im Vergleich mit Wildtyp-Zellen (Abb. 22). Der Anteil frühapoptotischer Zellen und aller toten Zellen war nach 3 bzw. 6 mM Lidocain signifikant geringer als bei den parental Zellen (Abb. 24). Das Ausmaß des Schutzes war ähnlich ausgeprägt wie bei den Bcl-2-überexprimierenden Zellen. Ähnlich wie die Bcl-2-überexprimierenden Zellen waren auch die Caspase-9-defizienten Zellen nicht vor Lidocain-induzierter Nekrose (10 mM) geschützt.

Caspase-8-defiziente und FADD-defiziente Zellen sind nicht geschützt vor Lidocain-induzierter Apoptose

Todesrezeptor-vermittelte Apoptose wird intrazellulär über die FADD-Domäne des Todesrezeptors eingeleitet und führt dann zur Aktivierung der Caspase-8 (Abb. 1, Seite 11). Defizienz dieser beiden Proteine, die für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose essentiell sind, führt zu einem kompletten Ausfall des Todesrezeptor-Signalwegs. Sowohl Caspase-8-Defizienz als auch FADD-Defizienz schützte die Zellen nicht vor der toxischen Wirkung von Lidocain (Abb. 25). Diese genetischen Veränderungen verminderten auch nicht die Caspase-3-Aktivierung, wie im Western-Blot gezeigt werden konnte (Abb. 22).

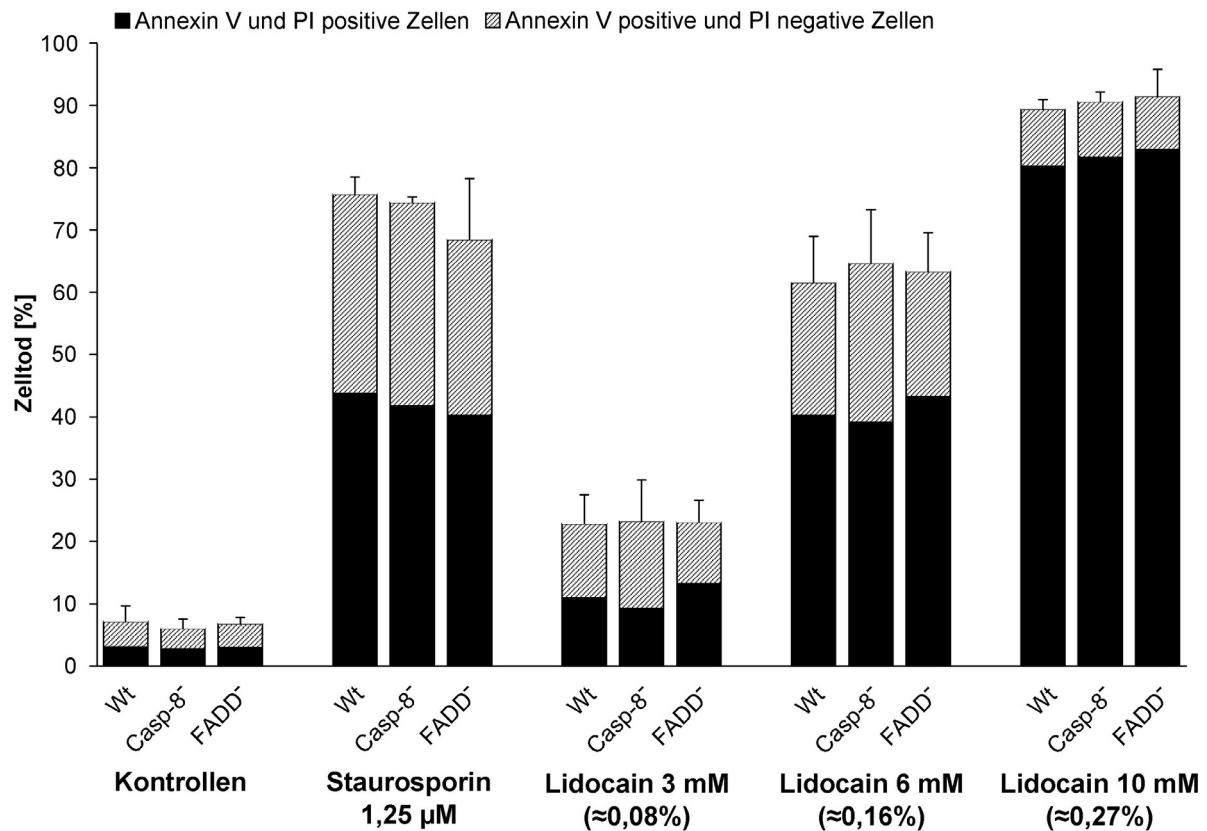
Abbildung 24: Einfluß des mitochondrialen Signalweges auf Lidocain-induzierte Apoptose



Inhibition des mitochondrialen Signalweges durch Bcl-2-Überexpression (Bcl-2↑) oder Caspase-9-Defizienz (Casp-9-) reduzierte erheblich die Toxizität von Lidocain in niedrigen Konzentrationen (3 bzw. 6 mM) im Vergleich zu Wildtyp-Zellen (Wt). Sowohl der Anteil frühapoptotischer Zellen (Annexin V-positiv und PI-negativ) als auch der Anteil aller toten Zellen (Annexin V positiv) war bei den genetisch veränderten Zellen signifikant reduziert (*P < 0,05). Hingegen konnte Bcl-2-Überexpression und Caspase-9-Defizienz die Zellen nicht vor der hohen Konzentration Lidocain (10 mM) schützen. Demnach schützen genetische Veränderungen des mitochondrialen Apoptoseweges die Zellen vor der durch Lidocain induzierten Apoptose, nicht aber vor der durch Lidocain induzierten Nekrose.

Die Werte sind als Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt. P < 0,05 (Mann-Whitney-U-Test)

Abbildung 25: Einfluß des Todesrezeptor-Signalweges auf Lidocain-induzierte Apoptose



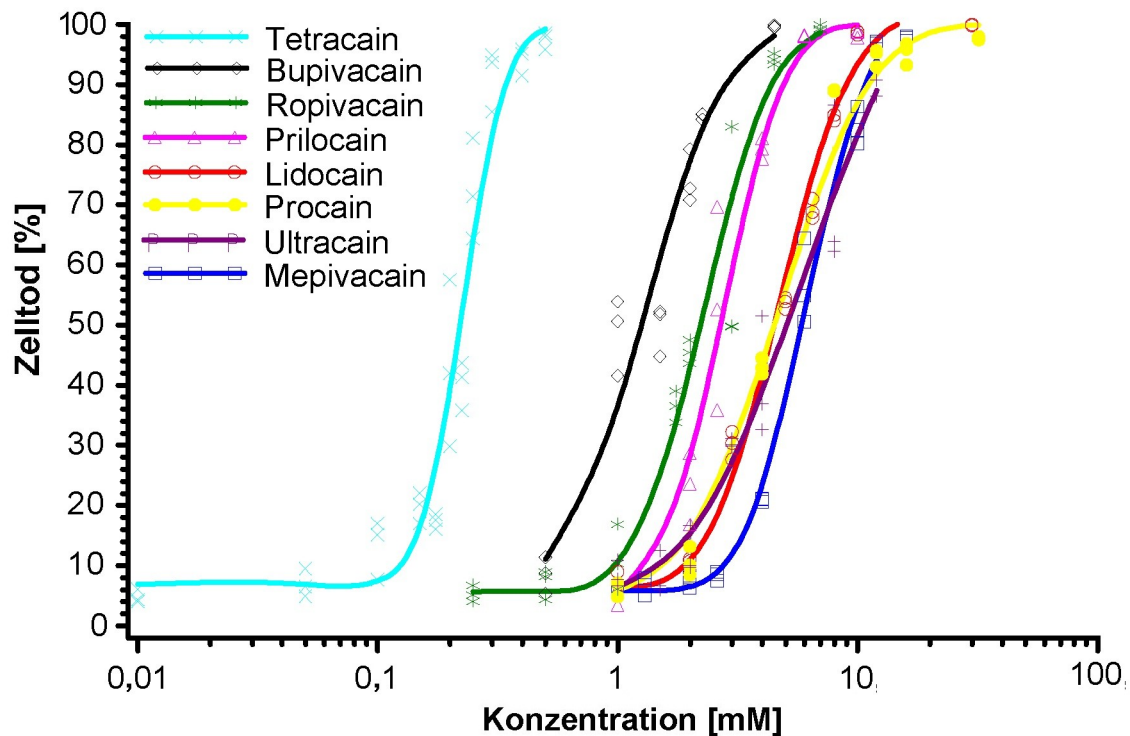
Inhibition des Todesrezeptor-Signalweges durch Caspase-8-Defizienz (Casp-8⁻) und FADD-Defizienz (FADD⁻) beeinflusst die Toxizität von Lidocain in keiner Konzentration, d.h. genetische Alterationen des Todesrezeptor-Signalweges der Apoptose beeinflussen nicht die Toxizität von Lidocain. Somit kann eine Beteiligung des Todesrezeptor-Signalweges an der Lidocain-induzierten Apoptose ausgeschlossen werden. Mittelwert und Standardabweichung.

4c) Vergleich der Toxizität verschiedener Lokalanästhetika in vitro

An Wildtyp-Jurkat-Zellen wurde die Toxizität von insgesamt 8 verschiedenen Lokalanästhetika untersucht. Dabei zeigte sich für jedes Lokalanästhetikum eine typische sigmoidale Dosis-Wirkungs-Beziehung mit z.T. deutlichen Unterschieden (Abb. 26). Der Vergleich der aus den Kurven errechneten Konzentrationen, bei denen 50% der Zellen avital waren (=LD₅₀), ergab signifikante Unterschiede zwischen fast allen Substanzen, so dass sich folgende Reihung von hoch toxisch zu weniger toxisch ergab:

Tetracain > Bupivacain > Ropivacain > Prilocain > Lidocain = Procain > Ultracain = Mepivacain

Abbildung 26: Vergleich der Toxizität verschiedener Lokalanästhetika



Dosis-Wirkungs-Kurven 8 verschiedener Lokalanästhetika an Jurkat-Zellen, gemessen mittels Annexin V/PI-Assay. Jede Markierung zeigt das Ergebnis eines einzelnen Versuchs mit einer Konzentration eines bestimmten Lokalanästhetikums. Trotz der logarithmischen Darstellung der Konzentrationen sind deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Lokalanästhetika festzustellen.

Die berechneten LD₅₀-Werte korrelierten mit der aus der Literatur bekannten Lipophilie der verschiedenen Lokalanästhetika^{73,74}. Dabei ergab sich ein signifikanter Korrelationskoeffizient $r = -0,81$ ($P < 0,05$; Spearman-Rangkorrelationstest): Je höher der Fett/Wasser-Verteilungskoeffizient eines Lokalanästhetikums ist, desto niedriger ist seine LD₅₀. Oder anders ausgedrückt: Je lipophiler das Lokalanästhetikum ist, desto toxischer ist es.

Ebenso korrelierte die LD₅₀ sehr gut mit der lokalanästhetischen Potenz der jeweiligen Substanz⁷⁵. Dabei ergab sich ein Korrelationskoeffizient $r = -0,88$ ($P < 0,01$; Spearman-Rangkorrelationstest). Das heißt, je wirksamer ein Lokalanästhetikum ist, desto toxischer ist es auch im hier vorgestellten Modell.

Lokalanästhetika werden nach der chemischen Struktur eingeteilt in Substanzen vom Estertyp oder Aminoamidtyp. Zwei (Tetracain und Procain) der untersuchten Lokalanästhetika sind Ester, während die 6 anderen Aminoamide sind. Da Tetracain die höchste Toxizität hatte, Procain aber die drittniedrigste, haben diese strukturellen Eigenschaften keinen Einfluß auf die Zytotoxizität zu haben.

Ebenso unterschieden sich auch nicht die verschiedenen Stereoisomere von Bupivacain und Ropivacain hinsichtlich ihrer Toxizität an den untersuchten Zellkulturen.

Die chemische Struktur der Lokalanästhetika scheint also deren Zytotoxizität wenig zu beeinflussen. Hingegen korreliert die Lipophilie der jeweiligen Substanz sehr gut mit deren Zytotoxizität.

4d) In vitro Untersuchungen zur Reduktion der Toxizität von Lidocain

Sauerstoffradikale induzieren Apoptose ebenfalls über den mitochondrialen Signalweg. Daher wurde der protektive Effekt von 2 Sauerstoffradikalfängern auf die Lidocain-induzierte Apoptose untersucht.

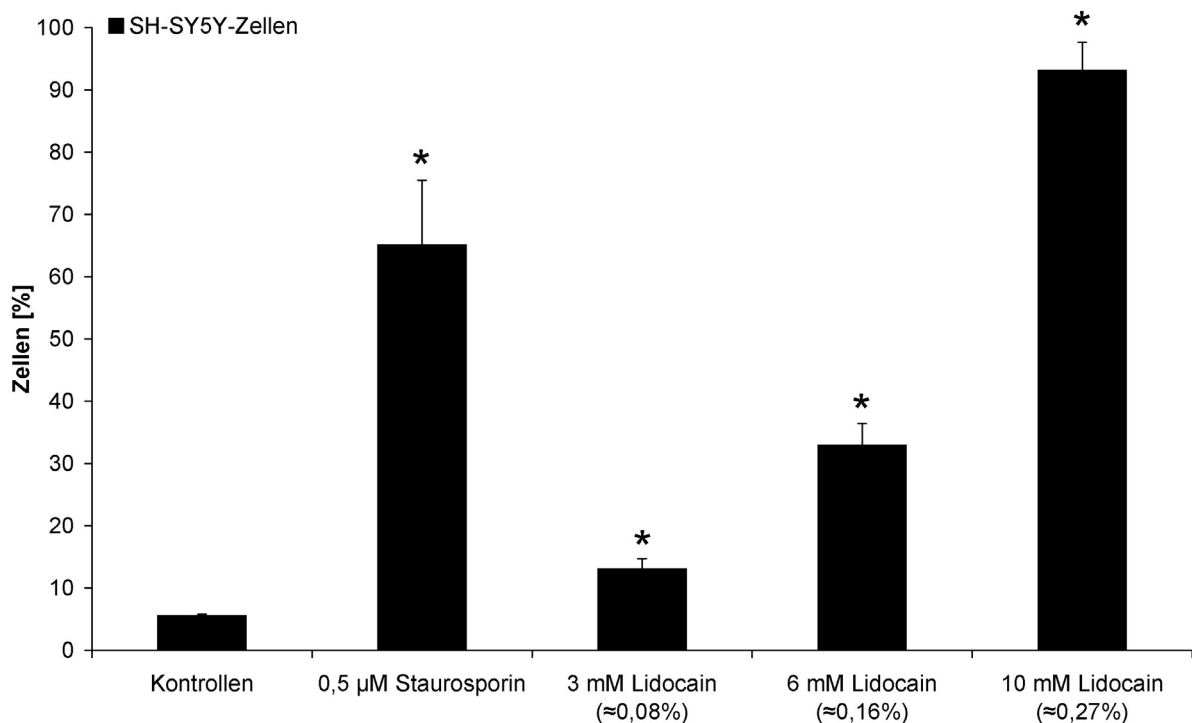
Nach Exposition der Wildtyp-Jurkat-Zellen mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) als Positivkontrolle wurde apoptotischer Zelltod beobachtet (Annexin V/PI-Assay). Nach Zugabe sowohl eines lipophilen (Tempol) als auch eines hydrophilen (N-Acetylcystein) Radikalfängers konnte die Apoptose-induzierende Wirkung von H_2O_2 unterdrückt werden.

Indes konnten beide Radikalfänger die durch Lidocain-induzierte Toxizität nicht unterdrücken. Weder in den niedrigen Apoptose-induzierenden Konzentrationen (3 und 6 mM) von Lidocain, noch in den hohen Nekrose-induzierenden Konzentrationen (10 mM) zeigte sich ein protektiver Effekt durch Radikalfänger. Somit ist Lidocain-induzierte Apoptose zwar über den mitochondrialen Signalweg, nicht aber über eine Radikalfreisetzung vermittelt.

4e) Toxizität von Lidocain an Nervenzellen *in vitro*

An Neuroblastom-Zellen führte Lidocain in gleichen Konzentrationen und im ähnlichen Ausmaß zu Apoptose bzw. Nekrose, wie zuvor an Jurkat-Zellen. Lidocain verursachte konzentrationsabhängig einen Verlust des mitochondrialen Membranpotentials als frühen Marker der Apoptose (Abb. 27). Da der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zwar ein früher und sensibler, jedoch kein spezifischer Marker der Apoptose ist, wurde ebenfalls an Neuroblastom-Zellen die Aktivierung der Caspase-3 als spezifischer und später Marker der Apoptose untersucht. Erneut bestätigten sich die an den Jurkat-Zellen erhobenen Befunde, denn Caspase-3 wurde nur bei niedrigen Lidocainkonzentrationen (3 und 6 mM), nicht aber bei der hohen Konzentration aktiviert (Abb. 28).

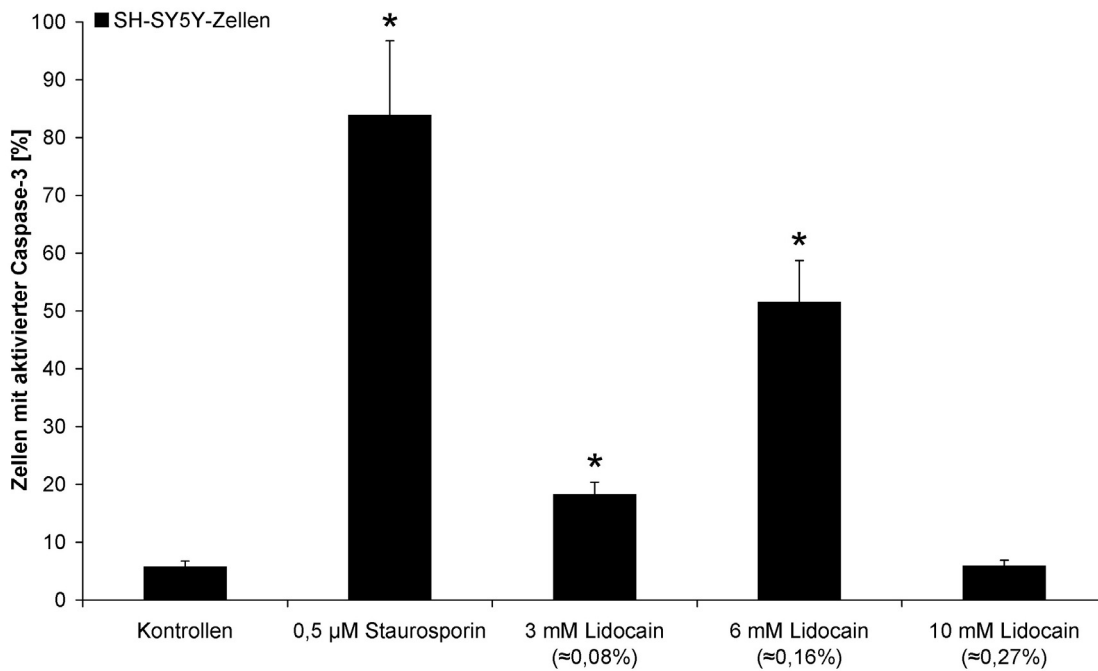
Abbildung 27: Lidocain-induzierter Verlust des mitochondrialen Membranpotentials bei Neuroblastom-Zellen



In Abhängigkeit der Konzentration führt Lidocain nach 24 Stunden zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials auch an neuronalen Zellen.

Alle Werte als Mittelwert und Standardabweichung. *P < 0,05 (Vergleich versus Kontrolle, ANOVA mit posthoc Benferroni-Test).

Abbildung 28: Caspase-3-Aktivierung an Neuroblastom-Zellen durch Lidocain



An Neuroblastom-Zellen induzierte Lidocain in niedrigen Konzentrationen (3 und 6 mM) eine signifikante Aktivierung der Caspase-3, während nach 10 mM Lidocain keine Aktivierung auftrat. Somit induziert Lidocain im selben Konzentrationsbereich wie an Jurkat-Zellen Apoptose und Nekrose.

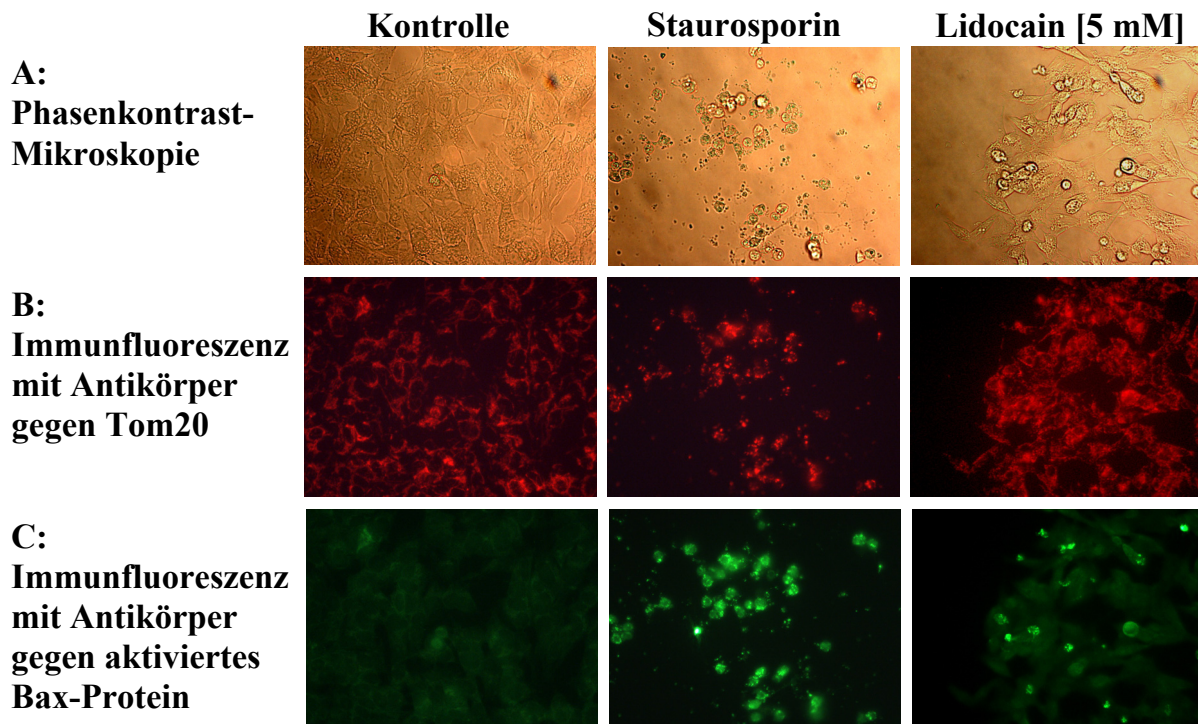
Werte als Mittelwert und Standardabweichung. * $P < 0,05$ (Vergleich mit Kontrollen, ANOVA mit posthoc Bonferroni-Test).

Immunfluoreszenz zum Nachweis von Bax-Aktivierung

Nach 8 Stunden Inkubation mit Lidocain bzw. Staurosporin (Positivkontrolle) war morphologisch eine Schädigung der neuronalen Zellen in der Phasenkontrast-Mikroskopie zu sehen (Abb. 29 A). Die Fortsätze der Zellen waren größtenteils verschwunden und die Zellgröße vermindert. Die Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Antikörpern gegen das mitochondriale Protein Tom20 markiert Mitochondrien (Abb. 29 B). In der Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Antikörpern gegen aktiviertes Bax-Protein wurden die Kontrollen nicht angefärbt. Nach Lidocain-Exposition bzw. stärker noch nach Staurosporin-Exposition wurde aktiviertes Bax-Protein im Bereich der Mitochondrien nachgewiesen (Abb. 29 B & C). Somit konnte der Einbau aktivierter Bax-Kanäle ins Mitochondrium nachgewiesen werden und die Bedeutung

des mitochondrialen Signalwegs für die Lidocain-induzierte Apoptose auch an Neuronen gezeigt werden.

Abbildung 29: Bax-Aktivierung an neuronalen Zellen



Neuroblastom-Zellen nach 8-stündiger Exposition mit Negativ- und Positivkontrolle (Staurosporin 0,5 μ M) bzw. Lidocain in verschiedenen Färbungen in der Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

Die obere Reihe (A) zeigt die Zellen nach 8 Stunden ungefärbt in der Phasenkontrast-Mikroskopie. Es sind hier bereits morphologische Veränderungen nach Staurosporin bzw. Lidocain-Exposition zu erkennen: Die Zellen haben keine Fortsätze mehr, zeigten eine verminderte Zellgröße, und verloren weitgehend ihre Adhärenz.

Die mittlere Reihe (B) zeigt die Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Antikörpern gegen das mitochondriale Protein Tom20, um Mitochondrien zu identifizieren.

Die unteren Reihe (C) zeigt die Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Antikörpern gegen aktiviertes Bax-Protein. Ähnlich wie nach Staurosporin-Exposition führt Lidocain-Exposition zum Nachweis aktivierter Bax-Proteine genau dort wo auch mitochondriales Protein nachweisbar ist. Daher ist von einer Inkorporation von Bax-Kanälen ins Mitochondrium nach Lidocain-Exposition auszugehen.

IV. Diskussion

Anhand der vorgestellten Untersuchungen lassen sich die eingangs gestellten Fragen (Seite 5) also folgendermaßen beantworten:

- *Ist ein Anstieg der Hauttemperatur ein guter Prädiktor für eine suffiziente periphere Nervenblockade?* Die Erwärmung der Haut an der blockierten Extremität ist ein guter, aber später Indikator einer suffizienten peripheren Nervenblockade. Diese Aussage gilt allerdings nur für das Innervationsgebiet an den Akren.

- *Lässt sich der Wirkungseintritt von peripheren Nervenblockaden beschleunigen und die Versagerquote nach „Single-shot“ bzw. kontinuierlichen Nervenblockaden reduzieren?* Hochfrequente elektrische Stimulation im Versorgungsgebiet des N. ulnaris beschleunigt den Wirkungseintritt einer Leitungsblockade des Nerven und steigert die Anzahl der vollständigen Blockaden. Hingegen hat eine transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS) keinen Einfluss auf den Wirkungseintritt und die Erfolgsrate einer Blockade des axillären Plexus brachialis.

Die Nutzung stimulierbarer Katheter verkürzt den Wirkungseintritt der Plexus brachialis-Blockade und verbessert das funktionelle Operationsergebnis, während die postoperative Schmerztherapie unbeeinflusst bleibt.

- *Ist bei Säuglingen nach Spinalanästhesien eine Sympathikolyse und Sedierung ähnlich wie bei Erwachsenen zu beobachten?* Eine Spinalanästhesie bei Säuglingen führt zu einer messbaren Sympathikolyse mit deutlicher Erwärmung der Beine und zu einem erheblichen Abfall des arteriellen Mitteldrucks, auch wenn keine bedrohlichen Blutdruckabfälle beobachtet wurden. Darüber hinaus geht eine Spinalanästhesie bei Säuglingen mit einer Sedierung einher.
- *Was sind die Mechanismen der Lokalanästhetika-induzierten Zyto- bzw. Neurotoxizität?* Nach funktioneller Inaktivierung eines afferenten Nerven kommt es nicht zur Degeneration

des Nerven, wie sie nach langdauernden Leitungsblockaden durch Lokalanästhetika auftreten kann. Lokalanästhetika schädigen also über einen anderen Mechanismus als eine „Inaktivitätsatrophie“ Funktion und Morphologie von Nerven.

Die Gewebetoxizität von Lidocain beruht bei niedrigen Konzentrationen auf Apoptose, wie an Jurkat- und Neuroblastom-Zellen gezeigt werden konnte. Erst bei höheren Lokalanästhetika-Konzentrationen tritt Nekrose auf. Die Lidocain-induzierte Apoptose wird über den mitochondrialen Signalweg vermittelt und nicht über den Todesrezeptor-Signalweg. Dementsprechend sind Zellen mit Alterationen des mitochondrialen Signalweges vor Apoptose, nicht aber vor Nekrose durch Lidocain geschützt. Darüber hinaus induzieren alle gängigen Lokalanästhetika Apoptose. Dabei ist die Toxizität abhängig von der Lipophilie der jeweiligen Substanz und nicht von der Substanzklasse (Aminoamid- vs. Estertyp). Verschiedene Stereoisomere eines Lokalanästhetikums sind dabei gleich toxisch, d.h. die Toxizität wird nicht über einen stereospezifischen Rezeptor vermittelt. Weiterhin ließ sich die Toxizität nicht mit Antioxidantien hemmen, womit eine Radikal-vermittelte Apoptose weitgehend ausgeschlossen werden kann.

Auch an neuronalen Zellen induzieren Lokalanästhetika konzentrationsabhängig Apoptose bzw. Nekrose. Hierbei werden aktivierte Bax-Kanäle in die äußere Mitochondrienmembran inkorporiert. Somit induziert Lidocain nicht nur an Jurkat-, sondern auch an neuronalen Zellen Apoptose über den mitochondrialen Signalweg.

Die Ergebnisse werden im Folgenden unter Berücksichtigung der aktuellen Literatur diskutiert.

1 Klinische Untersuchungen zur Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien

1a) Anstieg der Hauttemperatur als Indikator für eine beginnende periphere Nervenblockade

Zunächst wurde an Patienten die Bedeutung der Hauttemperatur als Prädiktor einer suffizienten Leitungsblockade untersucht⁸¹. Der Anstieg der Hauttemperatur lässt eine erfolgreiche

Leitungsblockade des *N. ischiadicus* mit hoher Sensitivität und Spezifität erkennen. Allerdings stieg bei Blockade des *N. ischiadicus* die Hauttemperatur erst relativ spät an. Bei Blockaden des *N. femoralis* war der Anstieg der Hauttemperatur sehr gering bzw. in proximalen Hautarealen nicht nachweisbar. Dementsprechend ist der Anstieg der Hauttemperatur bei Blockade des *N. femoralis* kein Indikator für eine suffiziente Blockade des Nerven. Im Vergleich zu Periduralanästhesien stieg die Hauttemperatur nach Nervenblockaden aber erst verzögert an. Diese langsamere Erwärmung der Haut nach der Blockade des *N. ischiadicus* ist nicht auf eine geringere Sympathikolyse zurückzuführen, da die mittlere Hauttemperatur bei beiden Regionalanästhesie-Verfahren von 28°C auf 34°C anstieg.

Die unterschiedlichen Lokalanästhetika und Dosierungen zur Nervenblockade bzw. Periduralanästhesie waren notwendig, da die Applikation der gleichen Dosis Lokalanästhetikum zu einer gefährlichen Ausdehnung der Periduralanästhesie und/oder zu einer unzureichenden peripheren Nervenblockaden geführt hätte. Daher wurde zur kombinierten Nervenblockade eine gängige und toxikologisch sinnvolle Kombination von Lokalanästhetika appliziert⁸². Die höhere Dosis Ropivacain und zusätzliche Verwendung von Prilocain bei peripheren Blockaden schränkt die Vergleichbarkeit der Gruppen ein. Allerdings sind die Anschlagzeiten von Ropivacain und Prilocain bei peripheren Nervenblockaden vergleichbar^{83,84}. Trotz geringerer Dosis traten Leitungsblockade und Temperaturanstieg nach Periduralanästhesien schneller ein⁸⁵. Somit scheint die Lokalanästhetikadosis den Wirkungseintritt weniger zu beeinflussen als unterschiedliche Regionalanästhesie-Techniken.

Ein überraschendes Ergebnis war der rasche Ausfall vor allem der Motorik nach Blockade des *N. femoralis*. Lokalanästhetika blockieren präferentiell Nervenfasern mit geringem Axondurchmesser^{32,86}, d.h. die motorische Blockade tritt häufig zuletzt auf, wie bei der Periduralanästhesie und der Blockade des *N. ischiadicus*. Die rasche Blockierung aller Qualitäten des *N. femoralis* beruht wahrscheinlich auf der anatomischen Struktur des Nerven: Er teilt sich an der Blockierungsstelle bereits in mehrere kleine Äste auf, wodurch die

Oberfläche vergrößert, die Diffusionsstrecke verkürzt und so der Wirkungseintritt der Lokalanästhetika für alle Qualitäten beschleunigt wird.

Der Anstieg der Hauttemperatur ist also ein sensibler und spezifischer, aber später Indikator für eine erfolgreiche Blockade des N. ischiadicus, nicht aber des N. femoralis. Dieses Phänomen könnte darauf beruhen, dass nur der N. ischiadicus die Haut der Akren innerviert. Denn nur in den Akren existieren arterio-venöse Anastomosen, die nach Sympathikolyse dilatieren und zu einer Erwärmung der Haut führen⁸⁷. Somit erwärmen alle Regionalanästhesien die Extremität nach dem gleichen Verteilungsmuster, solange die Akren denerviert sind. Diese Hypothese wurde in der nächsten Studie mittels Thermographie nach drei verschiedenen Regionalanästhesie-Techniken an der unteren Extremität untersucht.

1b) Ausdehnung der Sympathikolyse bei verschiedenen Regionalanästhesien

Das Muster der Hauterwärmung wurde mittels Thermographie nach Spinal-, Periduralanästhesien und Nervenblockaden untersucht⁸⁸. Aufgrund von Unterschieden in der Ausdehnung der Sympathikolyse und der Anatomie der blockierten Strukturen war ein variables Ausmaß und Muster der Sympathikolyse zu vermuten. Beispielsweise sollten aufgrund der somatotopischen Organisation peripherer Nerven zunächst die oberflächlichen sympathischen Fasern blockiert werden, die die Haut der proximalen Extremität innervieren. Bei allen Blockaden erwärmte sich jedoch zuerst und am ausgeprägtesten die distalen Extremität. Das Muster der Hauterwärmung nach Regionalanästhesien beruht dennoch auf der Verteilung der subkutanen Gefäße und arterio-venösen Anastomosen in den Akren⁸⁷ und reflektiert nicht die Innervationsgebiete der blockierten Nerven. Lediglich die Geschwindigkeit des Temperaturanstiegs ist abhängig vom Regionalanästhesie-Verfahren. Sie nimmt von der Spinalanästhesie über die Periduralanästhesie zur kombinierten peripheren Nervenblockade hin ab.

Diese Ergebnisse stellen die Lehrmeinung in Frage, dass eine Blockade des Sympathikus überall und immer anhand der Erwärmung der Haut zu identifizieren ist¹⁸. Denn an den

proximalen Extremitäten konnte trotz Sympathikolyse kein Anstieg der Hauttemperatur nachgewiesen werden. Weiterhin korrelierte die Ausdehnung der Sympathikolyse nicht mit der Ausdehnung oder dem Ausmaß der Hauterwärmung. Unabhängig von dem Regionalanästhesie-Verfahren sollte an der unteren Extremität die Temperatur deshalb an der Großzehe gemessen werden, um den Beginn der Blockade zu überwachen. Die dort beobachteten Veränderungen traten am schnellsten und deutlichsten auf.

Mit Hilfe der Thermographie konnte auch die Frage beantwortet werden, warum es zu einem initialen Abfall der Hauttemperatur nach Regionalanästhesie kommt. Dieses Phänomen wurde bereits von einer Reihe von Autoren nach Spinalanästhesien, peripheren Nervenblockaden und Sympathektomien beobachtet^{14,89,90}. Nach bisheriger Lehrmeinung wurde diese Beobachtung mit einer Sympathikuserregung durch den Schmerzreiz bei Anlage der Blockade erklärt⁸⁹. Im Gegensatz dazu wird in den eigenen Untersuchungen diese Abkühlung durch kaltes Blut in den oberflächlichen Hautvenen verursacht. In dieser Phase steigt der Blutfluss in den kalten Akren an⁹¹, das Blut wird dort gekühlt und fließt über oberflächliche Venen ab, was wiederum zu einer Abkühlung des Fußrückens führt. Die bisherige Lehrmeinung bedarf auch insofern einer Korrektur, als wir dieses Phänomen am häufigsten nach Spinalanästhesien beobachteten und keiner der Patienten über Schmerzen während der intrathekalen Injektion klagte.

Die Regionalanästhesie-Verfahren wurden nicht randomisiert, sondern in Abhängigkeit vom geplanten Eingriff gewählt. Die verschiedenen Gruppen unterschieden sich jedoch nicht hinsichtlich ihrer demographischen Daten, und die Erwärmung der Beine war bei allen gleich. Falls diese Ergebnisse auf Patienten mit peripherer Verschlusskrankheit übertragbar sind, ist eine Sympathikolyse durch eine periphere Nervenblockade genauso effektiv wie durch eine Periduralanästhesie. Außerdem könnte bei diesen häufig antikoagulierten Patienten das Risiko von periduralen Hämatomen umgangen werden.

Somit hängt das Muster des Hauttemperaturanstiegs nach Regionalanästhesien nicht von dem gewählten Verfahren ab, sondern ist uniform distal betont bzw. auf den Fuß beschränkt. Das Regionalanästhesie-Verfahren beeinflusst lediglich die Geschwindigkeit des Temperaturanstiegs, der am schnellsten nach Spinalanästhesie und am langsamsten nach peripheren Nervenblockaden eintritt.

1c) Sympathikolyse durch Spinalanästhesie bei Säuglingen

Das Risiko einer Allgemeinanästhesie ist bei Kindern unter einem Jahr etwa 10-fach erhöht^{92,93}. So kommt es nach Allgemeinanästhesien bei Frühgeborenen und ehemaligen Frühgeborenen gehäuft zu lebensbedrohlichen Apnoen¹⁹. Hingegen wurden nach alleiniger Spinalanästhesie bei diesen Patienten keine Apnoen beobachtet^{20,21}. Daher führten wir die technisch schwierigen Spinalanästhesien bei Säuglingen (Mittleres Gewicht: 4 kg) durch, obwohl Regionalanästhesien bei Kindern unter einem Jahr an weniger als einem Prozent der deutschen Kliniken durchgeführt werden²².

Nach bisheriger Lehrmeinung sind hämodynamische Reaktionen nach Spinalanästhesien bei Säuglingen nicht zu erwarten^{94,95}, was mit der Unreife des sympathischen Nervensystems erklärt wurde²⁶. Deshalb untersuchten wir in dieser Altersgruppe die Auswirkungen einer Sympathikolyse auf Hauttemperatur und Kreislauf.

Bei Säuglingen stieg nach Spinalanästhesien wie bei Erwachsenen^{14,17,88} die Hauttemperatur der Füße binnen 10 Minuten deutlich an⁹⁶. Die Hauttemperatur der Füße diene als Indikator für eine Sympathikolyse der Beine, während die Hauttemperatur am Thorax als Referenz diene, da diese durch neuroaxiale Blockaden unbeeinflusst bleibt¹⁵. Eine Sedierung der Säuglinge nach Spinalanästhesie tritt nach 10 bis 20 Minuten auf^{29,97}. Zu diesem Zeitpunkt war aber die Hauttemperatur der Füße schon um fast 2°C angestiegen. Damit tritt der sedierende Effekt der Spinalanästhesie zeitlich nach dem Anstieg der Hauttemperatur auf. Der Anstieg der Hauttemperatur kann somit nicht zentral bedingt sein.

Der Temperaturanstieg der Beine beruht also auf einer Sympathikolyse durch die Spinalanästhesie, womit die These widerlegt ist, die hämodynamische Stabilität von Säuglingen nach Spinalanästhesien beruhe auf einer Unreife des sympathischen Nervensystems²⁶.

Bei allen Säuglingen fiel der arterielle Blutdruck nach Spinalanästhesie ab. Während ältere Untersuchungen keinen derartigen Änderungen der Hämodynamik fanden^{26,27,98,99}, bestätigten neuere Studien die vorliegenden Ergebnisse^{28,100}. Diese Unterschiede könnten auf verbesserte Methoden der nicht-invasiven Blutdruckmessung zurückzuführen sein. Aber auch andere methodische Gründe könnten für die unterschiedlichen Ergebnisse verantwortlich sein. Möglicherweise wurde die relative Blutdruckstabilität durch eine schmerzhaft Austestung der sensiblen Ausdehnung vorgetäuscht^{26,27,98,99}. Aus diesem Grunde wurde in unseren Untersuchungen bewusst auf eine Austestung der Höhe der Spinalanästhesie verzichtet.

Der *relative* Abfall des Blutdrucks war tendenziell ausgeprägter als der bei Erwachsenen beobachtete²⁴. Trotzdem lag der Blutdruck auch nach Anlage der Spinalanästhesie im Normalbereich für diese Altersgruppe, dagegen war er vor Anlage im hoch-normalen Bereich. Somit bleibt die klinische Bedeutung des Blutdruckabfalls unklar.

Somit konnte eine deutliche Sympathikolyse nach Spinalanästhesien bei Säuglingen nachgewiesen werden. Dabei waren Ausmaß und Geschwindigkeit der Hauttemperaturänderungen bzw. des Blutdruckabfalls mit denen Erwachsener vergleichbar^{24,88}.

2 Sedierung durch Spinalanästhesie bei Säuglingen

Eine Spinalanästhesie wirkte *per se* sedierend auf Säuglingen, denn ohne weitere Sedativa schliefen die Kinder ein. Verifiziert wurde diese Beobachtung anhand abgeleiteter Größen des Elektroencephalogramms⁹⁷. So nahm der bispektralen Index (BIS) nach 15 Minuten und die spektrale Eckfrequenz bereits 5 Minuten nach Anlage der Spinalanästhesie signifikant ab. Prinzipiell sind zwei Mechanismen des sedierenden Effektes der Spinalanästhesie denkbar:

Zu einem könnten systemische Lokalanästhetika-Spiegel zu einer Sedierung führen. Dies kann aber ausgeschlossen werden, da nach Spinalanästhesien sehr geringe, systemisch nicht wirksame Lokalanästhetikakonzentrationen beobachtet werden¹⁰¹.

Zum anderen blockiert die Spinalanästhesie einen großen Teil der Afferenzen zum Zentralnervensystem. Dadurch wird das aufsteigenden retikuläre Aktivierungssystem¹⁰² im Hirnstamm weniger erregt und der Wachheitsgrad herabgesetzt¹⁰³. Somit ist die Sedierung nach Spinalanästhesie durch eine Deafferenzierung und nicht durch systemische Wirkungen der Lokalanästhetika vermittelt. Wir konnten zeigen, dass dieser Effekt bei Kindern vor der 60. postkonzeptionellen Woche besonders ausgeprägt ist, da der BIS in Einzelfällen bis auf 32 sank, was bei einer Allgemeinanästhesie einer sehr tiefen Sedierung entspricht³¹. Trotz dieser tiefen Sedierung kam es bei keinem der insgesamt 35 untersuchten Säuglingen postoperativ zu einer Apnoe. Das ist sicherlich auf den konsequenten Verzicht der Gabe zusätzlicher Sedativa zurückzuführen, denn andere Untersucher, die zusätzlich zur Spinalanästhesie Sedativa verabreichten, beobachteten lebensbedrohliche Apnoen postoperativ^{20,21}.

Aufgrund des deutlichen Sedierungseffektes einer Spinalanästhesie sollte bei Säuglingen auf die zusätzliche Gabe sedierender Pharmaka verzichtet werden.

3 Untersuchungen zur Verbesserung der Regionalanästhesie durch elektrische Stimulation

3a) Beeinflussung der Anschlagzeit und Ausdehnung von Nervenblockaden durch elektrische Reizung der Haut und transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS)

Nicht schmerzhaft, elektrische Stimulation mit hohen Frequenzen im Versorgungsgebiet des N. ulnaris beschleunigt den Beginn und die Ausdehnung einer Leitungsblockade des Nerven¹⁰⁴.

Zwar werden Ulnarisblockaden am Handgelenk im klinischen Alltag selten durchgeführt, aber diese Leitungsblockade eignet sich besonders, den Einfluss einer hochfrequenten elektrischen Stimulation auf den Wirkungseintritt zu untersuchen, da mit einer relativ

großflächigen Elektrode nahezu das gesamte Versorgungsgebiet des Nerven stimuliert werden kann.

Der beschleunigte Wirkungseintritt ist wahrscheinlich auf den aus neurophysiologischen Experimenten bekannten, frequenzabhängigen (oder phasischen) Block der Lokalanästhetika zurückzuführen^{32,33}. Denn zum einen wurde die Wirkung der Lokalanästhetika im gleichen Frequenzbereich wie am isolierten Nerven verstärkt, zum anderen trat dieser Effekt selektiv an den stimulierten sensiblen Fasern auf, nicht aber an den nicht stimulierten Sympathikusfasern, erkennbar an der nicht beschleunigten Sympathikolyse.

Allerdings ist am *isolierten* Nerven die frequenzabhängige Wirkung der Lokalanästhetika innerhalb von Sekunden reversibel³³. In der vorliegenden Studie war eine derartige Beobachtung nicht möglich, da kontinuierlich bis zum Ende der Untersuchung stimuliert wurde, um jede Änderung der Aktionspotentialfrequenz zu vermeiden. Daher konnte nicht getestet werden, ob die beobachteten Effekte zumindest teilweise reversibel waren. Dagegen hielt die Ausdehnung der Blockade über das Ende der Stimulation hinaus an. Beim Vergleich der vorgestellten Ergebnisse mit den Experimenten am isolierten Nerven muss aber auch beachtet werden, dass am isolierten Nerven konstante Konzentrationen unterhalb der minimalen Blockierungskonzentration eingesetzt werden, während die klinisch eingesetzten Konzentration höher liegen. Daher ist es fraglich, ob die am isolierten Nerven beobachtete Reversibilität einer frequenzabhängigen Blockade unter den Bedingungen einer Leitungsblockade am Menschen überhaupt nachzuweisen ist.

In der Untersuchung an Patienten wurde anschließend versucht, das Prinzip der frequenzabhängigen Leitungsblockade zu nutzen, um den Wirkungseintritt der klinisch häufig verwendeten Blockade des axillären Plexus brachialis zu beschleunigen¹⁰⁵.

Im Gegensatz zur Leitungsblockade des N. ulnaris kann das Versorgungsgebiet des Plexus brachialis wegen gefährlich hoher Stromstärken nicht mit einer großflächigen Elektrode stimuliert werden. Die transkutane elektrische Nervenstimulation (TENS) ist eine klinisch

häufig genutzte und sichere Methode zur hochfrequenten Stimulation peripherer Nerven¹⁰⁶. Durch die Applikation der Elektroden direkt über dem oberflächlichen Verlauf wurde der jeweilige Nerv stimuliert. Dabei werden nur die oberflächlichen Fasern des Nerven stimuliert¹⁰⁶. Somit wurde also nur ein Anteil eines Nerven des von insgesamt 4 Nerven gebildeten axillären Plexus brachialis stimuliert. Im Gegensatz dazu wurde bei der Untersuchung am N. ulnaris ein großer Teil des Versorgungsgebiets des Nervens gereizt. Durch diese vergleichsweise weniger effektive Stimulation bei den Blockaden des Plexus axillaris war ein Effekt der hochfrequenten Stimulation vermutlich nicht mehr nachweisbar.

Inzwischen konnte auch bei neuroaxialen Blockaden nachgewiesen werden, dass TENS auch dort keinen Einfluß auf die Blockade oder Analgesie hat¹⁰⁷.

Somit ist zwar eine hochfrequente elektrische Stimulation prinzipiell geeignet, den Wirkungseintritt einer Leitungsblockade zu beschleunigen, aber dieses Prinzip kann nicht bei klinisch häufig durchgeführten Blockaden ganzer Extremitäten angewendet werden.

3b) Verbesserung des funktionellen Ergebnisses von Schulteroperationen durch stimulierbare Katheter zur postoperativen Analgesie

Die Verwendung stimulierbarer Katheter verkürzte den Wirkungseintritt der motorischen Blockade und verbesserte langfristig die Funktion der Schulter. Dagegen konnte die postoperative Analgesie nicht weiter verbessert werden.

In der vorliegenden Studie wurde erstmals der Einsatz stimulierbarer Katheter an der oberen Extremität untersucht. Die Verwendung stimulierbarer Katheter an der unteren Extremität in 3 randomisierten, doppelblinden klinischen Studien führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. An Patienten, die sich einem komplexen Knieeingriff unterzogen, veränderte die Verwendung stimulierbarer Katheter zur kontinuierlichen postoperativen Blockade des N. femoralis weder Wirkungseintritt noch postoperative Schmerzen und Schmerzmittelbedarf¹⁰⁸. Der fehlende Nachweis einer Verkürzung des Wirkungseintritts bei diesen Blockaden ist vermutlich auf den ohnehin schnellen Wirkungseintritt bei Blockaden des N. femoralis zurückzuführen.

ren⁸¹. In einer anderen Untersuchung verkürzte dagegen die Verwendung stimulierbarer Katheter zur Blockade des N. ischiadicus hingegen den Wirkungseintritt und reduzierte den postoperativen Lokalanästhetikabedarf, verbesserte aber nicht die Analgesiequalität¹⁰⁹. Lediglich in einer Studie konnten postoperative Schmerzen durch den Einsatz stimulierbarer Katheter bei Blockade des N. ischiadicus reduziert werden¹¹⁰. Dabei erhielten die Patienten nach Fußoperationen im Vergleich zu den von uns (8 ml/h 0,2% Ropivacain) und anderen^{108,109} applizierten Dosen nur geringe Lokalanästhetikamengen (3 ml/h Levobupivacain 0,125%)¹¹⁰. Deswegen konnte möglicherweise nur in dieser Studie mit einer geringen Lokalanästhetika-Dosis ein Effekt auf die postoperative Schmerzintensität nachgewiesen werden. Die in der eigenen Studie applizierten Dosen sind nach Eingriffen an der Schulter vorteilhaft^{111,112}, was sich in sehr niedrigen Schmerzscores widerspiegelte.

Als wichtigstes Ergebnis der Untersuchung verbesserte der Einsatz stimulierbare Katheter die Schulterfunktion 6 Wochen postoperativ erheblich. Der *objektive* Constant-Murley-Score wurde nicht nur signifikant, sondern auch klinisch relevant verbessert^{63,64,113}. Denn die Verbesserung eines funktionellen Schulterscores um 30 Punkte bedeutet nicht nur einen erheblich verbesserten Bewegungsumfang, sondern korreliert auch sehr gut mit der Arbeitsfähigkeit der Patienten^{114,115}.

Die Verbesserung der Schulterfunktion überrascht, da die postoperativen Schmerzscores gleich waren. Jedoch wurden die Schmerzscores nur in Ruhe und unter 10° Abduktion erhoben. Möglicherweise hatten die Patienten mit Stimulationskatheter aber bei der postoperativen Physiotherapie weniger Schmerzen, wodurch eine bessere Mobilisation und Funktion der Schulter erreicht wurde.

Der Vorteil von Regionalanästhesie-Verfahren für den postoperativen Heilungsprozess konnte in einer Reihe von Arbeiten nachgewiesen werden^{3,4,116,117}. Diese Studien verglichen die Wirkung einer Regionalanästhesie mit den Effekten einer systemischen Analgetikagabe. Vergleiche verschiedener Regionalanästhesie-Verfahren im Hinblick auf das Operationser-

gebnis fanden keine Unterschiede^{3,4,116,117}. In der vorliegenden Studie konnte jedoch erstmals durch eine Modifikation der Regionalanästhesie-Technik das funktionelle Operationsergebnis verbessert werden.

Auf den ersten Blick erschreckend ist die hohe Rate (10%) von Patienten mit lang anhaltenden Beschwerden nach der Operation unter Regionalanästhesie. Auch andere Autoren gaben nach Schulteroperationen mit interskalenärer Blockade ähnlich hohe Komplikationsraten an^{118,119}. Die möglichen Ursachen einer solchen Schädigung sind mannigfaltig (intraoperative Lagerung, Zug am Arm, Operationstechnik)¹²⁰. Außerdem sind auch idiopathische Neuritiden des Plexus brachialis nach Schulteroperation mit und ohne interskalenären Katheter beschrieben worden¹²¹⁻¹²³.

Die Verwendung stimulierbarer Katheter, die eine Positionierung des Katheters in unmittelbarer Nähe des Nerven ermöglichen, führte zur keiner weiteren Steigerung der ohnehin sehr guten Analgesiequalität, dagegen aber zu einer deutlich verbesserten postoperativen Schulterfunktion.

4 Experimentelle Untersuchungen zur Toxizität von Lokalanästhetika

4a) Elektrische Inaktivierung peripherer Nerven in vivo

Der elektrischen Inaktivierung des Carotissinusnerven folgte nach einer Woche sein Funktionsverlust. Dennoch führte die Inaktivierung auch über einen Zeitraum von 4 Wochen nicht zur Degeneration des Nerven¹²⁴.

Durch die Immobilisation des Carotissinus konnte der Carotissinusnerv über Tage und Wochen elektrisch inaktiviert werden. Nach Aufheben der Immobilisation wurden nach 5 Tagen, aber zu keinem späteren Zeitpunkt, wieder typische pulssynchrone Entladungen beobachtet. Allerdings ging dieser Verlust der Summenaktionspotentiale, der vermutlich auf einem Funktionsverlust der Barorezeptoren beruht, nicht mit einer Degeneration des Nerven einher. Ein ähnliches Phänomen konnte bereits bei Chemoafferenzen nachgewiesen werden.

Diese werden oberhalb eines Sauerstoffpartialdrucks von 200 mmHg nicht mehr erregt. Chemoafferenzen von Tieren, die über eine Woche reinem Sauerstoff ausgesetzt waren, zeigten keine typischen Entladungen mehr auf eine hypoxische Stimulation¹²⁵. Auch bei dieser Untersuchung wurden lichtmikroskopisch keine morphologischen Veränderungen der Carotissinusnerven beobachtet. Daher scheint eine Inaktivierung afferenter Neurone einen Funktionsverlust der Rezeptoren zu induzieren, nicht aber eine Degeneration der Axone bzw. Nerven.

In einer Reihe von Experimenten wurde bereits versucht, die Auswirkungen der elektrischen Aktivität eines Nerven auf dessen Morphologie zu analysieren¹²⁶⁻¹³⁰. Zumeist wurde dabei eine Extremität über Tage und Wochen immobilisiert und anschließend der Einfluss dieser Immobilisation auf die Morphologie der Nerven untersucht. Nach der Immobilisation einer Extremität entladen sich efferente und afferente Nerven aber weiterhin. Im Gegensatz dazu war in der vorliegenden Untersuchung die Inaktivierung der baroafferenten Fasern nach neurophysiologischen Kriterien komplett. Trotz dieser kompletten elektrischen Inaktivierung der baroafferenten Fasern traten jedoch über Wochen keine Degenerationen der Nerven auf.

Der funktionellen elektrischen Inaktivierung eines Nerven stehen die Folgen einer langfristigen pharmakologischen Inaktivierung gegenüber. Eine lang anhaltende Blockade von Nerven mit Lokalanästhetika führte zu erheblichen Degenerationen der Nerven^{40,131-133}. Innerhalb von 48 Stunden treten in klinisch üblichen Konzentrationen endoneurale Ödeme bzw. Demyelinisierungen auf, in höheren Konzentrationen oder nach längeren Einwirkzeiten auch Faserdegenerationen^{40,131-133}. Auch am N. depressor, einem ebenfalls baroafferenten Nerven mit ähnlichem Faserspektrum wie der Carotissinusnerv, induzieren Lokalanästhetika solche Degenerationen^{41,134}.

Neben Lokalanästhetika vermögen auch andere Natriumkanal-Blocker die Erregungsleitung eines Nerven zu blockieren. So ist Tetrodotoxin (das Gift des Kugelfisches) ein hochpotenter Blocker des spannungsabhängigen Natriumkanals. Tetrodotoxin setzt allerdings außen am

Natriumkanal an, Lokalanästhetika hingegen innen. Auch lang anhaltende Leitungsblockaden mit Tetrodotoxin führen nicht zu morphologischen Veränderungen der Nerven^{42,45}. Somit geht eine pharmakologische Inaktivierung eines Nerven nicht zwangsläufig mit einer Degeneration einher.

Eine elektrische Inaktivierung von Baroafferenzen führt also zu einem Funktionsverlust der Rezeptoren, nicht aber zur Degeneration der Nerven. Die Degenerationen, die nach lang anhaltenden Leitungsblockaden durch Lokalanästhetika beobachtet werden, sind somit nicht auf eine elektrische Inaktivierung der Nerven zurückzuführen.

4b) In vitro Untersuchungen zur Frage der Induktion von Apoptose durch Lidocain

Lidocain induziert konzentrationsabhängig Apoptose bzw. Nekrose. Die durch Lidocain verursachte Apoptose wird über den mitochondrialen Signalweg, nicht aber über den Todesrezeptor-Signalweg vermittelt¹³⁵.

Für viele Lokalanästhetika sind neuro- und zytotoxische Wirkungen beschrieben. In klinischen Studien werden neurologische Schädigungen am häufigsten dem Lidocain zugeschrieben. So rät eine Cochrane-Analyse aufgrund der beobachteten neurologischen Symptome von der Verwendung des Lokalanästhetikums Lidocain bei Spinalanästhesien ab³⁹. Dennoch wird diese Substanz weiterhin für Spinalanästhesien und andere Regionalanästhesie-Verfahren verwendet, insbesondere wenn eine kurze Blockadedauer gewünscht ist. Nach aktuellen Veröffentlichungen vermag Lidocain Apoptose an neuronalen und nicht-neuronalen Zellen zu induzieren^{46,136-140}. So deuteten einige Autoren schon den Verlust des mitochondrialen Potentials als Apoptose^{46,141}. Der mitochondriale Potentialverlust ist zwar ein frühes, aber kein spezifisches Zeichen für Apoptose. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen^{46,136-140} wurden in der vorliegenden Studie alle Schlüsselstellen des Apoptose-Signalwegs untersucht: Mitochondriales Membranpotential, Phosphatidylserin-Externalisierung, Reduktion von Procaspase, Cytochrom C-Freisetzung und Caspase-3-Aktivierung. Mit diesen verschiedenen

Methoden konnte der Einfluss verschiedener Lidocainkonzentrationen auf den Mechanismus der Apoptose analysiert werden. So ließ sich Lidocain-induzierte Apoptose in niedrigen Konzentrationen nachweisen, aber schon bei nur geringfügig höheren Konzentrationen (10 statt 6 mM) war nicht mehr Apoptose, sondern Nekrose der Mechanismus des Zelltods. Wir konnten somit im Unterschied zu anderen Autoren^{46,136-138,140}, die sich mit der Apoptose-Induktion durch Lokalanästhetika befasst haben, nachweisen, dass es in Abhängigkeit von der Konzentration zu einem Wechsel des Pathomechanismus von Apoptose zu Nekrose kommt.

Über welchen Signalweg Lidocain Apoptose induziert, war bisher unbekannt. Zwar gelang es Johnson et al. mittels eines unspezifischen Pancaspase-Inhibitors die toxische Wirkung von Lidocain herabzusetzen⁴⁶, aber die Hemmung welcher Caspase dabei essentiell war, konnte nicht identifiziert werden. Prinzipiell lässt sich bei Untersuchungen intrazellulärer Mechanismen mittels chemischer Inhibitoren nicht sichern, ob die Inhibitoren in den eingesetzten Konzentrationen tatsächlich selektiv sind.

In der vorliegenden Studie wurde daher der Mechanismus der Apoptose nicht mit mehr oder weniger selektiven Inhibitoren untersucht, sondern an Zellen mit genau definierten genetischen Veränderungen. Dabei schützte sowohl Überexpression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 als auch Caspase-9-Defizienz die Zellen vor der Apoptose-induzierenden Wirkung von Lidocain, nicht aber vor der Nekrose-induzierenden Wirkung höherer Lidocainkonzentrationen. Im Unterschied dazu waren Zellen mit defektem Todesrezeptor-Signalweg (Caspase-8-Defizienz und FADD-Defizienz) nicht geschützt.

Die Toxizität von Lokalanästhetika wurde von anderen Untersuchern auf einen unspezifischen Membraneffekt zurückgeführt^{140,142}. Lokalanästhetika sind zwar chemisch gesehen milde Detergentien und könnten als solche die Zellmembran schädigen und so ihre toxische Wirkung entfalten. Dieser Mechanismus kann jedoch nicht erklären, warum die Bcl-2-überexprimierenden und Caspase-9-defizienten Zellen so ausgeprägt vor Lidocain-

induzierter Apoptose geschützt waren. Somit kann ein unspezifischer Membraneffekt von Lidocain als Mechanismus der Apoptose-Induktion ausgeschlossen werden.

Lidocain induziert also Apoptose in Konzentrationen, wie sie intrathekal nach Spinalanästhesie auftreten⁴⁸. Bei höheren Konzentrationen ist Nekrose der Mechanismus der Zytotoxizität. Die durch Lidocain induzierte Apoptose wird über den mitochondrialen Signalweg, nicht aber über den Todesrezeptor-Signalweg vermittelt.

4c) Vergleich der Toxizität verschiedener Lokalanästhetika in vitro

Alle Lokalanästhetika induzieren in niedrigen Konzentrationen Apoptose und in hohen Konzentrationen Nekrose. Dabei determiniert die Lipophilie der Lokalanästhetika die Toxizität. Die Toxizität wird also wahrscheinlich an einem lipophilen Wirkort induziert und somit innerhalb einer Membran. Da gezeigt werden konnte, dass Lidocain Apoptose über den mitochondrialen Signalweg hervorruft, wird Apoptose vermutlich über einen Wirkort innerhalb der mitochondrialen Membran ausgelöst.

Weil aber die Lipophilie sowohl mit der therapeutischen als auch mit der toxischen Potenz korreliert, ist die therapeutische Breite der Lokalanästhetika weitgehend gleich. Die hier erhobenen Befunde zeigen eine ähnliche Reihenfolge der Toxizitäten wie tierexperimentelle Untersuchungen zur Neurotoxizität verschiedener Lokalanästhetika zeigen konnten¹⁴³.

Wie die kardio- und myotoxische Wirkung^{44,144} könnte auch die Apoptose-induzierende Wirkung der Lokalanästhetika stereospezifisch sein. Überraschenderweise konnte eine Stereospezifität jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Mechanismen von Kardio-, Myo- und der hier untersuchten Zytotoxizität sind allerdings verschieden. Die Kardiotoxizität beruht auf der Ionenkanal-blockierenden Wirkung der Lokalanästhetika, die wiederum stereospezifisch ist¹⁴⁵⁻¹⁴⁷. Die Myotoxizität hingegen ist auf eine stereospezifische Freisetzung von intrazellulärem Calcium zurückzuführen. Hingegen konnte nach Lokalanästhetika-Exposition Apoptose an Myozyten nicht nachgewiesen werden^{43,44}. Für die Neurotoxizität,

die Anlass unserer Untersuchungen war, wurden bisher keine Studien zur Stereospezifität von Lokalanästhetika veröffentlicht. Da auch bei der Neurotoxizität Apoptose der wesentliche Mechanismus ist, wird auch diese Toxizität vermutlich nicht stereospezifisch vermittelt. Auch wenn klinisch die durch Lidocain verursachte Neurotoxizität von besonderem Interesse ist^{38,39,148}, sind nach der vorliegenden Untersuchung alle gängigen Lokalanästhetika bereits in subklinischen Konzentrationen zytotoxisch. Da bei der klinischen Anwendung weit höhere Konzentrationen perineural appliziert werden, muss prinzipiell immer mit Zytotoxizität gerechnet werden.

4d) In vitro Untersuchungen zur Reduktion der Toxizität von Lidocain

Reaktive Sauerstoff-Radikale induzieren Apoptose über den mitochondrialen Signalweg und setzen apoptotisch wirksame Substanzen aus dem Mitochondrien frei¹⁴⁹. Außerdem werden T-Zellen, wie sie hier untersucht wurden, durch Sauerstoff-Radikale für andere apoptotische Stimuli sensibilisiert⁵⁵.

Umgekehrt wirkten Antioxidantien antiapoptotisch und konnten sogar die antiapoptotische Wirkung einer Bcl-2-Überexpression potenzieren¹⁵⁰. Daher erschien es sinnvoll, Antioxidantien einzusetzen, um die durch Lidocain vermittelte Toxizität zu reduzieren. Insbesondere das klinisch häufig verwendete N-Acetyl-Cystein (NAC) wäre geeignet, die Toxizität durch Lidocain bzw. andere Lokalanästhetika zu reduzieren. Da aber die Toxizität der Lokalanästhetika mit deren Lipophilie korreliert und somit der Wirkort der Apoptose-Induktion in der mitochondrialen Membran liegt, wurde außerdem ein lipophiler Radikalfänger (Tempol) verwendet. Schwann-Zellen werden durch NAC und Trolox, ein weiteres lipophiles Antioxidans, vor der apoptotischen Wirkung von Bupivacain geschützt¹⁵¹. Allerdings konnte in dieser Untersuchung durch Lidocain keine Apoptose an Schwann-Zellen ausgelöst werden.

Hingegen konnten wir zeigen, dass Antioxidantien die Lidocain-induzierte Apoptose nicht unterdrücken, wohl aber die durch H_2O_2 -induzierte. Daher induziert Lidocain Apoptose an Jurkat-Zellen nicht über Radikale.

4e) Toxizität von Lidocain an Nervenzellen in vitro

Sind die Ergebnisse an Jurkat-Zellen auch auf neuronale Zellen zu übertragen?

Vor allem die klinisch beobachtete Neurotoxizität der Lokalanästhetika war Anlass unserer Untersuchungen.

Auch an neuronalen Zellen vermindert Lidocain in Abhängigkeit von der Konzentration das mitochondriale Membranpotential, einem frühen, aber nicht spezifischen Marker der Apoptose. Die Caspase-3 wurde nur in niedrigen Konzentrationen aktiviert, nach Exposition mit 10 mM Lidocain wurde aber eine solche Aktivierung nicht beobachtet. Damit ist auch bei neuronalen Zellen in niedrigen Konzentrationen Apoptose der Mechanismus der Neurotoxizität, in höheren Konzentrationen hingegen Nekrose. So konnten an Neuroblastom-Zellen nahezu identische Effekte durch die gleichen Konzentrationen von Lidocain nachgewiesen werden. Auch an vielen anderen Zellkulturen und für andere Lokalanästhetika wurde die Apoptose-induzierende Wirkung nachgewiesen^{46,47,137-141,151-154}.

Adhärente neuronale Zellen erlauben die Mechanismen der Apoptose mikroskopisch darzustellen. Im Gegensatz zu Jurkat-Zellen werden so auch morphologische Veränderungen der neuronalen Zellen erkennbar. Zunächst retrahieren sich die Fortsätze der Zellen, die Zellen vermindern ihre Größe, werden kugelig und lösen sich ab. Die Fluoreszenz-Mikroskopie zeigt nach Lidocain-Exposition an Mitochondrien aktivierte Bax-Proteine. Bax- und Bak-Kanäle permeabilisieren die äußere Mitochondrienmembran^{155,156}. Dadurch können apoptotisch wirksame Substanzen, insbesondere das Cytochrom C freigesetzt werden. An neuronalen Zellen induziert Lidocain Apoptose ebenfalls über den mitochondrialen Signalweg. Die

Aufdeckung dieses Mechanismus bei der mitochondrial-vermittelten Apoptose eröffnet neue Möglichkeiten einer Protektion durch Inhibitoren der Bax-Kanäle¹⁵⁷.

Zusammenfassend wurde die Dosis-Wirkungs-Beziehung der Toxizität von Lidocain, die von Jurkat-Zellen her bekannt war, an neuronalen Zellen reproduziert. Auch bei neuronalen Zellen wird Apoptose über den mitochondrialen Signalweg vermittelt, was durch den Nachweis aktivierter Bax-Kanäle in der Mitochondrienmembran bewiesen werden konnte.

IV. Zusammenfassung

Verfahren der Regionalanästhesie reduzieren wirksam postoperative Schmerzen und senken die Häufigkeit perioperativer Komplikationen. Andererseits sind diese Techniken bzw. die verwendeten Lokalanästhetika mit einer Reihe von Nachteilen behaftet, von denen wesentliche in der vorliegenden Habilitationsschrift untersucht wurden. Im klinischen Teil dieser Habilitationsschrift wurden Methoden zur Prädiktion des Erfolgs bzw. zur Steigerung der Effektivität peripherer Nervenblockaden evaluiert. Außerdem wurden Ausmaß und Muster der Änderungen der Hauttemperatur als diagnostische Kriterien einer Sympathikolyse analysiert und die zentralen Effekte neuroaxialer Blockaden an Säuglingen untersucht. Im experimentellen Teil wurden Mechanismen der Lokalanästhetika-bedingten Zyto- und Neurotoxizität aufgeklärt.

Da die Erfolgsrate peripherer Nervenblockaden häufig unter 90% liegt und die Wirkung erst verzögert eintritt, wurde der prädiktive Wert des Anstiegs der Hauttemperatur für den Blockadeerfolg untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der Hauttemperatur nach bestimmten peripheren Regionalanästhesien ein sicheres, aber spätes Zeichen einer erfolgreichen Blockade ist. Somit ist die Hauttemperatur ungeeignet, den Erfolg einer Blockade frühzeitig vorherzusagen. Weiterhin ist das Muster des Temperaturanstiegs (dargestellt mittels Video-Thermographie) bei allen Regionalanästhesien gleichförmig auf die Akren beschränkt und daher nicht geeignet, die Ausbreitung der Anästhesie zu beurteilen.

Bei Neugeborenen und Säuglingen (in der Mehrzahl ehemalige Frühgeborene) werden Spinalanästhesien durchgeführt, weil sie im Vergleich zu Allgemeinanästhesien wirksam die Inzidenz postoperativer Apnoen reduzieren. Nach bisheriger Lehrmeinung bleibt der Kreislauf von Säuglingen nach Spinalanästhesien, anders als bei Erwachsenen, stabil, und zwar aufgrund der Annahme eines noch unreifen sympathischen Nervensystems in den ersten Lebenswochen. In den hier vorgestellten Untersuchungen wurde jedoch unter Spinalanästhesie nicht nur eine deutliche Sympathikolyse, kenntlich an der Erwärmung der Füße, sondern auch ein signifikanter Abfall des arteriellen Blutdrucks bei konstanter Herzfrequenz beobachtet. Darüber hinaus verursachte die Spinalanästhesie eine erhebliche Sedierung der Säuglinge

und entsprechenden EEG-Veränderungen. Somit wurden bei Säuglingen die gleichen sympatholytischen, hämodynamischen und zentralnervösen Wirkungen einer Spinalanästhesie beobachtet wie bei Erwachsenen.

Lokalanästhetika blockieren Nerven mit hoher Aktionspotentialfrequenz stärker (frequenzabhängige Blockade). Dieses Prinzip wurde eingesetzt, um die Effektivität von Leitungsblockaden zu erhöhen. So verbesserte eine hochfrequente Stimulation nach Blockade des N. ulnaris Wirkungseintritt, Ausdehnung und Erfolgsrate. Allerdings gelang es nicht, dieses Prinzip mittels transkutaner elektrischer Nervenstimulation (TENS) bei Blockaden des Plexus brachialis nachzuweisen.

Bei der Anlage peripherer Blockaden wird die perineurale Lage der Kanüle durch Nervenstimulation gesichert. Hingegen werden Katheter zur postoperativen Schmerztherapie anschließend „blind“ vorgeschoben. Hieraus resultiert häufig eine Abweichung des Katheters von der idealen (unmittelbar perineuralen) Position, so dass bei bis zu 75% der Patienten die postoperative Analgesiequalität als unzureichend beschrieben wurde. Mit der Verfügbarkeit stimulierbarer Katheter besteht erstmals die Möglichkeit, die perineurale Lage des Katheters unmittelbar zu verifizieren bzw. zu korrigieren. Die Effektivität dieser Maßnahme wurde in einer prospektiven, randomisierten Doppelblind-Studie bei Patienten untersucht, die einen interskalenären Katheter zur Schmerztherapie nach Schulteroperationen erhielten. Die Verwendung von Stimulationskathetern verbesserte die Schulterfunktion 6 Wochen nach der Operation signifikant. Eine zusätzliche Verbesserung der postoperativen Analgesie war jedoch nicht nachzuweisen, da bei den Patienten der Kontrollgruppe bereits eine sehr gute Analgesiequalität bestand.

Lokalanästhetika sind in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkdauer neurotoxisch. Da Lokalanästhetika die Nervenleitung blockieren, könnte die elektrische Inaktivität zu einer Inaktivitätsatrophie mit morphologischer Degeneration des Nerven führen. Um diese These zu überprüfen, wurde der Carotissinusnerv von Kaninchen über Tage und Wochen elektrisch inaktiviert. Zwar verloren die Barorezeptoren ihre Funktion, aber im Gegensatz zur

Schädigung durch Lokalanästhetika degenerierten die inaktivierten Nerven hierbei nicht. Somit wird die Neurotoxizität der Lokalanästhetika nicht durch eine elektrische Inaktivierung des Nerven verursacht.

An Zellkulturen wurde der Mechanismus der Toxizität der Lokalanästhetika analysiert. Sie induzieren sowohl an neuronalen als auch an nicht-neuronalen Zellen Apoptose. Der Mechanismus der Apoptose-Induktion durch Lokalanästhetika war bisher unbekannt. Jurkat-T-Lymphomzellen wurden mit Lidocain in aufsteigenden Konzentrationen inkubiert und Marker der Apoptose an den Schlüsselstellen des Signalwegs mittels Messung von mitochondrialem Membran-potential, Cytochrom C-Freisetzung, Phosphatidylserin-Externalisierung, Procaspase-3-Reduktion und Caspase-3-Aktivierung untersucht. Konzentrationsabhängig induzierte Lidocain zunächst Apoptose, in höheren Konzentrationen Nekrose. Ob Lidocain Apoptose über den mitochondrialen oder Todesrezeptor-Signalwegs induziert, wurde an Zellen mit genetischen Veränderungen der beiden Signalwege untersucht. Überexpression des am Mitochondrium antiapoptotischen Proteins Bcl-2 bzw. Defizienz der für den mitochondrialen Signalweg essentiellen Caspase-9 schützten die Zellen vor Lidocain-induzierter Apoptose. Hingegen waren Zellen mit Defizienz der für den Todesrezeptor-Signalweg essentiellen Caspase-8 bzw. FADD, einer Komponente des Todesrezeptors, nicht geschützt. Somit induziert Lidocain Apoptose über den mitochondrialen, nicht aber über den Todesrezeptor-Signalweg.

Obwohl klinisch insbesondere Lidocain Neurotoxizität verursacht, wirken prinzipiell alle Lokalanästhetika zytotoxisch. Daher wurde wiederum an Jurkat-Zellen die Toxizität von 8 klinisch relevanten Lokalanästhetika verglichen. Alle Substanzen induzierten konzentrationsabhängig zunächst Apoptose und in höheren Konzentrationen Nekrose. Dabei variierten die LD₅₀-Werte über 2 Zehnerpotenzen. Die Toxizität korrelierte sowohl mit der Lipophilie als auch mit der leitungsblockierenden Potenz der jeweiligen Substanz. Weiterhin wurden die Stereoisomere von Ropivacain bzw. das L-Bupivacain mit dem Racemat verglichen und gefunden, dass die Toxizität nicht stereospezifisch ist. Folglich induzieren Lokalanästhetika ihre Toxizität über einen lipophilen, nicht aber stereospezifischen Wirkort.

Apoptose kann durch freie Sauerstoffradikale ausgelöst bzw. vermittelt werden und entsprechend durch Antioxidantien verhindert werden. Daher wurde mit einem hydrophilen und einem lipophilen Antioxidans versucht, Lidocain-induzierte Apoptose an Jurkat-Zellen zu unterdrücken. Als Positivkontrolle diente H_2O_2 , welches Sauerstoff-Radikale freisetzt. Beide Antioxidantien konnten die Lidocain-induzierte Apoptose nicht unterdrücken, wohl aber die durch H_2O_2 -induzierte. Demnach scheint die Lidocain-induzierte Apoptose nicht über Radikale vermittelt zu sein.

Da klinisch von den lokalen Nebenwirkungen der Lokalanästhetika die Neurotoxizität im Vordergrund steht, wurde die Toxizität von Lidocain außerdem an neuronalen Zellkulturen untersucht. Neuroblastomzellen wurden mit Lidocain inkubiert und anschließend wurde das mitochondriale Membranpotential bzw. die Caspase-3-Aktivierung als früher bzw. später Marker der Apoptose gemessen. Wie an Jurkat-Zellen induziert Lidocain an neuronalen Zellen in niedrigen Konzentrationen Apoptose und in höheren Nekrose. Darüberhinaus konnte durch Fluoreszenz-Mikroskopie mit spezifischen Antikörpern der Einbau von Bax-Kanälen in Mitochondrien nachgewiesen werden. Somit induziert Lidocain auch an neuronalen Zellen Apoptose über den mitochondrialen Signalweg.

Zusammenfassend wurde im klinischen Teil der vorliegenden Habilitationsschrift gezeigt, dass verschiedene Regionalanästhesie-Verfahren hinsichtlich der durch sie hervorgerufenen Hauterwärmung bzw. Sympathikolyse gleichwertig sind. Darüber hinaus wurden neue Techniken zur Verbesserung von Regionalanästhesie-Verfahren dargestellt. Schließlich wurden erstmals bei Säuglingen deutliche sympatholytische sowie zentralnervöse Effekte anhand elektroencephalographischer Variablen durch Spinalanästhesie nachgewiesen.

Im experimentellen Teil wurde der Mechanismus der Gewebetoxizität von Lokalanästhetika aufgeklärt. Alle klinisch relevanten Lokalanästhetika induzieren in niedrigen Konzentrationen Apoptose und führen in höheren Konzentrationen zu Nekrose. Sowohl an neuronalen als auch an nicht neuronalen Zellen induziert Lidocain Apoptose über den mitochondrialen Signalweg.

V. Literaturverzeichnis:

1. Brandt L. An der Schwelle zur modernen Regionalanästhesie. In: Brandt L, ed. *Illustrierte Geschichte der Anästhesie* Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 1997:230-38.
2. Ballantyne JC. Does epidural analgesia improve surgical outcome? *Br J Anaesth* 2004;92:4-6.
3. Capdevila X, Barthelet Y, Biboulet P et al. Effects of perioperative analgesic technique on the surgical outcome and duration of rehabilitation after major knee surgery. *Anesthesiology* 1999;91:8-15.
4. Rodgers A, Walker N, Schug S et al. Reduction of postoperative mortality and morbidity with epidural or spinal anaesthesia: results from overview of randomised trials. *Bmj* 2000;321:1493.
5. Kehlet H, Holte K. Effect of postoperative analgesia on surgical outcome. *Br J Anaesth* 2001;87:62-72.
6. Perris TM, Watt JM. The road to success: a review of 1000 axillary brachial plexus blocks. *Anaesthesia* 2003;58:1220-4.
7. Chang PC, Lang SA, Yip RW. Reevaluation of the sciatic nerve block. *Reg Anesth* 1993;18:18-23.
8. Morris GF, Lang SA, Dust WN, Van der Wal M. The parasacral sciatic nerve block. *Reg Anesth* 1997;22:223-8.
9. Narchi P. Stimulating catheters are a major advance in improving success rates - pro. In: Rawal N, Gligorijevic S, eds. *Highlights in Regional Anaesthesia and Pain Therapy*. XIV Limassol: Cyprint Ltd., 2005:221-2.
10. Fink BR. Differential use-dependent (frequency-dependent) effects in single mammalian axons: Data and clinical considerations. *Anesthesiology* 1987;67:477-84.
11. Fink BR, Cairns AM. Differential potencies of bupivacaine and etidocaine assessed by equilibrium and use-dependent block in single axons of various types. *Anesthesiology Suppl* 1988;69:A866.
12. Lundin S, Wallin BG, Elam M. Intraneural recording of muscle sympathetic activity during epidural anesthesia in humans. *Anesth Analg* 1989;69:788-93.
13. Lundin S, Kirno K, Wallin BG, Elam M. Effects of epidural anesthesia on sympathetic nerve discharge to the skin. *Acta Anaesthesiol Scand* 1990;34:492-7.
14. Gordh T. Analysis of the sensation of warmth in the lower extremities as the primary effect. *Regional Anesthesia* 1977;2:5-7.
15. Hopf HB, Weissbach B, Peters J. High thoracic segmental epidural anesthesia diminishes sympathetic outflow to the legs, despite restriction of sensory blockade to the upper thorax. *Anesthesiology* 1990;73:882-9.
16. Asato F, Takenami T. The detection of successful epidural blockade by subjective assessment of toe-temperature elevation. *Anesthesiology* 1997;87:1264.
17. Frank SM, El-Rahmany HK, Tran KM et al. Comparison of lower extremity cutaneous temperature changes in patients receiving lumbar sympathetic ganglion blocks versus epidural anesthesia. *J Clin Anesth* 2000;12:525-30.
18. Breivik H, Cousins MJ, Löfström JB. Sympathetic neural blockade of upper and lower extremity. In: Cousins MJ, Bridenbaugh PO, eds. *Neural Blockade*. 3 ed. Philadelphia - New York: Lippincott-Raven, 1998:411-47.
19. Cote CJ, Zaslavsky A, Downes JJ et al. Postoperative apnea in former preterm infants after inguinal herniorrhaphy. A combined analysis. *Anesthesiology* 1995;82:809-22.
20. Sartorelli KH, Abajian JC, Kreutz JM, Vane DW. Improved outcome utilizing spinal anesthesia in high-risk infants. *J Pediatr Surg* 1992;27:1022-5.

21. Welborn LG, Rice LJ, Hannallah RS et al. Postoperative apnea in former preterm infants: prospective comparison of spinal and general anesthesia. *Anesthesiology* 1990;72:838-42.
22. Bremerich DH, Neidhart G, Roth B et al. Postoperative Schmerztherapie im Kindesalter. *Anaesthesist* 2001;50:102-12.
23. Caplan RA, Ward RJ, Posner K, Cheney FW. Unexpected cardiac arrest during spinal anesthesia: A closed claims analysis of predisposing factors. *Anesthesiology* 1988;68:5-11.
24. Arndt JO, Bomer W, Krauth J, Marquardt B. Incidence and time course of cardiovascular side effects during spinal anesthesia after prophylactic administration of intravenous fluids or vasoconstrictors. *Anesth Analg* 1998;87:347-54.
25. Williams RK, Adams DC, Aladjem EV et al. The safety and efficacy of spinal anesthesia for surgery in infants: the Vermont Infant Spinal Registry. *Anesth Analg* 2006;102:67-71.
26. Dohi S, Naito H, Takahashi T. Age-related changes in blood pressure and duration of motor block in spinal anesthesia. *Anesthesiology* 1979;50:319-23.
27. Oberlander TF, Berde CB, Lam KH et al. Infants tolerate spinal anesthesia with minimal overall autonomic changes: analysis of heart rate variability in former premature infants undergoing hernia repair. *Anesth Analg* 1995;80:20-7.
28. Rochette A, Raux O, Troncin R et al. Clonidine prolongs spinal anesthesia in newborns: a prospective dose-ranging study. *Anesth Analg* 2004;98:56-9.
29. Pollock JE, Neal JM, Liu SS et al. Sedation during spinal anesthesia. *Anesthesiology* 2000;93:728-34.
30. Ozkan-Seyhan T, Sungur MO, Senturk E et al. BIS guided sedation with propofol during spinal anaesthesia: influence of anaesthetic level on sedation requirement. *Br J Anaesth* 2006;96:645-9.
31. Wilhelm W, Bruhn J, Kreuer S. Überwachung der Narkosetiefe. 1. Auflage Deutscher Ärzte-Verlag, 2005.
32. Butterworth JF, Strichartz GR. Molecular mechanism of local anesthetics: A review. *Anesthesiology* 1990;72:711-34.
33. Courtney KR, Kendig JJ, Cohen EN. Frequency-dependent conduction block: the role of nerve impulse pattern in local anesthetic potency. *Anesthesiology* 1978;48:111-7.
34. Courtney KR, Strichartz GR. Structural elements which determine local anesthetic activity. In: Strichartz GR, ed. *Handbook of experimental pharmacology: Local anesthetics*. 1 ed. Berlin-New York-Heidelberg: Springer Verlag, 1987:53-94.
35. Carroll D, Moore RA, McQuay HJ et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) for chronic pain. *Cochrane Database Syst Rev* 2001:CD003222.
36. Denny NM, Barber N, Sildown DJ. Evaluation of an insulated Tuohy needle system for the placement of interscalene brachial plexus catheters. *Anaesthesia* 2003;58:554-7.
37. Boezaart AP, de Beer JF, du Toit C, van Rooyen K. A new technique of continuous interscalene nerve block. *Can J Anaesth* 1999;46:275-81.
38. Johnson ME. Potential neurotoxicity of spinal anesthesia with lidocaine. *Mayo Clinic Proceedings* 2000;75:921-32.
39. Zaric D, Christiansen C, Pace NL, Punjasawadwong Y. Transient neurologic symptoms (TNS) following spinal anaesthesia with lidocaine versus other local anaesthetics. *Cochrane Database Syst Rev* 2005:CD003006.
40. Myers RR, Kalichman MW, Reisner LS, Powell HC. Neurotoxicity of local anesthetics: altered perineurial permeability, edema, and nerve fiber injury. *Anesthesiology* 1986;64:29-35.

41. Seitz RJ, Lipfert P, Willrich A, Himmelmann F. Toxic effects of triethyldodecylammoniumbromide (TEA-C12) on myelinated nerve fibers and blood-nerve barrier in the mouse. *Exp Brain Res* 1989;74:293-302.
42. Sakura S, Bollen AW, Ciriales R, Drasner K. Local anesthetic neurotoxicity does not result from blockade of voltage-gated sodium channels. *Anesth Analg* 1995;81:338-48.
43. Zink W, Bohl JR, Hacke N et al. The long term myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blocks. *Anesth Analg* 2005;101:548-54.
44. Zink W, Missler G, Sinner B et al. Differential effects of bupivacaine and ropivacaine enantiomers on intracellular Ca²⁺ regulation in murine skeletal muscle fibers. *Anesthesiology* 2005;102:793-8.
45. Stevens MF, Hoppe M, Holthausen H, Lipfert P. Tetrodotoxin-induced conduction blockade is prolonged by hyaluronic acid with and without bupivacaine. *Acta Anaesthesiol Scand* 2004;48:128-34.
46. Johnson ME, Uhl CB, Spittler KH et al. Mitochondrial injury and caspase activation by the local anesthetic lidocaine. *Anesthesiology* 2004;101:1184-94.
47. Lirk P, Haller I, Hausott B et al. The neurotoxic effects of amitriptyline are mediated by apoptosis and are effectively blocked by inhibition of caspase activity. *Anesth Analg* 2006;102:1728-33.
48. Denson DD, Bridenbaugh PO, Turner PA, Phero JC. Comparison of neural blockade and pharmacokinetics after subarachnoid lidocaine in the rhesus monkey. II: Effects of volume, osmolality, and baricity. *Anesth Analg* 1983;62:995-1001.
49. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1-16.
50. Sprick MR, Rieser E, Stahl H et al. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *Embo J* 2002;21:4520-30.
51. Bossy-Wetzel E, Green DR. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res* 1999;434:243-51.
52. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M et al. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-90.
53. Garlid KD, Nakashima RA. Studies on the mechanism of uncoupling by amine local anesthetics. Evidence for mitochondrial proton transport mediated by lipophilic ion pairs. *J Biol Chem* 1983;258:7974-80.
54. Sztark F, Malgat M, Dabadie P, Mazat JP. Comparison of the effects of bupivacaine and ropivacaine on heart cell mitochondrial bioenergetics. *Anesthesiology* 1998;88:1340-9.
55. Tripathi P, Hildeman D. Sensitization of T cells to apoptosis--a role for ROS? *Apoptosis* 2004;9:515-23.
56. Winnie AP, Ramamurthy S, Durrani Z. The inguinal paravascular technic of lumbar plexus anesthesia: the "3-in-1 block". *Anesth Analg* 1973;52:989-96.
57. Van Elstraete AC, Poey C, Lebrun T, Pastureau F. New landmarks for the anterior approach to the sciatic nerve block: imaging and clinical study. *Anesth Analg* 2002;95:214-8.
58. Gurman GM. Assessment of depth of general anesthesia. Observations on processed EEG and spectral edge frequency. *Int J Clin Monit Comput* 1994;11:185-9.
59. Intraoperative ASoATFo, Awareness. Practice advisory for intraoperative awareness and brain function monitoring: a report by the american society of anesthesiologists task force on intraoperative awareness. *Anesthesiology* 2006;104:847-64.
60. Berkenbosch JW, Fichter CR, Tobias JD. The correlation of the bispectral index monitor with clinical sedation scores during mechanical ventilation in the pediatric intensive care unit. *Anesth Analg* 2002;94:506-11.

61. Meier G. Periphere Nervenblockade der unteren Extremität. *Anaesthesist* 2001;50:536-57.
62. Meier G, Bauereis C, Maurer H, Meier T. Interskalenäre Plexusblockaden. *Anaesthesist* 2001;50:333-41.
63. Constant CR, Murley AH. A clinical method of functional assessment of the shoulder. *Clin Orthop Relat Res* 1987;160-4.
64. Constant CR. Beurteilung der Schulterfunktion. *Orthopade* 1991;20:289-94.
65. Germann G, Harth A, Wind G, Demir E. Standardisierung und Validierung der deutschen Version 2.0 des "Disability of Arm, Shoulder, Hand" (DASH)-Fragebogens zur Outcome-Messung an der oberen Extremität. *Unfallchirurg* 2003;106:13-9.
66. Belka C, Rudner J, Wesselborg S et al. Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene* 2000;19:1181-90.
67. Engels IH, Stepczynska A, Stroh C et al. Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* 2000;19:4563-73.
68. Klopfer A, Hasenjager A, Belka C et al. Adenine deoxynucleotides fludarabine and cladribine induce apoptosis in a CD95/Fas receptor, FADD and caspase-8-independent manner by activation of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2004;23:9408-18.
69. Samraj AK, Keil E, Ueffing N et al. Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/ II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2006;281:29652-9.
70. Reers M, Smith TW, Chen LB. J-aggregate formation of a carbocyanine as a quantitative fluorescent indicator of membrane potential. *Biochemistry* 1991;30:4480-6.
71. Cossarizza A, Baccarani-Conti M, Kalashnikova G, Franceschi C. A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197:40-5.
72. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995;184:39-51.
73. Strichartz GR, Sanchez V, Arthur GR et al. Fundamental properties of local anesthetics. II. Measured octanol:buffer partition coefficients and pKa values of clinically used drugs. *Anesth Analg* 1990;71:158-70.
74. Tucker GT, Mather LE. Properties, absorption, and disposition of local anesthetic agents. In: Cousins MJ, Bridenbaugh PO, eds. *Neural Blockade Philadelphia: Lippincott - Raven*, 1998:55-95.
75. Truant AP, Takman B. Differential physical-chemical and neuropharmacologic properties of local anesthetic agents. *Anesth Analg* 1959;38:478-84.
76. Bardsley H, Gristwood R, Baker H et al. A comparison of the cardiovascular effects of levobupivacaine and rac-bupivacaine following intravenous administration to healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1998;46:245-9.
77. Gristwood R, Bardsley H, Baker H, Dickens J. Reduced cardiotoxicity of levobupivacaine compared with racemic bupivacaine (Marcaine): new clinical evidence. *Exp Opin Invest Drugs* 1994;3:1209-12.
78. Morrison SG, Dominguez JJ, Frascarolo P, Reiz S. A comparison of the electrocardiographic cardiotoxic effects of racemic bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized swine. *Anesth Analg* 2000;90:1308-14.
79. Yeh JZ. Blockade of sodium channels by stereoisomerism of local anesthetics. *Progress in Anesthesiology* 1980;2:35-44.

80. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 1973;33:2643-52.
81. Stevens MF, Werdehausen R, Hermanns H, Lipfert P. Skin temperature and sensory changes during regional anesthesia of the lower extremity. *Anesth Analg* 2006;102:1247-51.
82. Meier G. Peripheral nerve block of the lower extremities. *Anaesthesist* 2001;50:536-57.
83. Janzen PR, Vipond AJ, Bush DJ, Hopkins PM. A comparison of 1% prilocaine with 0.5% ropivacaine for outpatient-based surgery under axillary brachial plexus block. *Anesth Analg* 2001;93:187-91.
84. Freitag M, Zbieranek K, Gottschalk A et al. Comparative study of different concentrations of prilocaine and ropivacaine for intraoperative axillary brachial plexus block. *Eur J Anaesthesiol* 2006;23:481-6.
85. Schnider TW, Minto CF. Predictors of onset and offset of drug effect. *Eur J Anaesthesiol Suppl* 2001;23:26-31.
86. de Jong RH. Threshold-Blocking Phenomena. In: de Jong RH, ed. *Local Anesthetics*. 2 ed. St. Louis Baltimore Boston Chicago London Madrid Philadelphia Sydney Toronto: Mosby, 1994:64-80.
87. Johnson JM, Proppe DW. Cardiovascular adjustments to heat stress. In: Fregly MJ, Blatteis CM, eds. *Handbook of physiology* New York: Oxford University Press, 1996:215-43.
88. Werdehausen R, Braun S, Hermanns H et al. Uniform Distribution of Skin-Temperature Increase After Different Regional-Anesthesia Techniques of the Lower Extremity. *Reg Anesth Pain Med* 2007;32:73-8.
89. Butterworth J, Ririe DG, Thompson RB et al. Differential onset of median nerve block: randomized, double-blind comparison of mepivacaine and bupivacaine in healthy volunteers. *Br J Anaesth* 1998;81:515-21.
90. Eisenach JH, Pike TL, Wick DE et al. A comparison of peripheral skin blood flow and temperature during endoscopic thoracic sympathectomy. *Anesth Analg* 2005;100:269-76.
91. Perhoniemi V, Linko K. Effect of spinal versus epidural anaesthesia with 0.5% bupivacaine on lower limb blood flow. *Acta Anaesthesiol Scand* 1987;31:117-21.
92. Tired L, Nivoche Y, Hatton F et al. Complications related to anaesthesia in infants and children. A prospective survey of 40240 anaesthetics. *Br J Anaesth* 1988;61:263-9.
93. Morray JP, Geiduschek JM, Ramamoorthy C et al. Anesthesia-related cardiac arrest in children: initial findings of the Pediatric Perioperative Cardiac Arrest (POCA) Registry. *Anesthesiology* 2000;93:6-14.
94. Polaner DM, Suresh S, Cote CJ. Pediatric Regional Anesthesia. In: Cote CJ, Todres D, Ryan JF, Goudsouzian NG, eds. *A Practice of Anesthesia for infants and children* Philadelphia: W.B. Saunders, 2001:636-74.
95. Reich A. Zentrale Blockaden. In: Reich A, ed. *Regionalanästhesien im Kindesalter* Bremen: UNI-MED, 2004:81-102.
96. Jetzek-Zader M, Hermanns H, Freynhagen R et al. Increase in skin temperature after spinal anesthesia in infants. *Reg Anesth Pain Med* 2006;31:519-22.
97. Hermanns H, Stevens MF, Werdehausen R et al. Sedation during spinal anaesthesia in infants. *Br J Anaesth* 2006;97:380-4.
98. Abajian JC, Mellish RW, Browne AF et al. Spinal anesthesia for surgery in the high-risk infant. *Anesth Analg* 1984;63:359-62.
99. Harnik EV, Hoy GR, Potolicchio S et al. Spinal anesthesia in premature infants recovering from respiratory distress syndrome. *Anesthesiology* 1986;64:95-9.

100. Bonnet MP, Larousse E, Asehnoune K, Benhamou D. Spinal anesthesia with bupivacaine decreases cerebral blood flow in former preterm infants. *Anesth Analg* 2004;98:1280-3.
101. Beauvoir C, Rochette A, Desch G, D'Athis F. Spinal anaesthesia in newborns: total and free bupivacaine plasma concentration. *Paediatr Anaesth* 1996;6:195-9.
102. Moruzzi G, Magoun HW. Brain stem reticular formation and activation of the EEG. *Electroencephalogr J* 1949;1:455-73.
103. Antognini JF, Jinks SL, Atherley R et al. Spinal anaesthesia indirectly depresses cortical activity associated with electrical stimulation of the reticular formation. *Br J Anaesth* 2003;91:233-8.
104. Stevens M, Klement W, Lipfert P. Die Wirkung von Lokalanästhetika bei Leitungsblockaden ist stimulationsfrequenzabhängig. *Anästhesist* 1993;42:871-2.
105. Stevens MF, Linstedt U, Neruda B et al. Effect of transcutaneous electrical nerve stimulation on onset of axillary plexus block. *Anaesthesia* 1996;51:916-9.
106. Woolf CJ. Segmental afferent fibre-induced analgesia: transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) and vibration. In: Wall PD, Melzack R, eds. *Textbook of Pain*. 2. ed. Edinburgh, London, Melbourne, New York: Churchill Livingstone, 1989:884-96.
107. Tsen LC, Thomas J, Segal S et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation does not augment combined spinal epidural labour analgesia. *Canadian Journal of Anaesthesia* 2000;47:38-42.
108. Morin AM, Eberhart LH, Behnke HK et al. Does femoral nerve catheter placement with stimulating catheters improve effective placement? A randomized, controlled, and observer-blinded trial. *Anesth Analg* 2005;100:1503-10.
109. Casati A, Fanelli G, Koscielniak-Nielsen Z et al. Using stimulating catheters for continuous sciatic nerve block shortens onset time of surgical block and minimizes postoperative consumption of pain medication after halux valgus repair as compared with conventional nonstimulating catheters. *Anesth Analg* 2005;101:1192-7.
110. Rodriguez J, Taboada M, Carceller J et al. Stimulating popliteal catheters for postoperative analgesia after hallux valgus repair. *Anesth Analg* 2006;102:258-62.
111. Ilfeld BM, Morey TE, Enneking FK. Infraclavicular perineural local anesthetic infusion: a comparison of three dosing regimens for postoperative analgesia. *Anesthesiology* 2004;100:395-402.
112. Ilfeld BM, Morey TE, Wright TW et al. Interscalene perineural ropivacaine infusion: a comparison of two dosing regimens for postoperative analgesia. *Reg Anesth Pain Med* 2004;29:9-16.
113. Haahr JP, Ostergaard S, Dalsgaard J et al. Exercises versus arthroscopic decompression in patients with subacromial impingement: a randomised, controlled study in 90 cases with a one year follow up. *Ann Rheum Dis* 2005;64:760-4.
114. Beaton DE, Katz JN, Fossel AH et al. Measuring the whole or the parts? Validity, reliability, and responsiveness of the Disabilities of the Arm, Shoulder and Hand outcome measure in different regions of the upper extremity. *J Hand Ther* 2001;14:128-46.
115. Skutek M, Fremerey RW, Zeichen J, Bosch U. Outcome analysis following open rotator cuff repair. Early effectiveness validated using four different shoulder assessment scales. *Arch Orthop Trauma Surg* 2000;120:432-6.
116. Chelly JE, Greger J, Gebhard R et al. Continuous femoral blocks improve recovery and outcome of patients undergoing total knee arthroplasty. *J Arthroplasty* 2001;16:436-45.
117. Hadzic A, Arliss J, Kerimoglu B et al. A comparison of infraclavicular nerve block versus general anesthesia for hand and wrist day-case surgeries. *Anesthesiology* 2004;101:127-32.

118. Borgeat A, Ekatodramis G, Kalberer F, Benz C. Acute and nonacute complications associated with interscalene block and shoulder surgery: a prospective study. *Anesthesiology* 2001;95:875-80.
119. Liguori GA, Zayas VM, YaDeau JT et al. Nerve localization techniques for interscalene brachial plexus blockade: a prospective, randomized comparison of mechanical paresthesia versus electrical stimulation. *Anesth Analg* 2006;103:761-7.
120. Weber SC, Abrams JS, Nottage WM. Complications associated with arthroscopic shoulder surgery. *Arthroscopy* 2002;18:88-95.
121. Fibuch EE, Mertz J, Geller B. Postoperative onset of idiopathic brachial neuritis. *Anesthesiology* 1996;84:455-8.
122. Tetzlaff JE, Dilger J, Yap E, Brems J. Idiopathic brachial plexitis after total shoulder replacement with interscalene brachial plexus block. *Anesth Analg* 1997;85:644-6.
123. Dullenkopf A, Zingg P, Curt A, Borgeat A. [Persistent neurological deficit of the upper extremity after a shoulder operation under general anesthesia combined with a preoperatively placed interscalene catheter]. *Anaesthesist* 2002;51:547-51.
124. Stevens MF, Novotny GE, Lipfert P. Inactivation of baroafferents leads to loss of barosensitivity without changes in nerve morphology. *Journal of the Autonomic Nervous System* 1998;68:125-34.
125. Lahiri S, Mulligan E, Andronikou M et al. Carotid body chemosensory function in prolonged normobaric hyperoxia in the cat. *J Appl Physiol* 1987;62:1925-31.
126. Beranek R, Hnik P. Long-term effects of tenotomy on spinal monosynaptic response in the cat. *Science* 1959;130:981-2.
127. Eisen AA, Carpenter S, Karpati G, Bellavance A. The effect of muscle hyper- and hypoactivity upon fibre diameters of intact and regenerating nerves. *J Neurol Sci* 1973;20:457-69.
128. Malathi S, Batmanabane M. Effects of varying periods of immobilization of a limb on the morphology of a peripheral nerve. *Acta Morphol Neerl-Scand* 1983;21:185-98.
129. Malathi S, Batmanabane M. Effects of immobilization of a limb on the maturation of a peripheral nerve. *Acta Anat* 1988;132:191-6.
130. Tomanek RJ. Limb immobilization and the diameters and number of nerve fibers. *J Comp Neurol* 1968;134:477-84.
131. Kalichman MW, Powell HC, Myers RR. Pathology of local anesthetic-induced nerve injury. *Acta Neuropathol (Berl)* 1988;75:583-9.
132. Kalichman MW, Moorhouse DF, Powell HC, Myers RR. Relative neural toxicity of local anesthetics. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52:234-40.
133. Gold MS, Reichling DB, Hampl KF et al. Lidocaine toxicity in primary afferent neurons from the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;285:413-21.
134. Lipfert P, Seitz RJ, Arndt JO. Ultralong-lasting nerve block: Triethyldodecyl ammonium bromide is probably a neurotoxin rather than a local anesthetic. *Anesthesiology* 1987;67:896-904.
135. Stevens MF, Lipfert P, Braun S et al. Lidocaine-induced apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Reg Anesth Pain Med* 2006;31:261.
136. Friederich P, Schmitz TP. Lidocaine-induced cell death in a human model of neuronal apoptosis. *Eur J Anaesthesiol* 2002;19:564-70.
137. Tan Z, Dohi S, Chen J et al. Involvement of the mitogen-activated protein kinase family in tetracaine-induced PC12 cell death. *Anesthesiology* 2002;96:1191-201.
138. Boselli E, Duflo F, Debon R et al. The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg* 2003;96:755-6.
139. Kamiya Y, Ohta K, Kaneko Y. Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomed Res* 2005;26:231-9.

140. Nishimura Y, Kanada A, Yamaguchi JY et al. Cytometric analysis of lidocaine-induced cytotoxicity: a model experiment using rat thymocytes. *Toxicology* 2006;218:48-57.
141. Lirk P, Haller I, Myers RR et al. Mitigation of direct neurotoxic effects of lidocaine and amitriptyline by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *Anesthesiology* 2006;104:1266-73.
142. Kitagawa N, Oda M, Totoki T. Possible mechanism of irreversible nerve injury caused by local anesthetics: detergent properties of local anesthetics and membrane disruption. *Anesthesiology* 2004;100:962-7.
143. Yamashita A, Matsumoto M, Matsumoto S et al. A comparison of the neurotoxic effects on the spinal cord of tetracaine, lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine administered intrathecally in rabbits. *Anesth Analg* 2003;97:512-9.
144. Graf BM, Martin E, Bosnjak ZJ, Stowe DF. Stereospecific effect of bupivacaine isomers on atrioventricular conduction in the isolated perfused guinea pig heart. *Anesthesiology* 1997;86:410-9.
145. Friederich P, Solth A. Interaction of ropivacaine with cloned cardiac Kv4.3/KChIP2.2 complexes. *Anesthesiology* 2004;101:1347-56.
146. Gonzalez T, Longobardo M, Caballero R et al. Stereoselective effects of the enantiomers of a new local anaesthetic, IQB-9302, on a human cardiac potassium channel (Kv1.5). *Br J Pharmacol* 2001;132:385-92.
147. Clarkson CW. Stereoselective block of cardiac sodium channels by RAC109 in single guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res* 1989;65:1306-23.
148. Pollock JE. Transient neurologic symptoms: etiology, risk factors, and management. *Reg Anesth Pain Med* 2002;27:581-6.
149. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-9.
150. Jang JH, Surh YJ. Potentiation of cellular antioxidant capacity by Bcl-2: implications for its antiapoptotic function. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1371-9.
151. Park CJ, Park SA, Yoon TG et al. Bupivacaine induces apoptosis via ROS in the Schwann cell line. *J Dent Res* 2005;84:852-7.
152. Arita K, Utsumi T, Kato A et al. Mechanism of dibucaine-induced apoptosis in promyelocytic leukemia cells (HL-60). *Biochem Pharmacol* 2000;60:905-15.
153. Kim M, Lee YS, Mathews HL, Wurster RD. Induction of apoptotic cell death in a neuroblastoma cell line by dibucaine. *Exp Cell Res* 1997;231:235-41.
154. Kontargiris E, Kolettas E, Vadalouca A et al. Ectopic expression of clusterin/apolipoprotein J or Bcl-2 decreases the sensitivity of HaCaT cells to toxic effects of ropivacaine. *Cell Res* 2004;14:415-22.
155. Wei MC, Zong WX, Cheng EH et al. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001;292:727-30.
156. Antignani A, Youle RJ. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:685-89.
157. Hetz C, Vitte PA, Bombrun A et al. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. *J Biol Chem* 2005;280:42960-70.

VII. Danksagung

Ich danke besonders Herrn Universitätsprofessor Dr. med. Jörg Tarnow für die langjährige Unterstützung, an deren Ende die Möglichkeit zur Habilitation stand.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen bedanken, ohne die keine meiner Untersuchungen möglich gewesen wäre. Zum einen sind die Doktoranden Sepideh Fazeli, Nina Gaza, Marcus Hoppe und Robert Werdehausen und die technischen Assistentinnen Birgitt Berke und Antje Nebert zu nennen, die mit viel Fleiß und Enthusiasmus die Projekte vorangebracht und beflügelt haben. Besonders hervorgehoben werden muss an dieser Stelle der unermüdliche Einsatz von Robert Werdehausen beim Aufbau einer klinisch und experimentell produktiven Arbeitsgruppe. Des Weiteren gilt mein Dank den wissenschaftlichen Mitarbeitern Dr. Sebastian Braun, Dr. Henning Hermanns, Dr. Rainer Freynhagen, Priv.-Doz. Dr. Lothar A. Schwarte und Dr. Martin Jetzek-Zader, deren Hilfe und Anregungen unverzichtbar waren. Großer Dank gehört auch den uneigennützig kooperierenden Wissenschaftlern allen voran Dr. rer. nat. Frank Essmann (Institut für Molekulare Medizin), Prof. Ph.D. (Lond.) Gerd Novotny (Institut für Anatomie I), Prof. Dr. rer. nat. Klaus Schulze-Osthoff (Institut für Molekulare Medizin) und Dr. rer. nat. Henning Walczak (DKFZ Heidelberg).

Und schließlich danke ich von ganzem Herzen Herrn Professor Dr. med. Peter Lipfert, der mich seit vielen Jahren wissenschaftlich beraten und in meiner Arbeit ermutigt hat.

VIII. Lebenslauf

Name:	Markus Florian Stevens
Geboren:	17. Januar 1964
Schullaufbahn:	1970-74 Richard Schirrmann Grundschule, Krefeld 1974-83 Gymnasium Fabritianum, Krefeld
Zivildienst:	1985-86 Universitätsklinikum Düsseldorf und Neurologisches Krankenhaus München
Hochschulstudium:	1984-91 Studium der Medizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Promotion:	Auswirkungen einer Ruhigstellung der Carotissinuswand auf Erregungseigenschaften und Morphologie des Carotissinusnerven
Berufserfahrung:	1991-1993 Arzt im Praktikum in der Abteilung für Experimentelle Anästhesiologie der Heinrich-Heine-Universität 1993-98 Ausbildung zum Facharzt für Anästhesie an der Klinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Düsseldorf 2003 Ernennung zum Oberarzt der Klinik für Anästhesiologie
Weitere Ausbildungen:	Fachkunden: Ärztliches Qualitätsmanagement Strahlenschutz Notfallmedizin EFQM-Assessor (European Foundation of Quality Management) Zusatzbezeichnungen: Medizinische Informatik Spezielle anästhesiologische Intensivmedizin DEAA (Diplomate of the European Academy of Anaesthesiology) DESRA (Diplomate of the European Society of Regional Anaesthesia) Qualifikation: “Leitender Notarzt”
Drittmittelförderung:	Einzelförderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (“Inaktivitätsatrophie sensorischer Neurone” - Li 585/1-1) Einzelförderung der Deutschen Forschungsgemeinschaft (“Implantation durchtrennter Baroafferenzen in Gefäße des Hoch- und Niederdrucksystems Ste 983/1-1)
Preise:	2. Platz im wissenschaftlichen Wettbewerb des Deutschen Anästhesie Congresses 2006 in Leipzig (Seniorautor)