

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich - Heine - Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. B. H. Pannen

**Experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung von
Signalwegen der Apoptose für die Neurotoxizität von
Lidocain**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der
Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Robert Werdehausen

2009

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Dekan

Referent: PD Dr. med. Markus F. Stevens
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Fritz Boege

Meinen Großeltern und Eltern, meiner Schwester und meiner Verlobten
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	6
1.1 Einleitung	6
1.1.1 Toxizität von Lokalanästhetika	6
1.1.2 Signalwege der Apoptose	7
1.2 Fragestellung	10
2. Material und Methoden	12
2.1 Reagenzien und Antikörper	12
2.1.1 Reagenzien	12
2.1.2 Antikörper	12
2.2 Zellkulturen	14
2.3 Experimentelles Protokoll – Lidocain-Exposition	14
2.4 Nachweisverfahren	15
2.4.1 Bestimmung von Zellvitalität	15
2.4.2 Messung der Aktivität von Caspase 3	15
2.4.3 Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials	16
2.4.4 Western Blot Analyse	17
2.4.5 Mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C	18
2.4.6 Annexin V – PI Doppelfärbung zum Nachweis früher Apoptose	19
2.4.7 Oligomerisierung von Bax Protein an mitochondrialen Membranen	20
2.5 Durchflusszytometrie	21
2.6 Statistische Auswertungen	22

3. Ergebnisse	23
3.1 Der dosisabhängige Effekt von Lidocain auf Jurkat Wildtypzellen.....	23
3.2 Die Inhibition von Lidocain-induzierter Apoptose durch Bcl-2- Überexpression	31
3.3 Schutz vor Lidocain-induzierter Apoptose durch Ausschaltung des mitochondrialen Signalweges	33
3.4 Die Rolle des extrinsischen Signalweges für die Lidocain-induzierte Apoptose	33
3.5 Die dosisabhängige Wirkung von Lidocain auf humane Neuroblastomzellen	35
4. Diskussion	42
5. Zusammenfassung	50
6. Literaturverzeichnis	52
8. Curriculum Vitae	66
9. Abstrakt	71

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

1.1.1 Toxizität von Lokalanästhetika

Obwohl Lokalanästhetika seit über 100 Jahren klinisch erfolgreich eingesetzt werden, kommt es doch bisweilen zu passageren Nebenwirkungen und in seltenen Fällen sogar zu permanenten Nervenschäden. Lokalanästhetika unterbrechen die Erregungsleitung von Nerven durch eine Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle. Bei der Durchführung von Regionalanästhesien kann es jedoch in seltenen Fällen durch die Verwendung hoher Dosierungen zu unerwünschten systemischen Wirkungen mit zentralnervöser und kardialer Toxizität kommen.^{1,2} Darüber hinaus können Lokalanästhetika auch lokal toxisch wirken, insbesondere myo- und neurotoxisch.³⁻⁵ Klinisch ist die lokale Neurotoxizität von besonderer Bedeutung.⁶⁻⁸

Bei intrathekaler Applikation zur Spinalanästhesie führt die Anwendung von Lidocain in bis zu 33% der Fälle zu transienten neurologischen Symptomen (TNS).⁹⁻¹¹ Als solche werden leichte bis schwere Schmerzen im Bereich von Gesäß und Oberschenkeln bezeichnet, welche innerhalb weniger Stunden bis zu 24 Stunden nach der Anästhesie auftreten und zumeist für bis zu zwei Tage andauern. Seltener kommt es auch zu irreversiblen Schädigungen wie einem *Cauda equina* Syndrom. Bei dieser irreversiblen Nervenwurzelschädigung treten radikuläre Schmerzen, sensible Störungen im Gesäß- und Oberschenkelbereich (Reithosenanästhesie) sowie fehlende Patellarsehnenreflexe (L4) und/oder Achillessehnenreflexe (S1) auf.^{12,13} Darüber hinaus kann es zu motorischen Ausfällen im Bein- und besonders im Fußbereich, Stuhl- und Harninkontinenz und sexueller Impotenz kommen. Irreversible Nervenschäden kommen sowohl nach einmaliger Applikation des Lokalanästhetikums, als auch nach kontinuierlicher Spinalanästhesie vor.¹⁴⁻¹⁹ Aufgrund der relativ geringen Inzidenz (1:1300) solcher permanenter Schäden ist unklar, ob bestimmte LA stärker toxisch sind als andere. Aus einer Cochrane Analyse geht allerdings hervor, dass reversible TNS vermehrt bei der Verwendung von Lidocain vorkommen.²⁰ Bei Lidocain handelt es sich um ein klinisch vielgenutztes Lokalanästhetikum vom Typ der Amide, welches klinisch auch als Klasse Ib-Antiarrhythmikum Anwendung findet. Es wurde im Jahr 1943 als erstes Lokalanästhetikum

vom Amid-Typ von Nils Löfgren unter dem Namen Xylocain synthetisiert und 1948 zum klinischen Gebrauch zugelassen.²¹

Bereits im Jahr 1985 zeigte eine tierexperimentelle Studie, dass Lokalanästhetika in hohen Konzentrationen histopathologische Veränderungen im Rückenmark mit entsprechenden sensiblen und motorischen Funktionsausfällen verursachen können.²² In einer Reihe von weiteren tierexperimentellen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass viele LA in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkzeit neurotoxisch sind.^{3,23-28} Diese Effekte traten unabhängig von der Hauptwirkung von Lokalanästhetika - der Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle - auf, da eine Hemmung des Natriumkanals mit Tetrodotoxin nicht neurotoxisch ist.²⁶ In bisherigen *in vitro* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Lidocain Apoptose induziert, eine Form des programmierten Zelltodes.^{29,30} Der zugrunde liegende Mechanismus hingegen blieb bisher ungeklärt. Mitochondriale Schädigung wurde als eine mögliche Ursache der zytotoxischen Effekte von Lidocain in neuronalen Hybridzellen³¹ und Spinalwurzelganglienzellen beschrieben.³² Diese Effekte konnten aber nicht auf einen spezifischen Apoptosesignalweg zurückgeführt werden.

Erkenntnisse über den Mechanismus der Lidocain-induzierten Apoptose könnten dazu beitragen, die Inzidenz unerwünschter Nebenwirkungen von Lokalanästhetika zu senken und prophylaktische und therapeutische Möglichkeiten zu ihrer Behandlung zu entwickeln.

1.1.2 Signalwege der Apoptose

Der Apoptose, auch häufig bezeichnet als der programmierte Zelltod, kommt sowohl für die Entwicklung eines Organismus, als auch im adulten Organismus große Bedeutung zu. Für ihre Entdeckungen der genetischen Regulation der Organentwicklung und Apoptose an Nematoden erhielten die Wissenschaftler Sydney Brenner (Großbritannien), H. Robert Horvitz (USA) und John E. Sulston (Großbritannien) im Jahre 2002 den Nobelpreis für Medizin.

Beispiele für die Notwendigkeit des apoptotischen Zelltodes während der Ontogenese sind die Hand-, Augen- und Hirnentwicklung. Im entwickelten Organismus dient Apoptose zur Kontrolle der Zellzahl in Geweben, der Regulation der Immunfunktion, der Selektion von Keimzellen und der Elimination entarteter Zellen. Auch bei einer Reihe von neurodegenerativen Erkrankungen ist übermäßige Apoptose der wesentliche Pathomechanismus.

Die Einleitung der Apoptose ist maßgeblich kontrolliert durch eine Familie von Aspartat-spezifischen Cystein-Proteasen, welche als Caspasen bezeichnet werden. Diese fungieren als Initiatoren und Exekutoren der Apoptose.³³ Caspasen werden durch zwei Hauptsignalwege aktiviert, den extrinsischen oder Todesrezeptor-Signalweg und den intrinsischen oder mitochondrialen Signalweg, welche beide abhängig sind von der Formation großer Multiprotein-Komplexe.³⁴

Abbildung 1

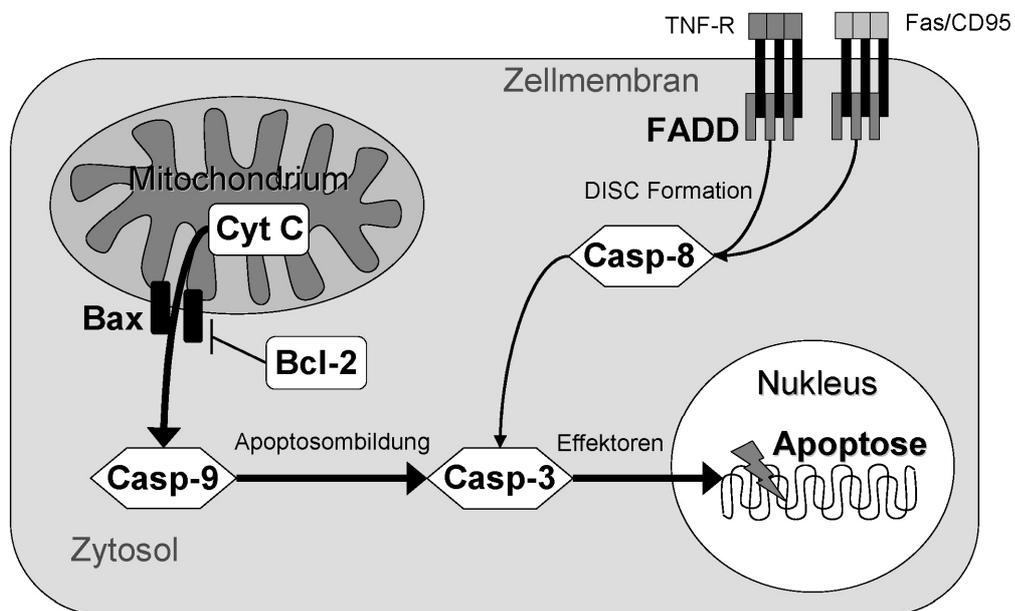


Abbildung 1: Die Hauptsignalwege der Apoptose. Der intrinsische oder mitochondriale Signalweg der Apoptose (linker Bildteil) beruht auf mitochondrialer Dysfunktion und dem Einbau von Bax-Kanälen (Bax = Bcl-2 assoziiertes X Protein) in die äußere Mitochondrienmembran. Dies wird durch das antiapoptotische Protein Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) inhibiert. Durch die Entstehung von Bax-Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran kommt es zur Freisetzung Apoptose-induzierender Mediatoren (z. B. Cytochrom C = Cyt C). Diese Substanzen aktivieren die Initiatorcaspase 9 (Casp-9), welche zusammen mit anderen Faktoren das Apoptosom bildet. Das Apoptosom wiederum aktiviert die Effektorcaspase 3 (Casp-3). Der extrinsische oder Todesrezeptor-Signalweg (rechter Bildteil) 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-assoziiertes protein with death domain) zur Bildung des „death-inducing signaling complex“ (DISC) benötigt, der die Initiatorcaspase 8 (Casp-8) des extrinsischen Signalwegs aktiviert. Die aktivierte Caspase 8 führt wiederum zur Aktivierung der Effektorcaspasen wie Caspase 3 und mündet mit dem intrinsischen Weg in einer gemeinsamen Signalkaskade, die letztendlich zur Apoptose-typischen morphologischen Zellveränderungen und spezifischer DNA-Fragmentierung führt.

Die Initiatorcaspase 8 ist der Schlüsselmediator des extrinsischen Signalweges (Abb. 1).³⁵ Dieser wird eingeleitet durch Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptorfamilie (z. B. CD95).³⁶ Diese besitzen in ihrem zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne. Liganden sind zum Beispiel der Tumornekrosefaktor (TNF) und andere Zytokine, die beispielsweise von T-Lymphozyten sezerniert werden. Durch die induzierte Trimerisierung des Rezeptors bilden die Todesdomänen eine Struktur, an die nun Adaptormoleküle mit eigener Todesdomäne durch homotypische Interaktionen binden können. In einem ersten Schritt wird das „TNF-Rezeptor assoziierte Protein“ rekrutiert. Hieran bindet in der Folge das „Fas-assoziierte Protein mit Todesdomäne“ (FADD). FADD besitzt neben der Todesdomäne auch eine Todeseffektordomäne, über die nun Procaspase 8 an den Komplex bindet. Durch die Bildung dieses sogenannten Zelltod-induzierenden Signalkomplexes (death-inducing signaling complex, DISC) wird die Caspase 8 über Dimerisation und autoproteolytische Spaltung aktiviert. Die aktive Caspase 8 löst ihrerseits eine Kaskade von Caspaseaktivierungen aus, wodurch in einer signalverstärkenden Rückkopplung weitere Caspase 8-Moleküle aktiviert werden. Durch die Aktivierung von Effektorcaspasen, vornehmlich Caspase 3, 6 und 7 kommt es im weiteren Verlauf zum apoptotischen Tod der Zelle. Sie aktivieren einerseits sekundäre Zielproteine (z. B. Caspase aktivierte Desoxyribonuklease oder weitere Caspasen) durch limitierte Proteolyse. Andererseits sind sie selbst aktiv am Abbau von Lamin der Zellkernmembran und Actin des Zytoskeletts beteiligt. Dies führt zu den typischen morphologischen Veränderungen der Zelle im Rahmen der Apoptose. Es kommt zunächst zur Schwellung der Mitochondrien, zur Zelldehydratation und Schrumpfung sowie zur Kondensierung des nuklearen Chromatins und im weiteren Verlauf zur Kernfragmentation. Letztendlich schnürt sich die Zelle nach und nach in kleinen Vesikeln ab, die wiederum durch Phagozyten aufgenommen werden. Im Gegensatz zur Nekrose bleibt hierbei die Zellmembran intakt.

Der intrinsische Signalweg der Apoptose ist im Gegensatz dazu reguliert durch die Freisetzung proapoptischer Faktoren, wie z.B. Cytochrom C aus den Mitochondrien als Folge verschiedener Formen von zellulärem Stress.³⁷⁻³⁹ Die Freisetzung von Cytochrom C wird kontrolliert durch Proteine der B-Zell Lymphoma-2 (Bcl-2) Protein Familie, welche sich durch sogenannte Bcl-2 Homologie Domänen (Bcl-2 homology domains) auszeichnen. Hierbei unterscheidet man prinzipiell 2 Untergruppen: Einerseits die antiapoptischen Proteine, wie das Bcl-2 Protein welches die mitochondriale Permeabilität und damit die

Freisetzung apoptose-induzierender Faktoren aus den Mitochondrien kontrolliert,^{40,41} andererseits die proapoptischen Proteine, welche weiter unterteilt werden in Multidomänenproteine, z.B. das Bcl-2-assoziierte X Protein (Bax) oder das Bcl-2-homologe antagonistische/Killer Protein (Bak), und die sogenannten BH3-only Proteine.^{40,41}

Während der Initiation der Apoptose aktivieren BH3-only Proteine die proapoptischen Proteine Bax und Bak. Diese ändern daraufhin ihre Konformation und lagern sich als Multimere zusammen, um so Poren in der äußeren Mitochondrienmembran zu bilden. Über diese gelangen im weiteren Verlauf Cytochrom C und weitere proapoptische Faktoren aus den Mitochondrien in das Zytoplasma.⁴² Im Zytosol induziert Cytochrom C gemeinsam mit der zentralen Initiatorcaspase des mitochondrialen Signalweges (Caspase 9) die Formation des sogenannten Apoptosoms. Dies aktiviert die bereits oben beschriebene Kaskade von Effektorcaspasen und damit die Exekution der Apoptose.

1.2 Fragestellung

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Induziert Lidocain in klinisch relevanten Konzentrationen Apoptose oder Nekrose an nicht-neuronalen und neuronalen Zellen des Menschen?
- Ist die Toxizität von Lidocain durch genetische Veränderungen von Signalwegen der Apoptose beeinflussbar?
- Kann eine Überexpression von Bcl-2 bzw. eine Defizienz an Caspase 9 und damit Veränderungen des mitochondrialen Weges der Apoptose die Zellen vor Lidocain schützen?
- Kann die Ausschaltung des Todesrezeptorsignalweges (Caspase 8- bzw. FADD-Defizienz) die Induktion von Apoptose durch Lidocain inhibieren?
- Sind die Ergebnisse auf neuronale Zellen des Menschen übertragbar?
- Wird auch in neuronalen Zellen Apoptose durch eine Permeabilisierung der Mitochondrienmembran induziert?
- Lässt sich die Zytotoxizität von Lidocain auf humane, neuronale Zellen durch Inhibition der Signaltransduktion der Apoptose wirksam vermindern?

Die Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es daher, die Rolle des zellulären, antiapoptischen Proteins Bcl-2 für die Lidocain-induzierte Apoptose zu untersuchen. Anhand des Einflusses

von Bcl-2 Proteinexpression auf die Lidocain-induzierte Zytotoxizität sollte die Aktivierung von zelleigenen Apoptosesignalwegen untersucht werden. Mit Hilfe weiterer genetisch veränderter Zelllinien wurde der für die Lidocain-induzierte Apoptose verantwortliche Signalweg identifiziert. Darüber hinaus wurde die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf ein neuronales Zellmodell überprüft und die schützende Wirkung eines Inhibitors der Caspasen vor Lidocain-induzierter Apoptose und Zelltod untersucht.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien und Antikörper

2.1.1 Reagenzien

Alle verwendeten Reagenzien wurden bei der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) erworben, wenn dies nicht anderweitig angegeben ist. Lidocain wurde in der klinisch verwendeten Form als Hydrochloridsalz (20%) erworben (AstraZeneca, London, Großbritannien). Die verwendete phosphat-gepufferte Kochsalzlösung wurde bei Gibco, Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) erworben. Das fluorogene Caspase 3 Substrat N-acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-aminomethyl-coumarin (Ac-DEVD-AMC) wurde bei BIOMOL International (Plymouth Meeting, PA, USA) erworben. Der fluoreszenzkonjugierte Antikörper Annexin V – FITC wurde von BD Biosciences (San Diego, CA, USA) erworben. Der Fluoreszenzfarbstoff 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraacetylbenzimidazolylcarbocyanin iodid (JC-1) und der Pancaspase-Inhibitor N-(2-quinolyl)valyl-aspartyl-(2,6-difluorophenoxy)methylketon (Q-VD) wurden bei Calbiochem (San Diego, CA, USA) erworben.

2.1.2 Antikörper

Zum Nachweis der alterierten Expression von Bcl-2 Protein, sowie der Aktivierung von Caspasen wurden die in Tabelle 1 verzeichneten primären Antikörper verwendet.

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Messung der Aktivierung von Caspase 3 wurden monoklonale Fluorescein-konjugierte Antikörper des Kaninchens gegen humane aktivierte Caspase 3 der Firma BD Biosciences eingesetzt. Als sekundäre Antikörper wurden im Rahmen von Western Blot Nachweisen und Immunfluoreszenz die in Tabelle 2 verzeichneten, mit Meerrettich-Peroxidase bzw. Fluorochrom konjugierten Antikörper verwendet.

Tabelle 1 – Primäre Antikörper

Zielprotein	Herkunftstier	Antikörpertyp	Anbieter
Humanes Bcl-2 Protein	Maus	IgG, monoklonal	Novocastra, Newcastle, Großbritannien
humane Caspase 3	Ziege	IgG, polyklonal	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA
humane Caspase 9	Kaninchen	IgG, polyklonale	England BioLabs Inc., Beverly, MA, USA
humane Caspase 8	Maus	IgG, monoklonal	Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA
Humanes β -Actin	Kaninchen	IgG, polyklonal	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Humanes Cytochrom C	Maus	IgG, monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Humanes Tom 20	Maus	IgG, monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Humanes Bax Protein	Kaninchen	IgG, polyklonal	Upstate, Lake Placid, NY, USA

Tabelle 2 – Sekundäre Antikörper

Zielantikörper	Herkunftstier	Konjugat	Anbieter
Kaninchen	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	Jackson Immunolab, Dianova, Hamburg, Deutschland
Maus	Ziege	Meerrettich-Peroxidase	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA
Ziege	Kaninchen	Meerrettich-Peroxidase	Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL, USA
Kaninchen	Huhn	Fluorochrom Alexa Fluor 488nm	Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Maus	Huhn	Fluorochrom Alexa Fluor 592nm	Molecular Probes, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

2.2 Zellkulturen

Humane T-Lymphomzellen aus der Jurkat Zelllinie wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium kultiviert, welches ergänzt wurde mit 10% fetalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin und jeweils 50 µg/ml Penicillin und Streptomycin. Jurkat Zellen, welche das Bcl-2 Protein stabil überexprimieren sowie die parentale Zelllinie (Klon J16) wurden bereits zuvor beschrieben.⁴³ Caspase 9-defiziente Jurkat Zellen sowie die entsprechende Wildtyp Zelllinie wurden durch Engels et al. sowie Samraj und Mitarbeiter bereits charakterisiert.^{44,45} Jurkat Zellen, welche defizient sind für Caspase 8 bzw. FADD und die parentale Zelllinie (Klon A3) wurden freundlicherweise von Prof. Dr. John Blenis (Harvard Medical School, Boston, Massachusetts) zur Verfügung gestellt.⁴⁶ Humane Neuroblastomzellen vom Typ SHEP wurden bereits zuvor charakterisiert^{47,48} und mit oben beschriebenem Medium kultiviert. Alle Zellkulturen wurden unter gleichen Bedingungen bei konstant gehaltener Luftfeuchtigkeit, 37°C Lufttemperatur und einem Kohlenstoffdioxidanteil von 5% kultiviert.

2.3 Experimentelles Protokoll zur Lidocain-Exposition

Zu Beginn aller Experimente wurden die Jurkat-Zellkulturen mit vollständigem Medium inkubiert und auf eine Zelldichte von 4×10^5 Zellen/ml verdünnt, um logarithmisches Wachstum sicher zu stellen. Anschließend wurden die Zellen abhängig vom geplanten Nachweisverfahren in vorgeschriebener Dichte angesetzt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche nur mit Standardmedium kultiviert wurden. Der proapoptotisch wirkende Proteinkinaseinhibitor Staurosporin wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Lidocain wurde in steigenden Konzentrationen von 3 mM bis 12 mM dem Zellkulturmedium zugesetzt und die Zellen unter Standardbedingungen abhängig vom Nachweisverfahren für 6 bis 24 Stunden inkubiert. In den Versuchen mit Caspaseinhibition wurden die untersuchten Neuroblastomzellen für eine Stunde mit dem Pancaspase-Inhibitor Q-VD in einer Konzentration von 10 µM in Standardzellkulturmedium vorbehandelt.

2.4 Nachweisverfahren

2.4.1 Bestimmung von Zellvitalität

Zur Untersuchung der Zellvitalität wurde die Zelldichte auf 5×10^5 Zellen/ml adjustiert und Proben mit einem Volumen von 5 ml und den zu untersuchenden Konzentrationen von Lidocain und Kontrollen vorbereitet. Nach Ende der Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen resuspendiert und 10 μ l von jeder Probe mit 90 μ l Trypan Blau Lösung gefärbt. Mikroskopisch wurde unmittelbar die Vitalität der Zellen anhand der Anfärbung avitaler Zellen durch Trypan Blau ermittelt. Hierzu wurden je 4 Messfelder einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und das Verhältnis von ungefärbten (vitalen) und gefärbten (avitalen) Zellen bestimmt.

2.4.2 Messung der Aktivität von Caspase 3

Um die Aktivierung von Caspase 3 im Rahmen von Apoptoseinduktion von Lidocain zu untersuchen, wurde die Zelldichte auf 5×10^5 Zellen/ml adjustiert und Proben mit einem Volumen von 15 ml vorbereitet. Nach 24-stündiger Inkubation mit Lidocain oder Kontrollmedium wurden die Zellen entnommen und für 20 Minuten mit Hochsalzpuffer lysiert. Hierzu diente ein auf pH 7,5 eingestellter Puffer aus 150 mM Natriumchlorid, 50 mM Tris-Hydrochlorid, 1% NP-40 sowie 1 μ M Pepstatin, 0,1 μ M Phenylmethylsulphonylfluorid, 0,15 μ M Aprotinin und 1 μ M Leupeptin als Proteaseinhibitoren. Die gewonnenen Lysate wurden bei 4°C für 15 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und die Überstände anschließend gesammelt und bei 4°C gelagert. Mit Hilfe des BCA Messverfahrens (Pierce, Rockford, IL, USA) wurden die Proteinkonzentrationen der Proben unter Verwendung eines Standards mit Bovinem Serum Albumin spektroskopisch bestimmt und anschließend in allen Proben auf 1 μ g/ μ l durch Zugabe von Lysepuffer adjustiert. Die BCA-Methode ist ein sehr empfindlicher Proteinnachweis. Peptidbindungen und die vier Aminosäuren Cystein, Cystin, Tryptophan und Tyrosin sollen für die Bestimmung bedeutsam sein. Die Bildung von Cu(I)-Ionen durch Proteine unter alkalischen Bedingungen entspricht dabei der Biuret Bestimmungsmethode.

Ein Cu(I)-Ion wird dann durch zwei Moleküle BCA zu einem roten Farbkomplex gebunden, welcher sehr empfindlich spektroskopisch nachgewiesen werden kann.

Je 50 µl der adjustierten Proben wurden mit 150 µl Substratpuffer gemischt und ausgewertet. Der verwendete Substratpuffer bestand aus 50 mM HEPES, 100 mM Natriumchlorid, 10% Saccharose, 0,1% 3-[3-Cholamidopropyl]demethyl-ammonio]-1-propanesulfat und 10 mM Dithiothreitol sowie 50 µM des fluorogenen Caspase 3-Substrates Ac-DEVD-AMC. Die Caspase 3 Aktivität wurde alle 10 Minuten anhand der Fluoreszenz des freigesetzten AMC bei 440 nm mit Hilfe eines Lambda Fluro 320 Plus Fluorometers (Biotek, Bad Friedrichshall, Deutschland) bei 37°C gemessen, bis die Aktivitätswerte der Positivkontrolle ein Plateau erreichten.

Für die Analyse der verwendeten Neuroblastomzellen wurde eine durchflusszytometrische Methode gewählt. Hierzu wurden nach Inkubation mit Lidocain oder Kontrollmedium über 12 Stunden je 4×10^5 Zellen pro Probe entnommen und durch Behandlung mit 4% Formaldehyd für 5 Minuten bei 37°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweifach mit PBS-Puffer gewaschen und in 80 µl eines Puffers bestehend aus 3% bovinem Serum Albumin und 0,05% Saponin in PBS aufgenommen. Durch Zugabe des monoklonalen Antikörpers C92-605 (BD Biosciences Pharmingen) gegen aktivierte humane Caspase 3 in einem Volumen von 20 µl wurden anschließend die Zellen mit nachweisbarer Caspase 3 Aktivierung markiert. Nach lichtgeschützter Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut gewaschen und in 250 µl des oben beschriebenen Puffers resuspendiert. In der unmittelbar anschließenden durchflusszytometrischen Analyse wurde der prozentuale Anteil der Zellen mit gegenüber der Kontrolle gesteigerter Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 530 nm ermittelt.

2.4.3 Veränderungen des mitochondrialen Membranpotentials

Beim Einbau von Poren in die äußere Mitochondrienmembran kommt es zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Dies ist ein frühes Ereignis der Apoptose und geht der Aktivierung von Caspasen voraus. Das mitochondriale Membranpotential ($\Delta\Psi_m$) wurde mit Hilfe des für $\Delta\Psi_m$ -spezifischen Farbstoffes JC-1 gemessen⁴⁹. Bei dem Farbstoff handelt es sich um ein membranpermeables Cyanid mit einer delokalisierten positiven Ladung. Der Farbstoff kann sowohl in monomerer Form als auch in Aggregatform vorliegen. Die monomere Form wird in die Mitochondrienmatrix eingeschleust. Da es sich um ein positiv

geladenes Molekül handelt, nimmt der Einstrom mit dem Anstieg des mitochondrialen Membranpotentials zu. Bei einem Schwellenwert des $\Delta\Psi_m$ von 80 bis 100 mV werden reversibel JC-1-Aggregate gebildet. Die monomere Form des JC-1 emittiert nach Laseranregung Licht einer Wellenlänge von 527 nm im grünen Bereich, die Aggregatform orange-rotes Licht einer Wellenlänge von 590 nm. Somit weisen Zellen mit hohem mitochondrialem Membranpotential eine orange-rote Fluoreszenz, Zellen mit niedrigem mitochondrialem Membranpotential eine grüne Fluoreszenz auf.

Für die Messung wurden nach 24-stündiger Inkubation der Zellkulturen mit Lidocain oder Kontrollmedium je 5×10 Zellen pro Probe zweifach mit PBS Puffer bei 4°C gewaschen und anschließend 20 Minuten lichtgeschützt mit JC-1 in einer Konzentration von 10 µg/ml in PBS Puffer gefärbt. Im Anschluss wurden die Proben erneut zweifach mit PBS Puffer gewaschen und in 250 µl PBS Puffer resuspendiert. Danach wurden die Proben unmittelbar mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei wurden je 10.000 Zellen je Probe hinsichtlich ihrer Fluoreszenz analysiert. Der Verlust von $\Delta\Psi_m$ wurde detektiert anhand eines erhöhten Verhältnisses von grüner zu orangefarbener Fluoreszenzintensität der gefärbten Mitochondrien⁵⁰ und der prozentuale Anteil von Zellen mit verringertem $\Delta\Psi_m$ wurde hierdurch ermittelt.

2.4.4 Western Blot Analyse

Für die durchgeführten Western Blot Analysen wurde die Zelldichte jeweils auf 5×10^5 Zellen/ml adjustiert und Proben mit einem Volumen von 15 ml in Zellkulturschalen vorbereitet. Nach 24-stündiger Inkubation mit Lidocain oder Kontrollmedium wurden die Zellen entnommen und für 20 Minuten mit Hochsalzpuffer lysiert. Hierzu diente ein auf pH 7,5 eingestellter Puffer aus 150 mM Natriumchlorid, 50 mM Tris-Hydrochlorid, 1% NP-40 sowie 1 µM Pepstatin, 0,1 µM Phenylmethylsulphonylfluorid, 0,15 µM Aprotinin und 1 µM Leupeptin als Proteaseinhibitoren. Die gewonnenen Lysate wurden bei 4°C für 15 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert und die Überstände anschließend gesammelt und bei 4°C gelagert. Mit Hilfe des BCA Messverfahrens (Pierce, Rockford, IL, USA) wurden die Proteinkonzentrationen der Proben fluorometrisch bestimmt und anschließend in allen Proben auf 1 µg/µl durch Zugabe von Lysepuffer adjustiert. Je 20 µl dieser Proben (entspricht 20 µg Protein) wurden auf ein Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid Gel (SDS-PAGE) aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

in SDS-haltigen Polyacrylamidgelen erfolgte nach der Methode von Lämmli.⁵¹ Die Proteine (20 µg) wurden vor dem Auftragen in gleichem Volumen SDS-Ladepuffer für 10 min bei 95 °C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Stromspannung von 200 V bis zum Erreichen einer Trennstrecke von 8 cm. Als Molekulargewichtsstandard diente der *Biotinylated Protein Ladder*-Standard der Firma Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ, USA) transferiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer mit WB-Transferpuffer gefüllten Kammer (Transblot SD Cell, Biorad, München) nach dem Prinzip des Nassblottings mit einem Stromfluß von 1 mA/cm² über eine Stunde bei 4°C. Die anschließende Blockierung wurde mit Phosphatpuffer (PBS), 0,05% Tween-20 und 4% bovinem Serumalbumin durchgeführt. Die Membran wurde mit dem primären Antikörper für 12 Stunden bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Nach erneutem Waschen mit Blockpuffer wurde ein an Meerrettich-Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem, dreimal 10-minütigem Waschen mit 0,05% Tween-20 in PBS Puffer wurde die Membran für 5 Minuten mit einer Lösung des verstärkten Chemolumineszenz-Systems ECL (Amersham Buchler, Braunschweig, Germany) behandelt, in einer Klarsichtfolie verpackt und anschließend ein Röntgenfilm exponiert.

2.4.5 Mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C

Zur Analyse der Freisetzung von Cytochrom C wurde zunächst eine Zellfraktionierung durchgeführt. Hierzu wurden nach Abschluss der Inkubation mit Lidocain oder Kontrollmedium jeweils 3×10^5 Zellen pro Probe entnommen und für 15 Minuten bei 4°C permeabilisiert. Hierzu wurden je Probe 500µl einer Lösung aus Digitonin in einer Konzentration von 50 µg/ml hinzugegeben, welche zusätzlich 250 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 1,5 mM MgCl₂, 10 mM Kaliumchlorid, je 1 mM EDTA und EGTA, 1 mM Dithiothreitol, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid enthielt sowie je 2 µg/ml der Proteaseinhibitoren Aprotinin, Pepstatin und Leupeptin. Anschließend wurden die Proben in einem Zeitraum von 60 Sekunden je 20mal durch eine 21-gauge Injektionsnadel resuspendiert um die Zellmembranen aufzubrechen. Im Anschluss wurden die Proben für 5 Minuten bei 4°C und 1.000 g zentrifugiert um die Zellkerne zu entfernen. Der Überstand wurde entnommen und bei 4°C und 10.000 g für 15 Minuten zentrifugiert, um die zytosolische

Zellfraktion im Überstand zu erhalten. Das die Mitochondrien enthaltende Sediment wurden mit dem oben beschriebenen Hochsalz-Puffer für 20 Minuten bei 4°C lysiert und die mitochondriale Zellfraktion durch anschließende Zentrifugation bei 4°C und 10.000g im Überstand isoliert. Die Proben der gewonnenen Zellfraktionen wurden nach Bestimmung der Proteinkonzentration wie oben beschrieben auf 1 µg/µl Proteingehalt adjustiert und mit Hilfe einer wie oben beschrieben ausgeführten Western Blot Analyse untersucht. Hierbei diente ein Antikörper gegen das mitochondriale Protein Tom20 dazu, den Erfolg der Fraktionierung zu überprüfen, während ein Antikörper gegen humanes Cytochrom C zur Bestimmung des Ausmaßes mitochondrialer Cytochrom C Freisetzung in das Zytosol verwendet wurde.

2.4.6 Annexin V – PI Doppelfärbung zum Nachweis früher Apoptose

Um den Anteil von Zellen zu bestimmen, welche sich in einer frühen Phase der Apoptose befinden, wurden die Zellen nach einer Färbung mit den Farbstoffen Annexin V und Propidiumjodid (PI) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. In einer frühen Phase der Apoptose kommt es zu einer zunehmenden Externalisierung von Phosphatidylserinen auf der äußeren Zellmembran, welche bei einer vitalen Zelle asymmetrisch, überwiegend auf der Innenseite der Membran angeordnet sind. Der Farbstoff Annexin V, welcher an das Fluorochrom Fluoreszein (FITC) gebunden ist, bindet an externalisiertes Phosphatidylserin und markiert damit Zellen in einer frühen Phase der Apoptose. Zellen, welche sich in einer weiter fortgeschrittenen Phase der Apoptose befinden, werden zunehmend permeabler für Annexin V, welches hierdurch zunehmend auch Phosphatidylserin auf der Innenseite der Zellmembran binden kann. Um diese Zellen mit einer bereits beeinträchtigten Membranintegrität diskriminieren zu können, wurde zusätzlich der Farbstoff Propidiumjodid verwendet. Dieser gelangt ebenfalls über bereits permeable Zellmembranen in die Zelle und färbt dort die DNA im Zellkern an. Daraus erschließt sich, dass sich Zellen, die sich nach dieser Methode nur mit Annexin V anfärben, in einer frühen Phase der Apoptose befinden. Zellen, welche sich mit beiden Farbstoffen anfärben, befinden sich dagegen in einem fortgeschritten Stadium der Apoptose oder primärer Nekrose.

Zur Durchführung der Färbung wurden nach Abschluss der Inkubation je 2×10^5 Zellen pro Probe entnommen und nach zweimaligen Waschen mit PBS in 100 µl eines speziellen Puffers aufgenommen, welcher die Bindung von Annexin V ermöglicht. Dieser bestand aus 10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂ und war mittels Titration mit NaOH auf einen pH-

Wert von 7,4 eingestellt. Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 5 μl Annexin V und 10 μl PI (20 $\mu\text{g/ml}$) lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 15 Minuten gefärbt und unmittelbar danach mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.4.7 Oligomerisierung von Bax Protein an mitochondrialen Membranen

Um zu prüfen, inwiefern das proapoptotische Protein Bax an der Transduktion der Lidocain-induzierten Apoptose beteiligt ist, wurden Neuroblastomzellen für 6 und 12 Stunden mit Lidocain in den angegebenen Konzentrationen und Kontrollmedium auf zuvor mit Poly-D-Lysin und Laminin beschichteten Objektträgern mit je 8 montierten Wells zu Zellkulturzwecken (Falcon CultureSlides, BD Biosciences) inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation wurden die Objektträger zweifach mit PBS gewaschen und für 15 Minuten mit 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert. Um unspezifische Bindungen zu reduzieren wurden die Objektträger für 12 Stunden bei 4°C in einer Lösung aus 3% bovinem Serumalbumin und 0,05% Saponin behandelt und anschließend für weitere 12 Stunden mit Antikörpern gegen die NT-Domäne von humanem Bax Protein (5 $\mu\text{g/ml}$) sowie mit Antikörpern gegen das mitochondriale Membranprotein Tom20 (1 $\mu\text{g/ml}$) inkubiert. Proben unter Verwendung von je nur einem Typ der 1. Antikörper wurden ebenfalls angefertigt um Kreuzreaktionen erkennen zu können. Als 2. Antikörper wurden *Alexa Fluor* Antikörper für 12 Stunden bei 4°C verwendet, welche nach Anregung Fluoreszenz der Wellenlänge 488 nm bzw. 592 nm emittieren und hierdurch gebundene Bax-Antikörper in grüner Fluoreszenz sichtbar machen, während gebundene Tom20-Antikörper mit roter Fluoreszenz sichtbar werden. Nach dreifachem Waschen der Objektträger in PBS wurden diese lichtmikroskopisch in Übersichtsvergrößerungen ausgewertet und die Zahl von Zellen mit sichtbarer Oligomerisation von Bax Protein zwischen den Proben verglichen. Um eine verbesserte Darstellung der räumlichen Anordnung von Bax Protein und mitochondrialem Membranprotein Tom20 mittels Einzelzell- und Detailaufnahmen zu erreichen, wurden die Objektträger anschließend mit je 10 μl Fluoromount-G (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) und Deckgläschen versiegelt und mittels konfokaler Laser-Rastermikroskopie untersucht. Hierbei tastet ein Laserstrahl punktweise ein Objekt ab, wobei er in der Fokusebene der zu mikroskopierenden Probe maximal fokussiert ist. Es werden nun die Fluoreszenzmoleküle angeregt, die sich im Lichtweg des fokussierten Laserstrahles befinden. Bildet man die Fluoreszenzsignale nun wieder auf einer Bildebene ab, vor der sich eine kleine

Lochblende befindet, so können nur die Signale, die aus der Fokusebene kommen, exakt durch diese Blende fallen. Die Signalanteile, die aus anderen Ebenen oberhalb oder unterhalb der Fokusebene in der Probe stammen, werden dadurch ausgeblendet und es kommt zu einer detailreichen Schichtaufnahme.

2.5 Durchflusszytometrie

Alle durchflusszytometrischen Analysen wurden mit Hilfe eines Durchflusszytometers mit der Bezeichnung FACS Calibur der Firma Becton Dickinson (BD) Biosciences durchgeführt. Die Abkürzung FACS steht hierbei für *fluorescence-activated cell sorting*. Diese Technik ermöglicht das Zählen und die Analyse von physikalischen und molekularen Eigenschaften von Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Proben bestimmte Eigenschaften von Zellen oder Zellpopulationen auf Einzelzellebene zu dokumentieren. Die Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse eignet sich daher als Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen. Grundlage ist die Antigen-Antikörper-Reaktion, die mit Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern durchgeführt wird. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung einzeln an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbeigeleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie in Form von Photonen auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle. Zusätzlich werden durch die Beugung und Streuung des Lichtes Informationen über die Zellgröße und die Binnenstruktur (z.B. Granularität des Zytoplasmas, Größe des Zellkerns) der Zellen gewonnen. Eine gleichzeitige FACS - Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen wie Annexin V und Propidiumjodid ist möglich, da sich die eingesetzten Farbstoffe zwar häufig bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emmissionsspektren verfügen.⁵²⁻⁵⁴ Für die bei dieser Untersuchung durchgeführten Versuche wurden je Probe 10.000 Zellen auf die beschriebene Weise analysiert. Die anschließende Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der Software *CellQuest Pro* (BD Biosciences).

2.6 Statistische Auswertungen

Alle Versuche wurden mindestens dreifach durchgeführt und die Resultate sind in Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die Berechnungen wurden mit Hilfe des Statistikprogrammes *SPSS* in der Version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Vergleiche zwischen den Behandlungsgruppen wurden mittels Mann-Whitney U Test durchgeführt und für multiples Testen korrigiert, falls notwendig (Bonferroni - Korrektur). Bei einem $P < 0,05$ wurden die gefundenen Unterschiede als signifikant angenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Der dosisabhängige Effekt von Lidocain auf Jurkat Wildtypzellen

Lidocain-induzierter Zelltod wurde gemessen nach Inkubation von Jurkat Wildtypzellen mit steigenden Konzentrationen von Lidocain (3 mM \approx 0.08%, 6 mM \approx 0.18% und 10 mM \approx 0.27%) für 24 Stunden. In einem ersten Versuchsansatz wurde das Auftreten von generellem Zelltod durch eine Färbung mit Trypan Blau untersucht. Mit Hilfe dieser Färbung lassen sich avitale Zellen in der Lichtmikroskopie blau anfärben, während vitale Zellen ungefärbt bleiben. Hierbei zeigte sich, dass Lidocain dosisabhängig Zelltod induzierte, ebenso wie der unspezifische Proteinkinaseinhibitor Staurosporin, welcher als Positivkontrolle diente (Abb. 2).

Abbildung 2

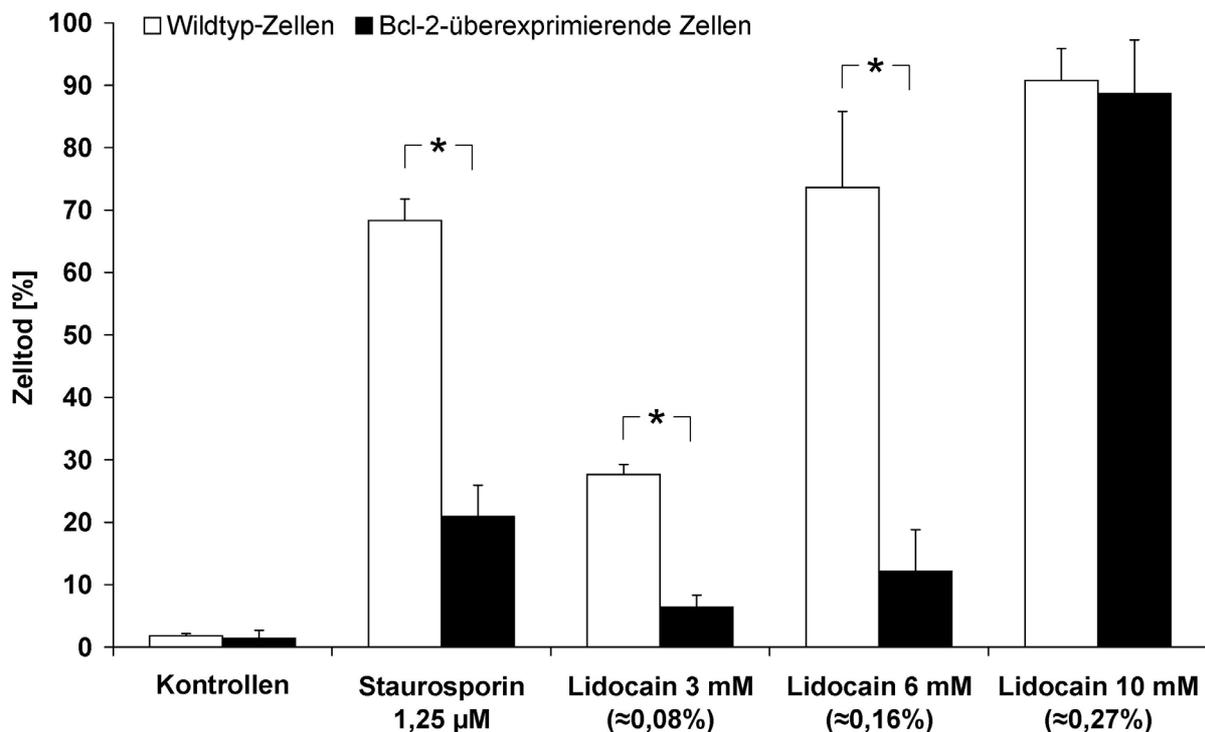
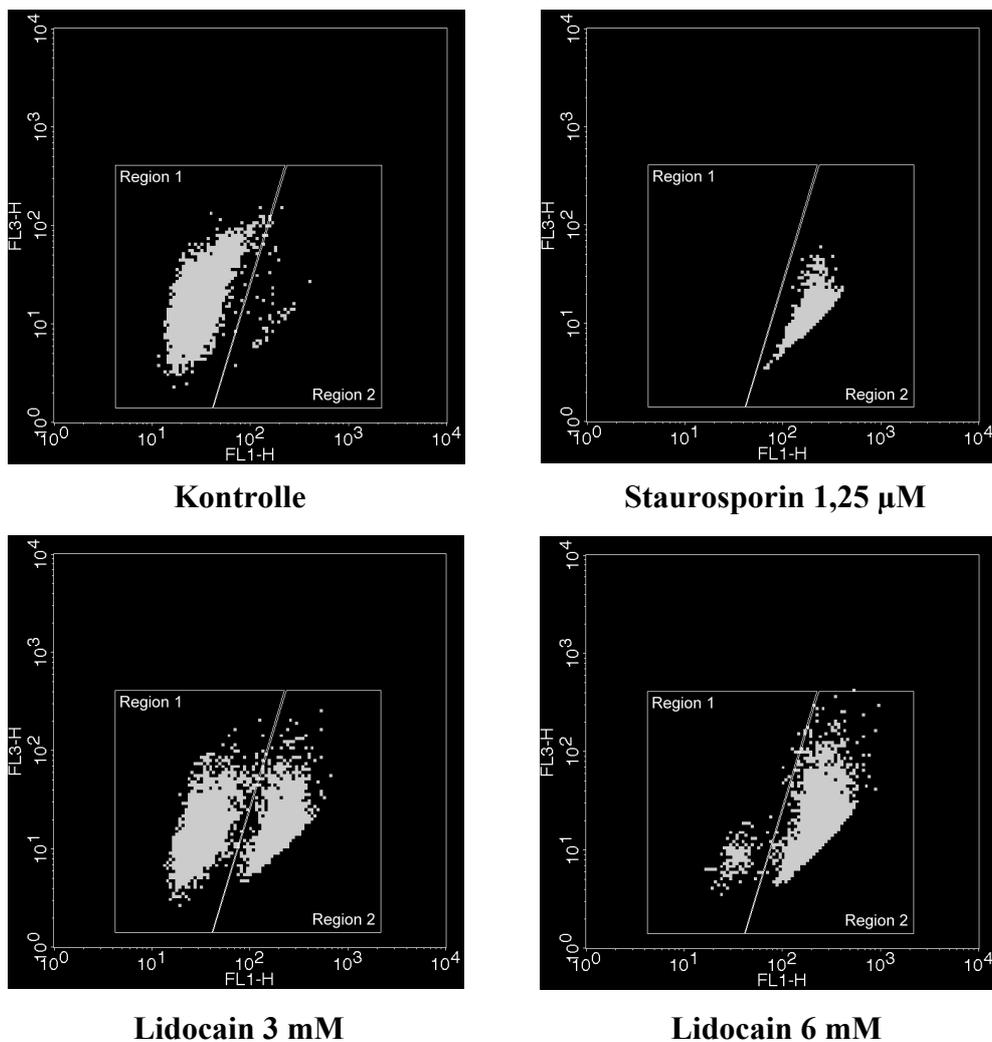


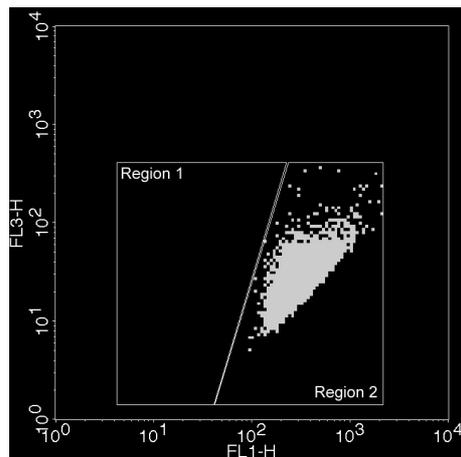
Abbildung 2: Lidocain-induzierter Zelltod in B-Zell Lymphom-2 Protein (Bcl-2)-überexprimierenden Zellen verglichen mit der Parentalzelllinie. Jurkat T-Lymphomzellen und Jurkat Zellen, welche das Protein Bcl-2 überexprimieren wurden mit den angezeigten Konzentrationen von Lidocain oder 1,25 µM Staurosporin (STS) als Positivkontrolle. Nach 24 Stunden wurde das Auftreten von Zelltod mittels Trypan Blau Färbung

lichtmikroskopisch ermittelt. Bcl-2-Überexpression schützte vor Lidocain-induziertem Zelltod nach Behandlung mit Konzentrationen von 3 mM ($\approx 0,08\%$) und 6 mM ($\approx 0,16\%$), während nach Inkubation mit 10 mM ($\approx 0,27\%$) Lidocain kein Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar war. Die Fehlerbalken stellen eine Standardabweichung dar, ein Sternchen (*) zeigt signifikante Unterschiede an ($P < 0,05$).

Weiterhin führte die Behandlung mit Lidocain, ebenso wie Staurosporin zu einer deutlichen Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$), was als eines der ersten messbaren Zeichen der Apoptose gilt. Durchflusszytometrische Analysen wiesen einen Verlust von $\Delta\Psi_m$ bei einem Anteil der mit 3 mM Lidocain behandelten Zellen von $39,1 \pm 12,2\%$ Zellen nach. Dieser Anteil war nach Behandlung mit 6 mM Lidocain mit $84,6 \pm 15,5\%$ signifikant höher und stieg nach Behandlung mit 10 mM Lidocain auf $98,8 \pm 1,2\%$ an (Abb. 3 und 4).

Abbildung 3





Lidocain 10 mM

Abbildung 3: Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung des mitochondrialen Membranpotentials von Jurkat Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Lidocain. Durch die Reduktion des Potentials verändert sich die Fluoreszenz der mit dem Farbstoff JC-1 behandelten Zellen in Form einer deutlichen Zunahme der Fluoreszenz im grünen Bereich (527 nm, FL1-H) und einer leichten Abnahme der Fluoreszenz im orange-roten Bereich (590nm, FL3-H). Die Region 1 wurde mit Hilfe von unbehandelten Kontrollen definiert, d.h. sie umfasst alle analysierten Zellen einer Probe mit intaktem mitochondrialen Membranpotential. Die Region 2 wurde anhand von Positivkontrollen (d.h. Staurosporin-behandelten Zellen) definiert und gibt daher den Bereich wieder, in dem sich Zellen darstellen, deren mitochondriales Membranpotential stark reduziert ist. Lidocain führte dosisabhängig zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, erkennbar an der abnehmenden Zellzahl in Region 1 und der bei steigenden Konzentrationen zunehmenden Zellzahl in Region 2.

Abbildung 4

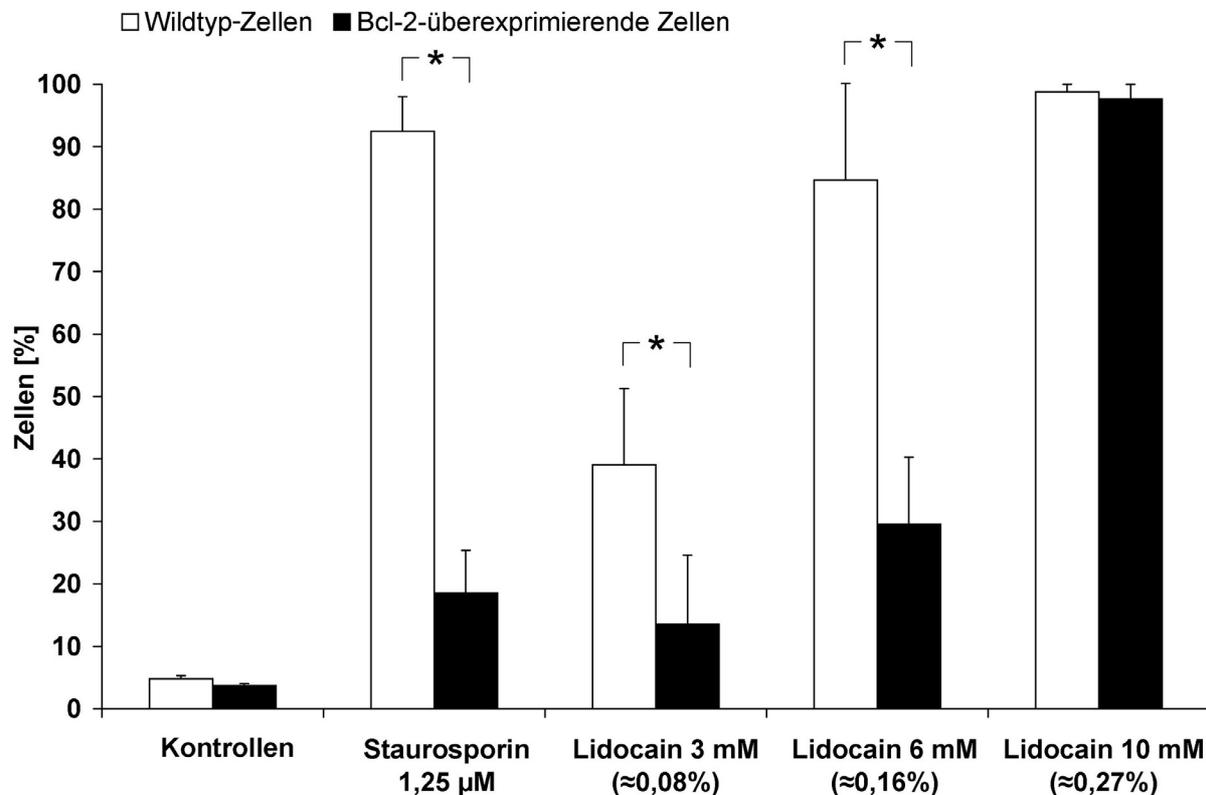


Abbildung 4: Lidocain induziert einen Verlust von mitochondrialem Membranpotential, welches durch die Überexpression von Bcl-2 weitestgehend erhalten bleibt. Jurkat Wildtypzellen und Bcl-2-Überexprimierende Jurkat Zellen wurden für 24 Stunden mit 1,25 µM Staurosporin (STS) oder angezeigten Konzentrationen von Lidocain inkubiert. Anschließend wurde der Anteil von Zellen mit Verlust des mitochondrialen Membranpotentials durch Färbung der mit dem potentiometrischen Farbstoff JC-1 durchflusszytometrisch gemessen. Die Fehlerbalken stellen eine Standardabweichung dar, ein Sternchen (*) zeigt signifikante Unterschiede an ($P < 0,05$).

Da die Aktivierung von Caspase 3 ein manifestes Merkmal der Exekutionsphase der Apoptose darstellt, wurde die Aktivität von Caspase 3 durch Messung der Spaltung des für Caspase 3 spezifischen fluorogenen Substrates Ac-DEVD-AMC bestimmt. Die Messungen zeigten, dass die Behandlung mit 3 mM Lidocain für 24 Stunden die Aktivität von Caspase 3 auf das 9,0-fache steigerte, verglichen mit unbehandelten Kontrollen. Nach Inkubation der Jurkat Zellen mit Lidocain in einer Konzentration von 6 mM stieg die Aktivität von Caspase 3 auf das 11,6-fache der Werte von unbehandelten Kontrollen. Inkubation mit höheren

Konzentrationen von Lidocain (ab 10 mM) führte dagegen nicht zu einer messbaren Aktivierung von Caspase 3 (s. Abb. 5).

Abbildung 5

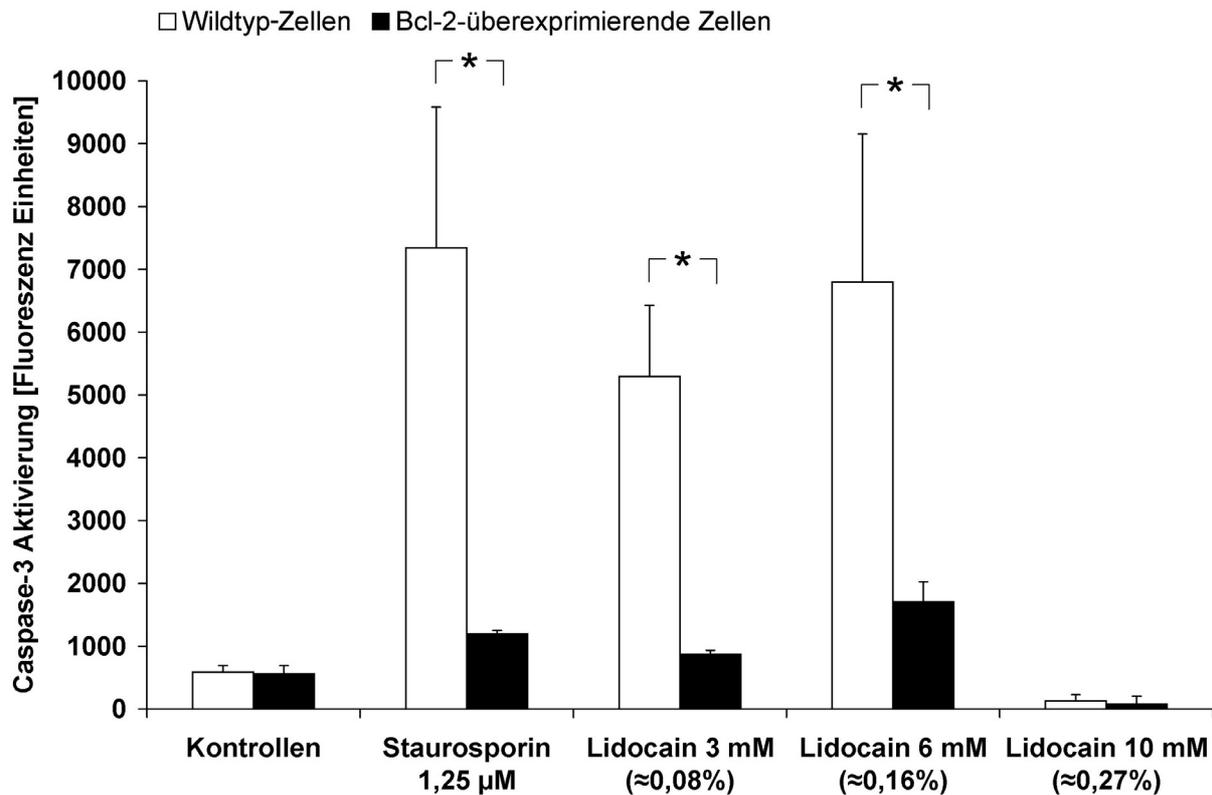


Abbildung 5: Aktivierung von Caspase 3 durch Lidocain in Jurkat Wildtypzellen und B-cell lymphoma-2 Protein (Bcl-2)-überexprimierenden Zellen. Die Aktivität von Caspase 3 wurde nach 12-stündiger Behandlung mit Staurosporin oder Lidocain in den angegebenen Konzentrationen unter Einsatz des fluorogenen Substrates Ac-DEVD-AMC für Caspase 3 gemessen. Die Überexpression von Bcl-2 Protein reduzierte die durch Inkubation mit 3-6 mM Lidocain-induzierte Aktivierung von Caspase 3 deutlich, während die Behandlung mit 10 mM Lidocain in beiden Zelllinien zu keiner messbaren Caspase 3-Aktivierung führte. Die Fehlerbalken stellen eine Standardabweichung dar, ein Sternchen (*) zeigt signifikante Unterschiede an ($P < 0,05$).

Die Aktivierung von Caspase 3 durch Lidocain konnte mittels Nachweis der proteolytischen Spaltung der inaktiven Procaspase 3 in der Westernblot Analyse bestätigt werden (Abb. 6). Hier zeigte sich darüber hinaus auch eine Abnahme von Procaspase 9, der inaktiven Proform der zentralen Initiatorcaspase des mitochondrialen Signalwegs, während der Gehalt an inaktiver Caspase 8 weitestgehend unverändert blieb. Während niedrigere Konzentrationen von Lidocain (3 – 6 mM) die Apoptose - assoziierten Veränderungen induzierten, führte die

Inkubation mit 10 mM Lidocain nicht zu einer nachweisbaren Aktivierung von Caspasen, was auf einen überwiegend auf Nekrose zurückzuführenden Zelltod hinweist.

Abbildung 6

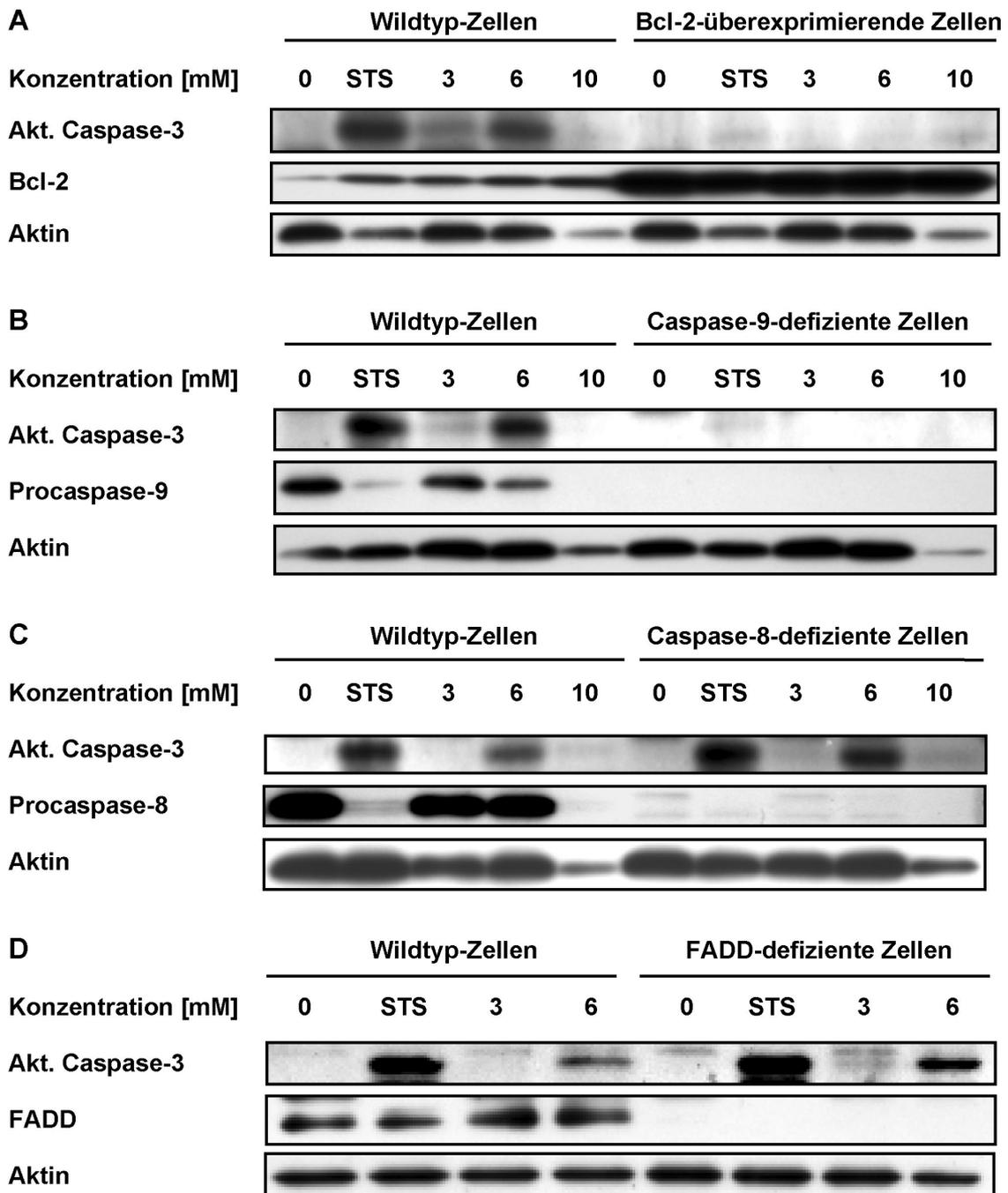


Abbildung 6: Westernblot Analysen der Aktivierung von Caspase 3 an genetisch veränderten Jurkat Zelllinien durch Inkubation mit Lidocain. Wildtypzellen und Bcl-2-überexprimierende Jurkat Zellen (A) sowie Zellen, welche Defizient für Caspase 9 (B), Caspase 8 (C) oder das fas-assoziierte Protein mit

Todesdomäne FADD (D) waren wurden mit 1,25 μ M Staurosporin oder den angegebenen Konzentrationen von Lidocain behandelt. Nach 12 Stunden Behandlung wurden Lysate der Proben hergestellt und unter der Verwendung von Antikörpern gegen Caspase 8, Caspase 9, Bcl-2 und die gespaltene, aktive Form von Caspase 3 mittels Westernblot untersucht. Als Ladekontrolle wurde die Expression von Actin analysiert. Während sich bei Wildtypzellen nach Inkubation mit 3 mM (\approx 0,08%) und 6 mM (\approx 0,16%) Lidocain eine ausgeprägte Aktivierung von Caspase 3 zeigte, wie sie auch nach Inkubation mit Staurosporin festgestellt wurde, war bei Bcl-2-überexprimierenden Zellen keine Aktivierung von Caspase 3 festzustellen (A). Ähnliche Befunde zeigten sich ebenfalls bei Caspase 9-defizienten Jurkat Zellen (B). Im Gegensatz dazu zeigte die Defizienz von Caspase 8 oder FADD keinerlei Einfluss auf die Aktivierung von Caspase 3 (C bzw. D) im Vergleich zu parentalen Wildtypzellen. In allen verwendeten Zelllinien führte die Inkubation mit 10 mM Lidocain zu keiner messbaren Aktivierung von Caspase 3, was auf einen überwiegend auf Nekrose zurückzuführenden Zelltod hinweist.

Zusätzlich zu der Aktivierung von Caspasen konnte eine mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol nach Inkubation nachgewiesen werden (Abb. 7). Dies war besonders ausgeprägt nach Inkubation mit 3-6 mM Lidocain und weniger eindeutig nach Inkubation mit 10 mM Lidocain.

Abbildung 7

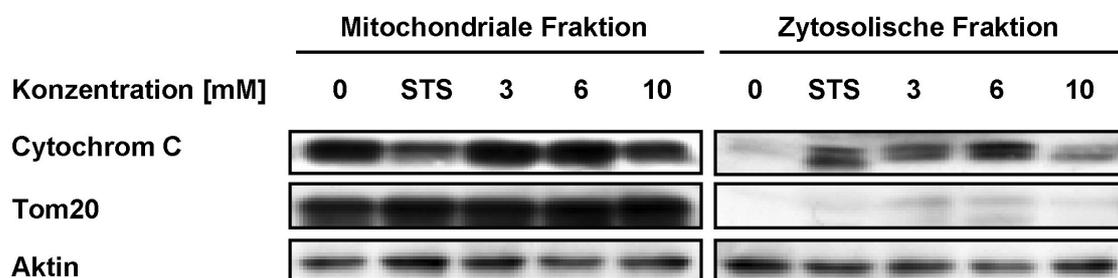
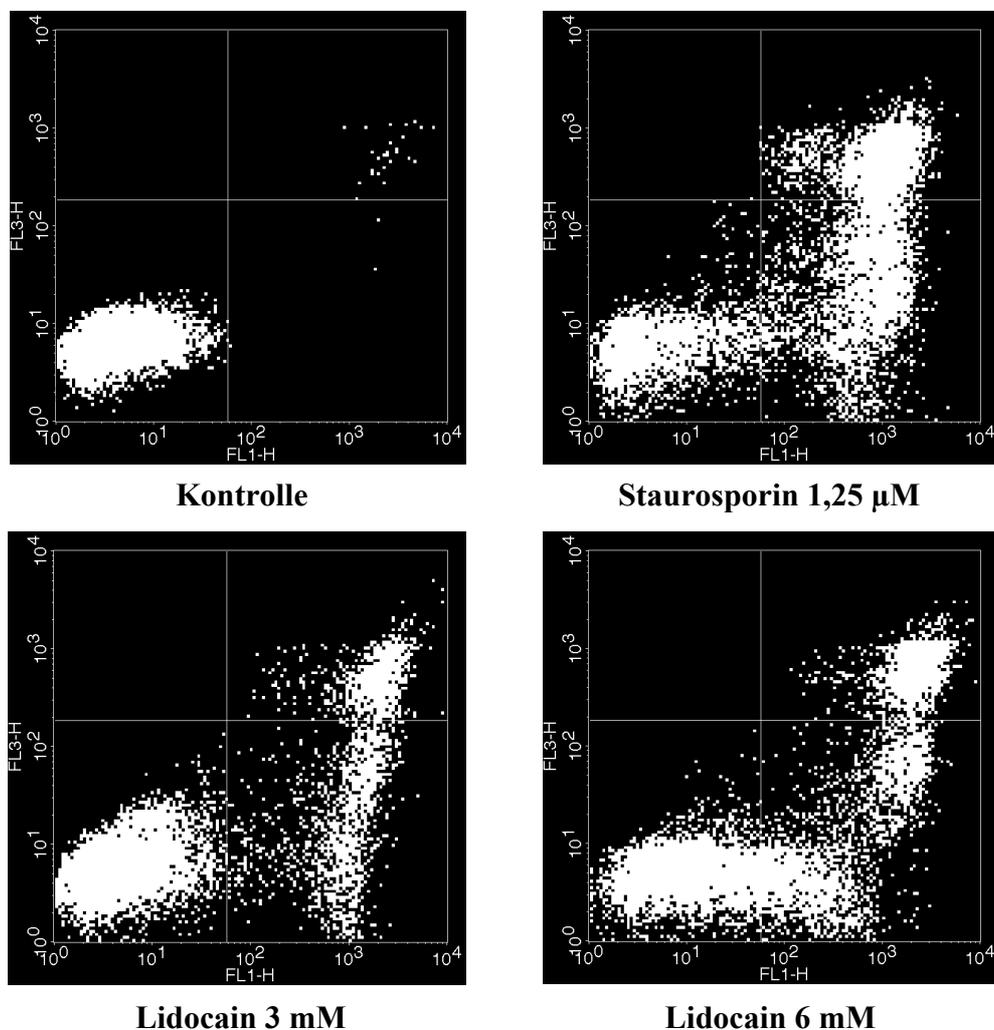
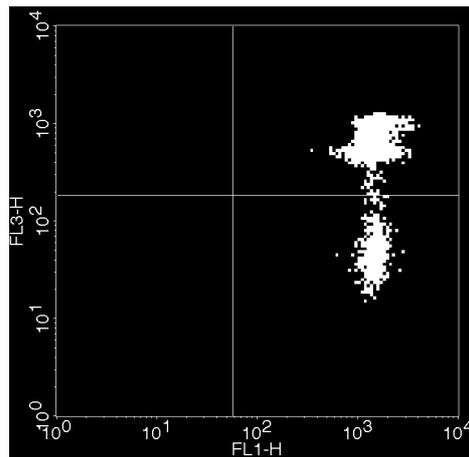


Abbildung 7: Westernblot Analyse der mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom C durch Behandlung von Jurkat Zellen mit Lidocain. Zur Bewertung der Rolle von Cytochrom C für die Lidocain-induzierte Apoptose wurde die Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien nach Inkubation von Jurkat Zellen mit 1,25 μ M Staurosporin als Positivkontrolle und 3 bis 10 mM Lidocain analysiert. Nach 12-stündiger Behandlung wurden die Lysate der zytosolischen und mitochondrialen Zellfraktionen mittels Westernblot Analyse auf ihren Cytochrom C Gehalt hin untersucht (E). Um die erfolgreiche Trennung der Zellfraktionen zu überprüfen, wurde die Translocase der äußeren Mitochondrienmembran 20 (Tom20) mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytosol konnte somit eindeutig nach Inkubation mit 3 und 6 mM Lidocain festgestellt werden, weniger ausgeprägt nach Inkubation mit 10 mM Lidocain.

Ein weiteres Zeichen für ablaufende frühe Apoptose ist die Externalisierung von Phosphatidylserinen auf einer noch integeren äußeren Zellmembran, was sich mittels Annexin

V und Propidiumjodid Doppelfärbung untersuchen lässt. Frühapoptotische Zellen, welche positiv für Annexin V, aber negativ für Phosphatidylserinanreicherung waren, konnten nach Behandlung mit 3-6 mM Lidocain und in einem Inkubationszeitraum von 2 bis 12 Stunden nachgewiesen werden. Der größte Anteil frühapoptotischer Zellen wurde nach 12-stündiger Behandlung mit 6 mM Lidocain festgestellt, vergleichbar mit dem Ergebnis nach Inkubation mit Staurosporin (Abb. 8 und 9). Die Behandlung mit 10 mM Lidocain führte nicht zu einer Erhöhung des Anteils frühapoptotischer Zellen, aber zu einer Zunahme von Nekrose, erkennbar an einem Anteil von $93,8 \pm 5,2$ % doppelt positiver Zellen nach 12 Stunden Behandlung (Abb. 9).

Abbildung 8



Lidocain 10 mM

Abbildung 8: Durchflusszytometrischer Nachweis von Apoptose mittels Annexin V und Propidiumjodid Doppelfärbung. Durch die Externalisierung von Phosphatidylserin in einer frühen Phase der Apoptose kommt es zu einer vermehrten Bindung des Farbstoffs Annexin V. Da dieser in der durchgeführten Untersuchung mit dem grün fluoreszierenden Farbstoff FITC konjugiert war, steigt die Intensität der Fluoreszenz im grünen Bereich (527nm, FL1-H) bei Zellen in einer frühen Phase der Apoptose. In einer späten Phase der Apoptose oder bei primärer Nekrose kommt es zu einer Permeabilisierung der Zellmembran für den Farbstoff Propidiumjodid, wodurch es zu einem Anstieg der Intensität im roten Fluoreszenzbereich (590nm, FL3-H) kommt. Anhand der durchflusszytometrischen Messung lässt sich daher der Anteil von Zellen in einer frühen Phase der Apoptose (unterer, rechter Quadrant) von Zellen in einer späteren Phase des Zelltodes (oberer, rechter Quadrant) differenzieren.

3.2 Inhibition von Lidocain-induzierter Apoptose durch Bcl-2-Überexpression

Die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C wird durch das antiapoptotische Protein Bcl-2 gehemmt. Tatsächlich zeigte sich bei Bcl-2-überexprimierenden Jurkat T-Zellen eine deutlich bessere Zellvitalität nach Behandlung mit Lidocain (3-6 mM) und Staurosporin (1,25 μ M) für 24 Stunden. Im Gegensatz hierzu kam es nach Behandlung mit 10 mM Lidocain zu keinem Unterschied in der Anzahl avitaler Zellen (etwa 90%) im Vergleich zum Wildtyp und damit zu keinem Schutz durch Bcl-2-Überexpression (Abb. 2). Die Überexpression von Bcl-2 führte nicht nur zu einer Verbesserung des Zellüberlebens, sondern auch zu einer weitestgehenden Erhaltung des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) nach Behandlung mit 3-6 mM Lidocain, während eine Konzentration von 10 mM Lidocain zu einer Reduktion des $\Delta\Psi_m$ bei annähernd allen Zellen ($97,7 \pm 2,3\%$) führte (Abb. 4). Die Aktivität von Caspase

3 zeigte sich bei Bcl-2-überexprimierenden Zellen im Vergleich zum Wildtyp ebenfalls deutlich reduziert nach Behandlung mit 3-6 mM Lidocain, während die Behandlung mit 10 mM Lidocain zu keiner nachweisbaren Aktivierung von Caspase 3 führte, ebenso wie bei Wildtypzellen (Abb. 5). Darüber hinaus bestätigten die Westernblot Analysen von Bcl-2-überexprimierenden Zellen eine deutlich geringer ausgeprägte Spaltung von Procaspase 3 zu ihren aktiven Untereinheiten und damit eine reduzierte Aktivierung von Caspase 3 (Abb. 6A). In der Annexin V/Propidiumjodid Doppelfärbung zeigte sich ein geringerer Anteil von frühapoptotischen Zellen durch Bcl-2-Überexpression, sowie eine Reduktion des Auftretens von Zelltod nach Inkubation mit 3-6 mM Lidocain. Die Inkubation mit 10 mM Lidocain zeigte wie bei Wildtypzellen keinen Anstieg des Anteils frühapoptotischer Zellen, aber ein Auftreten von Zelltod bei $97,0 \pm 2,5\%$ der analysierten Zellen (Abb. 9).

Abbildung 9

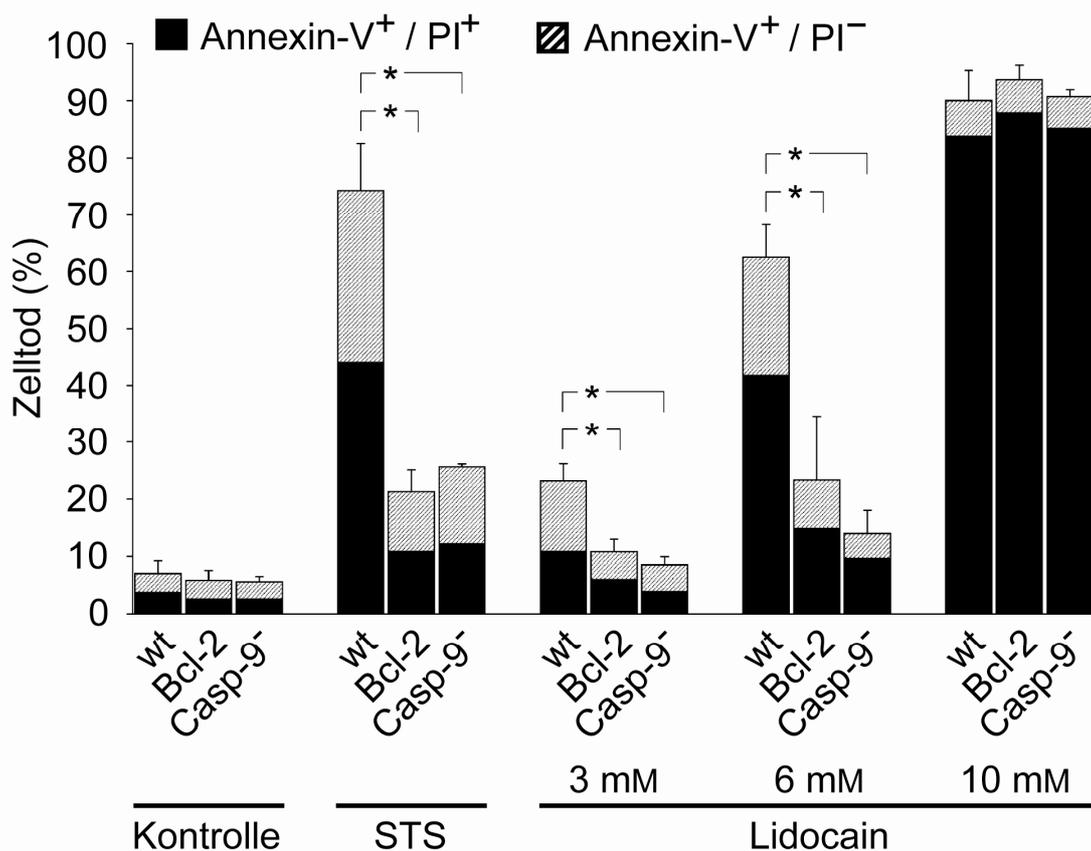


Abbildung 9: Lidocain-induzierte Apoptose wird durch die Blockade des mitochondrialen Signalweges inhibiert. Wildtypzellen (wt), Bcl-2-überexprimierende Zellen (Bcl-2) oder Caspase 9-defiziente Zellen (Casp-9⁻) wurden für 12 Stunden mit Staurosporin (STS) oder Lidocain in den angegebenen Konzentrationen behandelt.

Frühe Apoptose wurde mittels Durchflusszytometrie und dem Farbstoff Annexin V gemessen, welcher an externalisierte Phosphatidylserinreste bindet. Eine Gegenfärbung mit Propidiumjodid wurde verwendet um Zellen nachzuweisen, welche sich bereits in einer Phase später Apoptose oder primärer Nekrose befinden. Inhibition des mitochondrialen Signalweges durch Bcl-2-Überexpression oder Caspase 9-Defizienz reduzierte den Anteil frühapoptotischer Zellen (Annexin V positiv, PI negativ) nach Behandlung mit 3-6 mM Lidocain und 1,25 μ M Staurosporin (STS). Der Anteil der Zellen, welche sich in einer späteren Phase des Zelltods befinden (Annexin V und PI positiv) wurde ebenfalls signifikant gesenkt ($P < 0,05$). Inhibition des mitochondrialen Signalweges reduzierte dagegen nicht das Auftreten von Zelltod nach Inkubation mit 10 mM Lidocain, welcher sich überwiegend auf Nekrose zurückführen lässt und in über 90% der Zellen auftrat. Die Fehlerbalken stellen eine Standardabweichung dar, ein Sternchen (*) zeigt signifikante Unterschiede an ($P < 0,05$).

3.3 Schutz vor Lidocain-induzierter Apoptose durch Ausschaltung des mitochondrialen Signalweges

Caspase 9 ist die essentielle Initiatorcaspase für den mitochondrialen Signalweg der Apoptose. Vergleichbar mit Bcl-2-überexprimierenden Zellen zeigten Zellen, welche defizient für Caspase 9 waren, ebenfalls eine deutlich geringere Aktivität von Caspase 3 nach Inkubation mit Lidocain (Abb. 6B). Ebenso waren der Anteil frühapoptotischer Zellen sowie das Auftreten von Gesamtzelltod stark reduziert im Vergleich zu parentalen Wildtypzellen (Abb. 9). Die Behandlung von Caspase 9-defizienten Zellen mit Lidocain in einer Konzentration von 10 mM führte nicht zu einer Erhöhung des Anteils frühapoptotischer Zellen, aber zu einer Zunahme von Gesamtzelltod vergleichbar wie bei Wildtypzellen, während sich keine Aktivierung von Caspase 3 feststellen lässt (Abb. 6B und 9). Der Grad des Schutzes vor Lidocain-induzierter Apoptose durch Caspase 9-Defizienz zeigte sich daher als vergleichbar mit Bcl-2-Überexpression.

3.4 Die Rolle des extrinsischen Signalweges für die Lidocain-induzierte Apoptose

Der extrinsische oder Todesrezeptorsignalweg der Apoptose wird durch die Rekrutierung des Adapterproteins FADD und Caspase 8 aktiviert. In den untersuchten Caspase 8-defizienten Jurkat T-Zellen bestand im Vergleich zu parentalen Wildtypzellen kein Unterschied sowohl im Anteil frühapoptotischer Zellen als auch im Auftreten von Gesamtzelltod nach Behandlung mit 3-10 mM Lidocain (Abb. 10). In Versuchen mit FADD-defizienten Zellen

zeigte sich nach Inkubation mit Lidocain ebenfalls kein geringerer Anteil frühapoptotischer und avitaler Zeller im Vergleich zu Wildtypzellen und somit kein Schutz durch die Ausschaltung des extrinsischen Apoptosesignalweges.

Abbildung 10

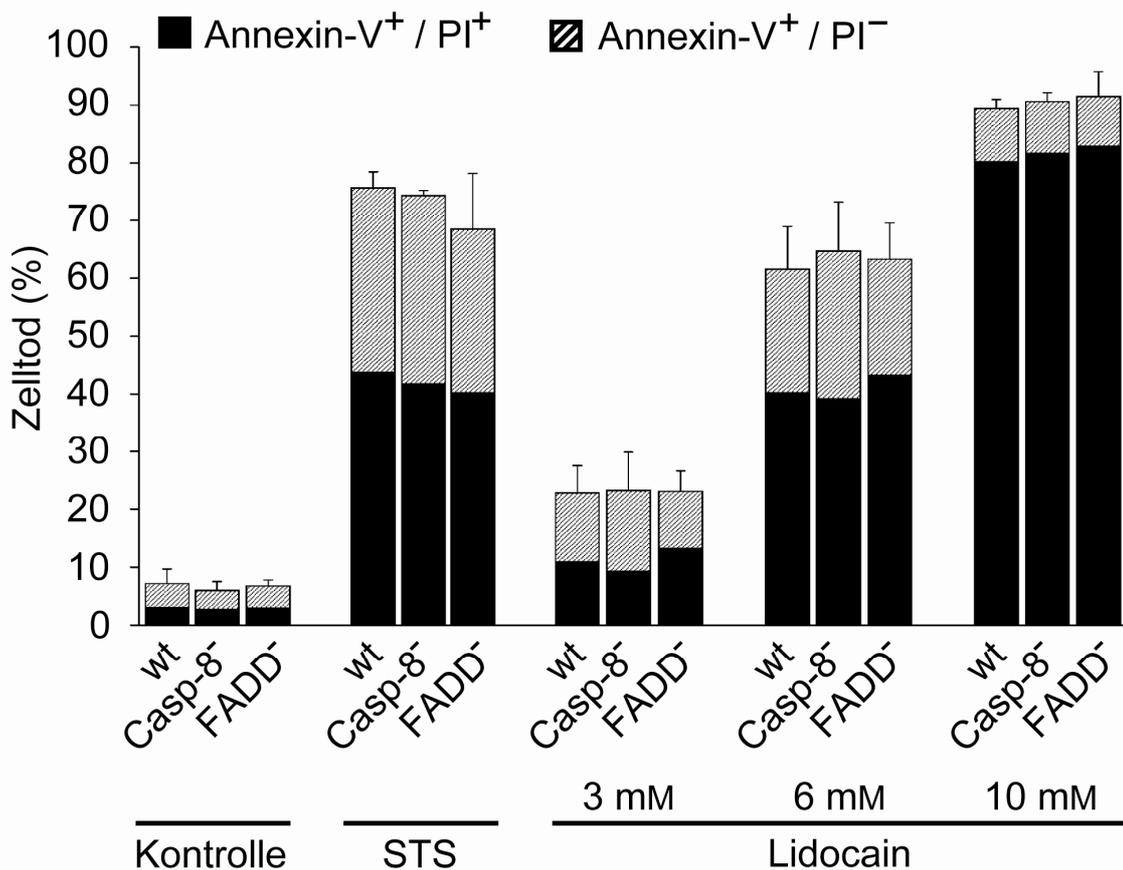


Abbildung 10: Die Lidocain-induzierte Apoptose wird nicht über den Todesrezeptorsignalweg vermittelt. Wildtypzellen (wt), Caspase 8-defiziente Zellen (Casp-8⁻) und FADD-defiziente Zellen (FADD⁻) wurden für 12 Stunden mit Staurosporin (STS) oder mit Lidocain in den angegebenen Konzentrationen behandelt. Der Anteil von Zellen in einer frühen Phase der Apoptose wurde durchflusszytometrisch mit Hilfe einer Annexin V Färbung ermittelt, welche Externalisierung von Phosphatidylserin nachweist. Eine zusätzliche Färbung mit Propidiumjodid (PI) wurde angewandt um Zellen zu identifizieren, welche sich in primärer oder sekundärer Nekrose befinden. Als sekundäre Nekrose wird die Zytolyse in Folge von Apoptose definiert, wenn eine physiologische Elimination (Phagozytose) nicht erfolgte. Die Ergebnisse zeigen, dass die Inhibition des extrinsischen oder Todesrezeptorsignalweges weder den Anteil frühapoptotischer Zellen (Annexin V⁺/PI⁺) noch spätere Phasen von Zelltod (Annexin V⁺/PI⁻) im Vergleich zu Wildtypzellen beeinflusst. Die Behandlung mit 10 mM Lidocain führte bei allen drei untersuchten Zelltypen zu keiner Induktion von Apoptose, führte aber in über 90% der analysierten Zellen zu Nekrose. Die Fehlerbalken stellen eine Standardabweichung dar.

Die Western Blot Untersuchung bestätigte diese Ergebnisse. Auch hier unterschieden sich Wildtypzellen und FADD- bzw. Caspase 8-defiziente Zellen nicht hinsichtlich der Caspase 3-Aktivierung nach Exposition mit Lidocain (Abb. 6 C bzw. D). Die Ausschaltung des extrinsischen Signalweges der Apoptose hatte somit keinen Einfluss auf die Toxizität von Lidocain.

3.5 Die dosisabhängige Wirkung von Lidocain auf humane Neuroblastomzellen

Im nächsten Schritt wurden die Induktion von Apoptose durch Lidocain und der zugrunde liegende Mechanismus auch an neuronalen Zellen untersucht. Hierzu wurden humane SHEP Neuroblastomzellen verwendet. Auch an diesen Zellen induzierte Lidocain konzentrationsabhängig Apoptose bzw. Nekrose. Dabei schützte die Behandlung der Zellen mit dem Pancaspase-Inhibitor Q-VD weitestgehend vor Apoptose und Zelltod bis zu einer Lidocainkonzentration von bis zu 12 mM ($\approx 0.32\%$). Bei Konzentrationen von Lidocain über 14 mM zeigte sich dagegen kein Einfluss von Q-VD Behandlung auf das Auftreten von Zelltod (Abb. 11 A).

Entsprechend kam es zu einer konzentrationsabhängigen Aktivierung von Caspase 3 durch Lidocain. So wurde in der durchflusszytometrischen Analyse ein Anstieg der Rate von Zellen mit aktivierter Caspase 3 auf bis zu $69,2 \pm 2,4 \%$ bei einer Lidocainkonzentration von 10 mM festgestellt (Abb. 12 und 13). Bereits bei einer Konzentration von 12 mM zeigte sich dagegen eine geringere Rate ($44,9 \pm 5,0 \%$) und in höheren Konzentrationen eine weitaus geringere Aktivität von Caspase 3. Dies weist auf einen Caspase-abhängigen Mechanismus, also Apoptoseinduktion durch niedrige Konzentrationen von Lidocain in Neuroblastomzellen hin, während höhere Konzentrationen überwiegend Nekrose induzieren.

Abbildung 11

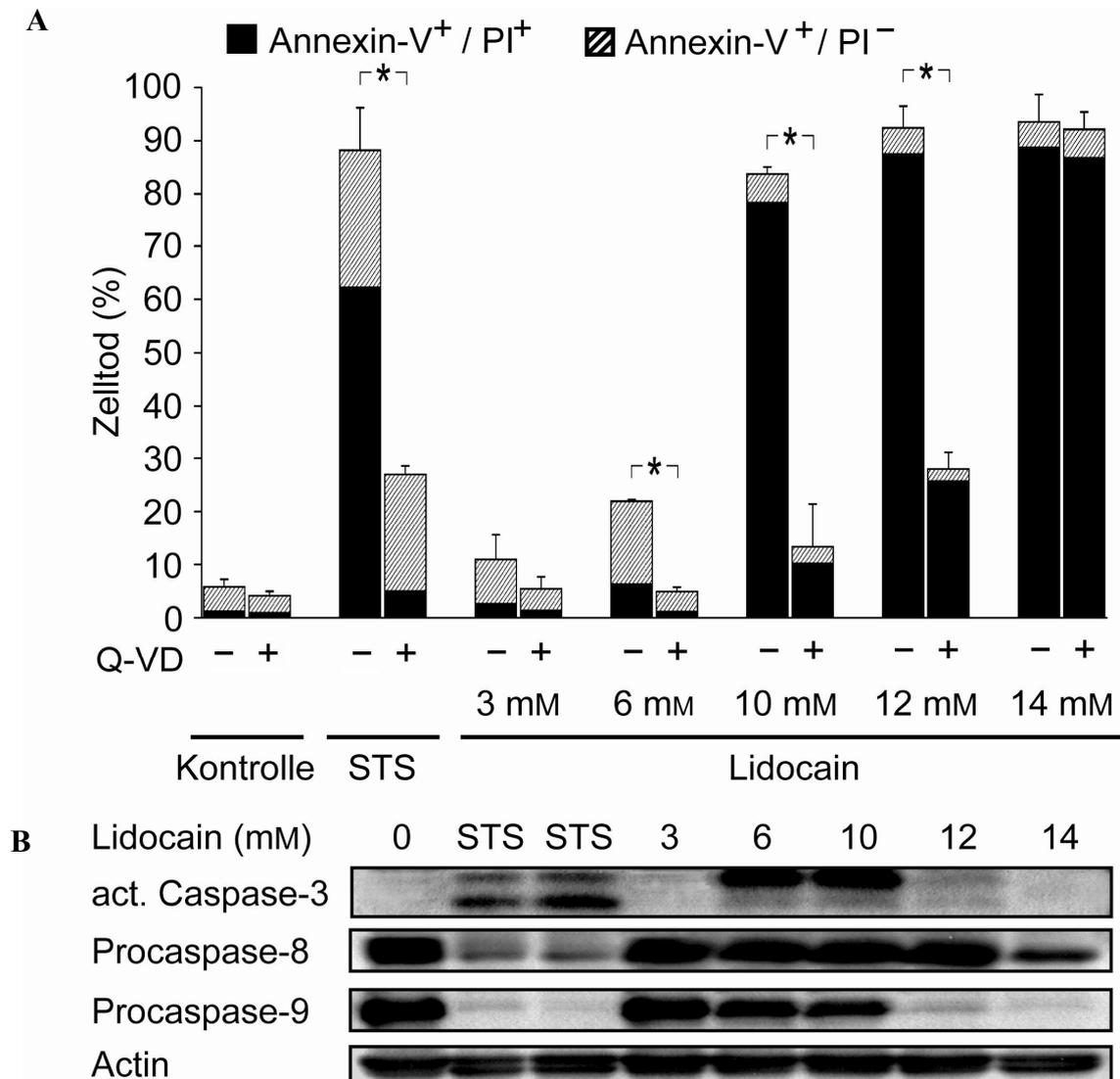
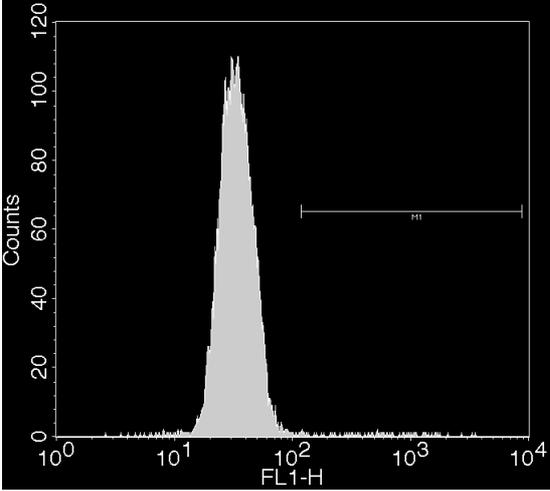


Abbildung 11: Lidocain-induzierte Apoptoseinduktion und Aktivierung von Caspasen an Neuroblastomzellen. (A) Neuroblastomzellen des Menschen (SHEP) wurden mit 0,125 μM Staurosporin (STS) als Positivkontrolle oder den angegebenen Konzentrationen von Lidocain für 12 Stunden mit (+) oder ohne (-) die Zugabe des Pancaspase-Inhibitors Q-VD (10 μM) behandelt. Die Ergebnisse der Annexin V und Propidiumjodid Doppelfärbung zeigen, dass die Inhibition von Caspasen das Auftreten von Lidocain-induziertem Zelltod bis zu einer Konzentration von 12 mM deutlich verringerte, nicht aber bei höheren Konzentrationen, welche überwiegend Nekrose auslösten. Die Fehlerbalken stellen eine Standardabweichung dar, ein Sternchen (*) zeigt signifikante Unterschiede an ($P < 0,05$).

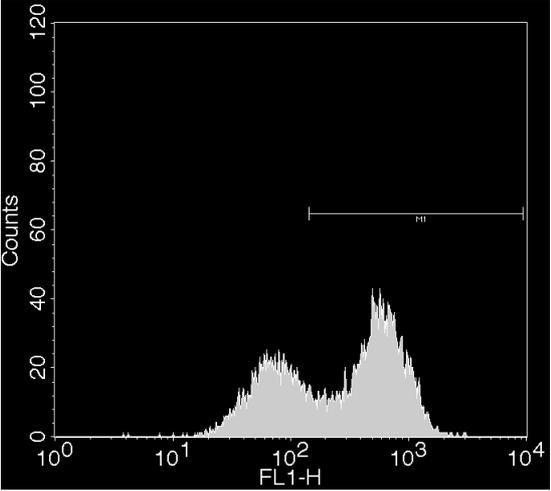
(B) SHEP Neuroblastomzellen wurden für 12 Stunden mit Lidocain oder 2 verschiedenen Konzentrationen von Staurosporin (STS; linke Spalte 0,5 μM ; rechte Spalte 0,25 μM) inkubiert. Die proteolytisch gesplattene, aktive Form der Caspase 3 (akt. Caspase 3) wurde nach Inkubation der Zellen mit Lidocain in Konzentrationen von 6

bis 12 mM nachgewiesen. In diesen Konzentrationen verringerte Lidocain auch den Anteil von inaktiver Procaspase 9, während Procaspase 8 bei diesen Konzentrationen unverändert blieb.

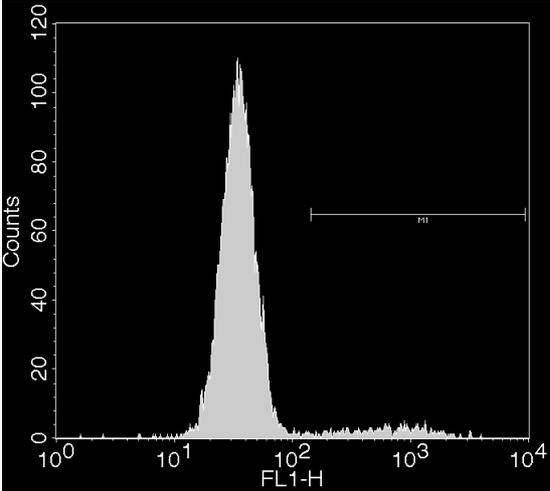
Abbildung 12



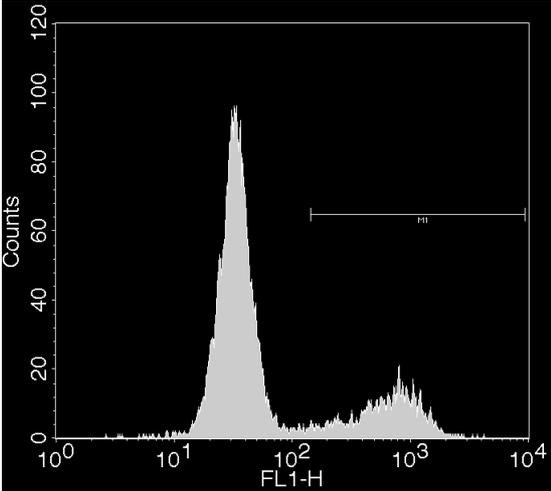
Kontrolle



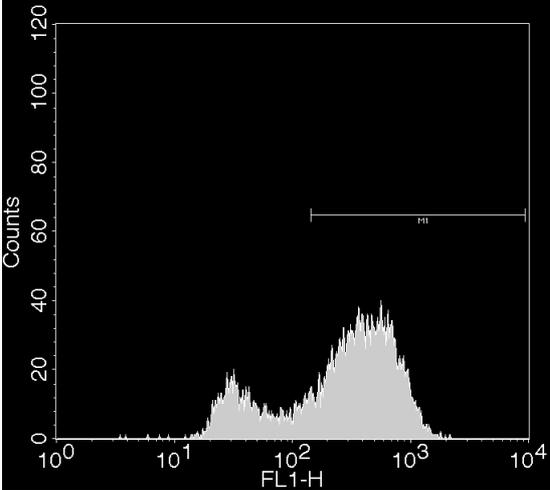
Staurosporin 0,125 μM



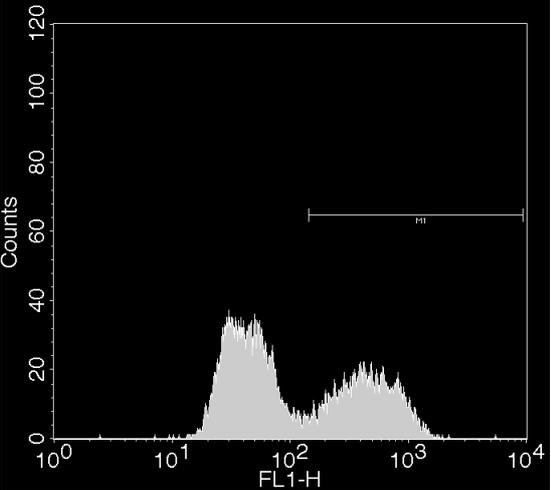
Lidocain 3 mM



Lidocain 6 mM



Lidocain 10 mM



Lidocain 12 mM

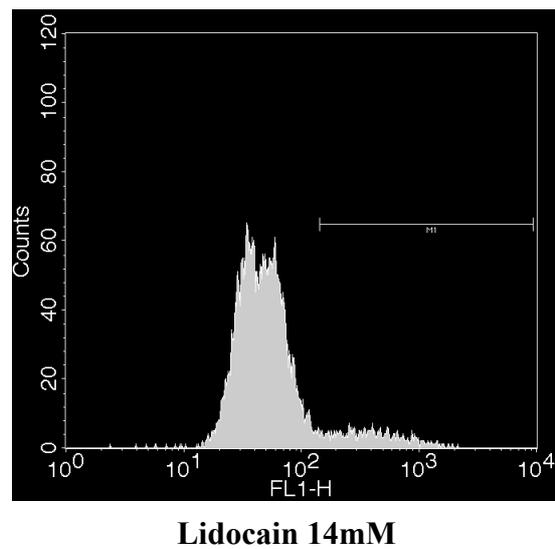


Abbildung 12: Durchflusszytometrischer Nachweis der Aktivierung von Caspase 3 in humanen Neuroblastomzellen (SHEP). Der nur an aktivierte Caspase 3 bindende fluoreszenzkonjugierte Antikörper verändert die Fluoreszenzintensität der analysierten Zellen im grünen Bereich (527nm, FL1-H). Hierdurch steigt mit zunehmender Aktivierung von Caspase 3 durch Lidocain die Rate von Zellen im Bereich hoher Fluoreszenzintensität, welche durch den abgebildeten Marker erfasst wurde.

In der Westernblot Analyse der Lidocain-behandelten Neuroblastomzellen wurde ebenfalls eine dosisabhängige Aktivierung von Caspase 3, sowie eine Abnahme der inaktiven Proform von Caspase 9 bestätigt. Eine Veränderung des Gehalts der inaktiven Procaspase 8 stellte sich dagegen erst ab einer Lidocainkonzentration von 14 mM, folglich im Rahmen von nekrotischem Zelltod dar (Abb. 11 B).

Abbildung 13

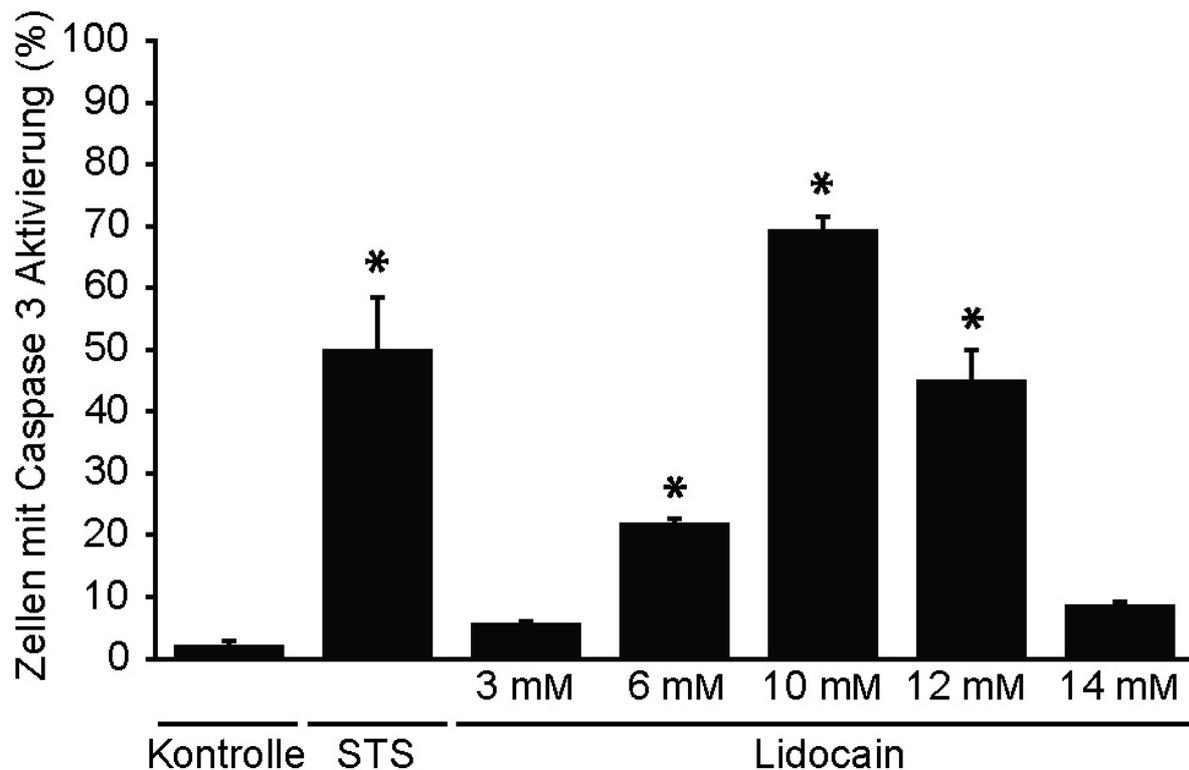


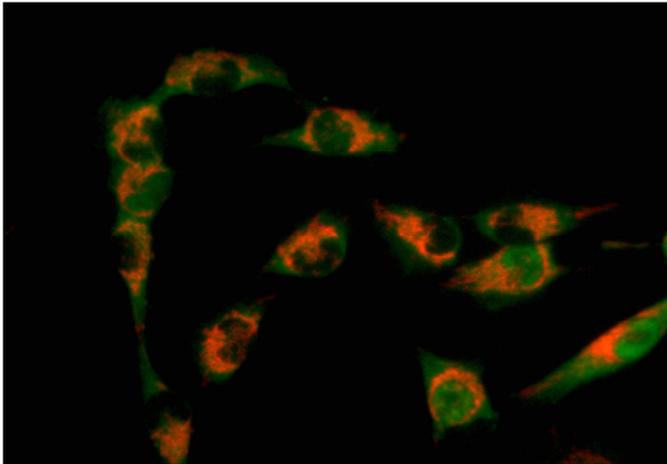
Abbildung 13: Durchflusszytometrischer Nachweis der Aktivierung von Caspase 3 durch Lidocain in Neuroblastomzellen. Nach Behandlung von SHEP Zellen für 12 Stunden mit Staurosporin (0,125 μ M) oder Lidocain (3-14mM) wurden die zu analysierenden Zellen permeabilisiert und mittels Fluoreszenz-konjugierter Antikörper gegen aktivierte Caspase 3 markiert. In der Analyse zeigte sich eine dosis-abhängige Aktivierung von Caspase 3 durch Lidocain in Konzentrationen von 3 bis 12 mM. Die Fehlerbalken stellen eine Standardabweichung dar, ein Sternchen (*) zeigt signifikante Unterschiede zur Kontrolle an ($P < 0,05$).

Das im Zytoplasma vorliegende proapoptotische Protein Bax ändert im Rahmen mitochondrial vermittelter Apoptose seine Konformation, lagert sich in die äußere Mitochondrienmembran ein und oligomerisiert dort unter Ausbildung von mitochondrialen Kanälen. Durch diese Bax-Kanäle werden Promotoren der Apoptose wie z.B. Cytochrom C in das Zytoplasma freigesetzt. In der Fluoreszenzmikroskopie sowie in der konfokalen Lasermikroskopie wurde daher das Auftreten von aktiviertem Bax im Bereich der Mitochondrien untersucht. Dabei reichte sich Bax nach 6 und 12-stündiger Inkubation mit Lidocain in Konzentrationen von 3 bis 6 mM im Bereich der Mitochondrienmembranen an

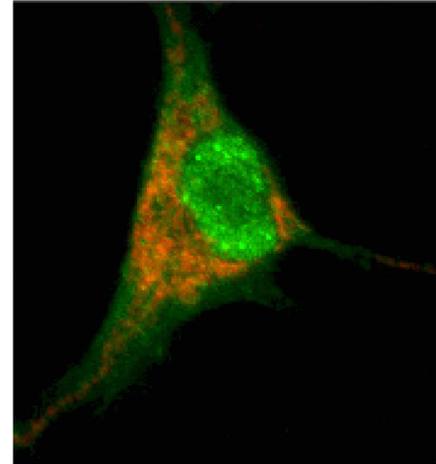
(Abb. 14). Hingegen kam es bei der Negativ-Kontrolle sowie bei höheren Konzentrationen von Lidocain nicht zum Einbau von Bax Proteinen in die äußere Mitochondrienmembran.

Abbildung 14

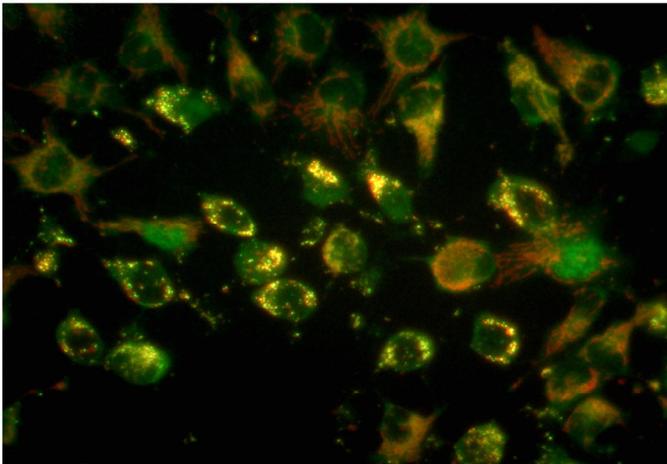
A (40-fache Vergrößerung)



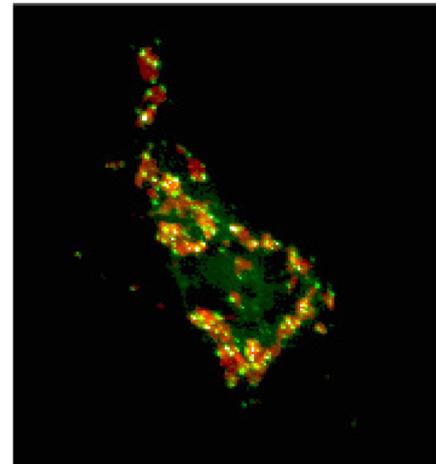
B (80-fache Vergrößerung)



C (40-fache Vergrößerung)



D (80-fache Vergrößerung)



E (340-fache Vergrößerung)

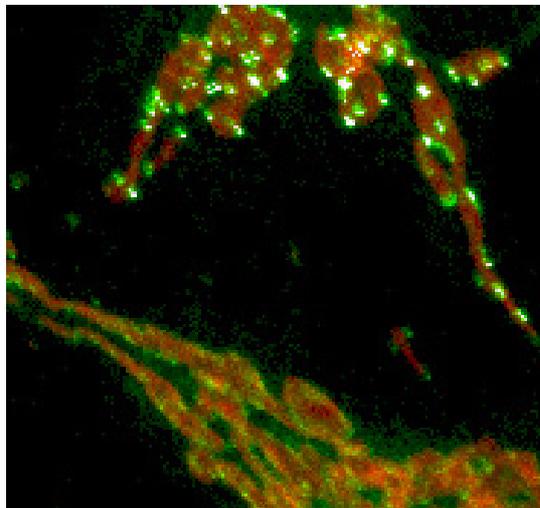


Abbildung 14: Nachweis der Ausbildung von mitochondrialen Bax-Kanälen im Rahmen der Lidocain-induzierten Apoptose. Bild A zeigt eine fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme (40-fach vergrößert) von unbehandelten SHEP Neuroblastomzellen. Die rote Fluoreszenz stellt durch die Markierung des mitochondrialen Membranproteins Tom20 die Mitochondrien dar, während die grüne Färbung durch fluoreszierende Antikörper gegen das proapoptotische Protein Bax entsteht. In der mittels konfokaler Laser-Mikroskopie dargestellten stärkeren Vergrößerung (80-fach vergrößert) einer unbehandelten Zelle (Bild B) zeigt eine geringe, homogene grünliche Fluoreszenz die ubiquitäre Verteilung des nicht aktivierten Bax Proteins im Zytoplasma an. Bild C stellt in einer fluoreszenzmikroskopischen Übersichtsaufnahme (40-fach vergrößert) die Oligomerisierung von Bax im Bereich der mitochondrialen Membranen nach Behandlung der Zellen mit 6mM Lidocain dar. Durch die Übereinanderlagerung der roten und grünen Fluoreszenz entsteht hier eine gelbliche Farbe. Dasselbe Präparat wurde in der konfokalen Laser-Mikroskopie stärker vergrößert (Bild D, 80-fach vergrößert). In einer konfokalen Aufnahme (Bild E) mit noch höherer Vergrößerung (340-fach vergrößert) lässt sich anhand der tangential angeschnitten Mitochondrien im unteren Bildabschnitt erkennen, dass sich das oligomerisierte Bax Protein in die mitochondrialen Membranen einlagert.

Somit konnte auch an neuronalen Zellen des Menschen gezeigt werden, dass Lidocain den Einbau von Bax-Kanälen in Mitochondrien induziert und so die äußere Mitochondrienmembran permeabilisiert. Die hierdurch verursachte Freisetzung von proapoptotischen Substanzen, wie Cytochrom C induziert auch in neuronalen Zellen Apoptose über den mitochondrialen Signalweg.

4. Diskussion

Die Toxizität von Lokalanästhetika, insbesondere von Lidocain, führt bei der Anwendung zur Spinalanästhesie nur selten zu irreversiblen neurologischen Schäden. Dennoch haben diese Nebenwirkungen im Einzelfall dramatische Folgen für die betroffenen Patienten. Obwohl eine Cochrane Analyse von einer intrathekalen Anwendung von Lidocain zur Spinalanästhesie abrät,¹⁰ wird es weiterhin häufig angewendet. Es eignet sich aufgrund seiner kurzen Anschlagszeit und Wirkdauer insbesondere für die Durchführung der Anästhesie bei kurzen operativen Eingriffen.¹⁰ Neurotoxizität kann nach spinaler aber auch peripher-nervöser Applikation von Lokalanästhetika auftreten, ohne dass eine Therapie derzeit möglich ist.⁵⁵

Daher galt es in der vorliegenden Arbeit den Mechanismus der Neurotoxizität von Lidocain aufzuklären und somit mögliche Prophylaxen bzw. Therapien gegen diese seltene aber schwerwiegende Nebenwirkung entwickeln zu können. Es war das Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, in welchem Maß Lidocain in klinisch relevanten Konzentrationen Apoptose oder Nekrose an nicht-neuronalen und neuronalen Zellen des Menschen induziert und ob die Toxizität von Lidocain durch genetische Veränderungen oder pharmakologische Inhibition von Signalwegen der Apoptose beeinflussbar ist.

Die vorliegenden Ergebnisse an T-Lymphom- und Neuroblastomzellen zeigen, dass die Toxizität von Lidocain bei klinisch relevanten Konzentrationen *in vitro* auf dem Mechanismus der Induktion von Apoptose beruht. Erst bei Verwendung höherer Konzentrationen von Lidocain tritt Nekrose auf. Im Rahmen Lidocain-induzierter Apoptose kommt es zur Alteration des mitochondrialen Membranpotentials, zur Entstehung von Bax-Kanälen in der äußeren Mitochondrienmembran, der Freisetzung von Cytochrom C aus Mitochondrien und schließlich zu einer Aktivierung von Caspasen. Die Lidocain-induzierte Apoptose lässt sich durch die Überexpression von antiapoptotischem Bcl-2 Protein oder die Defizienz von Caspase 9 inhibieren. Dagegen hat die Defizienz von Caspase 8- bzw. FADD keinen Einfluss. Daher wird die Lidocain-induzierte Apoptose über den mitochondrialen Signalweg vermittelt und nicht über den Todesrezeptor-Signalweg.

Bekannt ist, dass Lidocain und andere Lokalanästhetika Apoptose in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen induzieren können.^{29-31,56-62} Über den Mechanismus der Induktion von Apoptose und die beteiligten molekularen Mechanismen der Signaltransduktion ist bisher wenig bekannt. Um den molekularen Signalweg der Lidocain-induzierten Apoptose genauer

untersuchen zu können, wurden humane Zellen untersucht, welche genetische Alterationen von essentiellen Regulatoren der beiden Hauptsignalwege der Apoptose aufwiesen. Dies stellt einen methodologischen Vorteil gegenüber Studien dar, in denen nur mit pharmakologischer Inhibition von Caspasen gearbeitet wurde,^{31,59} welche zwar häufig Apoptosesignalwege inhibierten, aber nicht immer das Zellüberleben verbesserten.⁶³ Darüber hinaus ist die Selektivität von pharmakologischen Inhibitoren häufig fraglich, während die genetische Überexpression bzw. Deletion bestimmter Proteine wesentlich spezifischer Signalwege aufklären kann.

Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Induktion von Apoptose bzw. Nekrose trat in einem Konzentrationsbereich von Lidocain zwischen 0,08% und 0,3% auf. Klinisch werden jedoch Lösungen zwischen 1 und 5% unverdünnt lokal injiziert. Dass dennoch nach der Durchführung von Spinalanästhesien mit Lidocain nur selten neurologische Komplikationen beobachtet werden, liegt vermutlich an der sofortigen Verdünnung des Lidocains im Liquor cerebrospinalis. Tatsächlich werden nach Spinalanästhesien nur während der ersten Stunde nach Injektion solche Konzentrationen von Lidocain im Liquor beobachtet,⁶⁴ die in der vorliegenden Untersuchung binnen 12 bis 24 Stunden toxisch waren. Obwohl diese Konzentrationen nach einmaliger Applikation nur kurzzeitig auftreten und nicht wie in den durchgeführten Versuchen für 12 bis 24 Stunden bestehen, kann davon ausgegangen werden, dass durch Maldistribution des Lokalanästhetikums die Gefahr neurologischer Schäden für die Patienten besteht. Tatsächlich wurde bei Patienten, die eine Spinalanästhesie mit speziellen Mikrokathetern erhielten, gehäuft ein *Cauda equina* Syndrom durch Maldistribution des Lokalanästhetikums beobachtet.⁶⁵ Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass es bei kontinuierlicher intrathekaler, epiduraler und perineuraler Applikation von Lokalanästhetika zur postoperativen Analgesie ebenfalls zu hohen Konzentrationen von Lokalanästhetika an Nervenzellen kommt. Denn auch zur postoperativen Schmerztherapie werden Lokalanästhetika in Konzentrationen verwendet, welche in der vorliegenden Untersuchung toxisch waren. Welchen Konzentrationen die Neuronen der blockierten Nerven beim Menschen hierbei direkt ausgesetzt sind, ist hingegen nicht bekannt. Im peripheren Nervengewebe von Ratten wurden nach perineuraler Applikation von Lidocain Konzentrationen gemessen, die im Bereich derer lagen, die in der vorgestellten Arbeit Apoptose induzierten.⁶⁶ Diese Konzentrationen nahmen jedoch nach einmaliger Injektion binnen 30 Minuten wieder deutlich ab. Inwieweit sich dabei das meist lipophile Lokalanästhetikum zwischen Myelinscheide und Axon verteilt, blieb jedoch ungeklärt. Daher

sind die tatsächlich bei Leitungsblockaden intraaxonal vorliegenden Lokalanästhetika-Konzentrationen bisher unbekannt. Die oben genannten Arbeiten untersuchten erstmalig die Konzentrationen von Lokalanästhetika am Wirkort *in vivo* im Zusammenhang mit ihrer klinisch erwünschten Wirkung. Trotz einer Vielzahl von Arbeiten zur lokalen Neurotoxizität von Lokalanästhetika, wurde die tatsächliche Konzentration am Wirkort *in vivo* bisher nicht bestimmt. Zusammengefasst sind also die in den vorgestellten Ergebnissen toxischen Konzentration von Lidocain um 1-2 Zehnerpotenzen geringer als die der klinisch genutzten Injektionslösungen, aber vergleichbar mit den zu Beginn einer Nervenblockade im Nervengewebe nachweisbaren Konzentrationen. Diese Konzentrationen bleiben aber klinisch zumeist weder nach intrathekaler, noch nach epiduraler oder peripherer Applikation bestehen sondern unterschreiten schon nach kurzer Zeit (etwa einer Stunde) wieder toxische Werte.^{64,66} Allerdings kann es in seltenen Fällen durch anatomische Besonderheiten oder spezielle Applikationsformen dazu kommen, dass die Injektionslösung nicht schnell und ausreichend verdünnt wird. Dies könnte die Ursache der nur selten andauernden neurologischen Defiziten nach Anwendung von peripheren Nervenblockaden sein.⁶⁷⁻⁷⁰

Neben der lokalen neurotoxischen Wirkung haben Lokalanästhetika ebenfalls eine lokal myotoxische Wirkung. So zeigten tierexperimentelle Studien nach einmaliger und kontinuierlicher Applikation zur peripheren Nervenblockade eine ausgeprägte myotoxische Schädigung des umliegenden Muskelgewebes.^{3,4,70-72} Klinisch spielt die Myotoxizität bei Retrobulbärblockaden in der Ophthalmologie eine Rolle, da es bei den Patienten hierbei bereits durch geringe muskuläre Schäden zu bedeutsamen Nebenwirkungen in Form von Doppelbildern kommen kann. Ob der Induktion von Apoptose hierbei eine wichtige Bedeutung zukommt, konnte durch die bisher vorliegenden Untersuchungen dennoch nicht ausreichend geklärt werden.

Im Vergleich zu anderen Studien lässt sich einwenden, dass die in der vorgestellten Untersuchung verwendeten Zellkulturen aus entdifferenzierten Neuroblastomzellen bestanden, während andere Untersucher hingegen hybride Zellen³¹ bzw. primäre neuronale Zellkulturen³² verwendeten. Es wäre primär anzunehmen, dass Neuroblastomzellen wesentlich resistenter sind gegenüber Apoptose-induzierenden Reizen. Tatsächlich stellte sich jedoch heraus, dass die untersuchten Neuroblastomzellen deutlich empfindlicher gegenüber Lidocain sind als hybride HN7 Zellen (aus Spinalganglienzellen der Ratte und Neuroblastomzellen des Menschen) bzw. Spinalganglienzellen der Ratte *ex vivo*. Daher

erscheint das in dieser Untersuchung angewandte Modell geeignet und besonders sensitiv zu sein, um die Toxizität von Lidocain zu untersuchen.

In der vorliegenden Untersuchung wurden die Effekte von Lidocain untersucht, da sich zu diesem Lokalanästhetikum die meisten Berichte über neurologische Komplikationen finden.⁹ Durch eigene weitergehende Studien konnte jedoch inzwischen anhand des mit dieser Arbeit etablierten Modells eine Übertragbarkeit auf sieben weitere klinisch genutzte Lokalanästhetika gezeigt werden.⁷³ Dabei variierte die Neurotoxizität der Lokalanästhetika erheblich, aber korrelierte sehr gut mit der Lipophilie und damit mit der Potenz der jeweiligen Substanz: Ein Ergebnis, dass inzwischen auch von anderen Untersuchern im Vergleich der Toxizität klinisch equipotenter Konzentrationen von Lidocain, Ropivacain und Bupivacain an primären sensorischen Neuronenkulturen bestätigt werden konnte.⁷⁴ Die hierdurch naheliegende Vermutung, die toxische Wirkung von Lokalanästhetika könnte direkt mit ihrer klinisch genutzten Wirkung, der Blockade des spannungsabhängigen Natriumkanals zusammenhängen, trifft jedoch nicht zu: Eine Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle mit Tetrodotoxin, dem Gift des Kugelfisches, führt zu keinerlei zytotoxischen Effekten.²⁶ Vielmehr weist die gute Korrelation von Lipophilie, klinischer Potenz und Toxizität einmal mehr auf einen intrazellulär aktivierten Signalweg der Apoptose hin.

Klinisch wird häufig versucht die Wirkung von Nervenblockaden durch die Kombination von Lokalanästhetika mit bestimmten Adjuvantien zu verbessern. Die am häufigsten eingesetzten Adjuvantien sind Vasokonstriktoren, Opioide, Clonidin und Ketamin. Hierdurch lässt sich die Wirkung häufig verlängern bzw. eine besser analgetische Wirkung bei geringerer motorischer Blockade erreichen. Weiterhin könnte eine ausreichende analgetische Wirkung bei mit geringeren Dosen Lokalanästhetika erzielt werden, was im Hinblick auf die lokale Toxizität der Anästhetika wünschenswert wäre. Bislang unbekannt ist jedoch, welchen Einfluss solche Wirkstoffe auf die Induktion von Apoptose durch Lokalanästhetika haben. In einer weiteren anhand des mit dieser Arbeit etablierten Modells durchgeführten Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die Substanzen Morphin, Clonidin und Adrenalin keinen Einfluss auf die Lidocain-induzierte Apoptose haben, während die Kombination mit Ketamin zu einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate führte,⁷⁵ vermutlich durch eine gesteigerte Aktivierung der mitochondrialen Signalwegs.⁷⁶

Auf den ersten Blick mag es überraschen, dass der Mechanismus der Toxizität von Lidocain innerhalb eines derart schmalen Dosisbereichs von Apoptose zu Nekrose wechselt. Es ist jedoch nicht ungewöhnlich, dass die Reaktion der Zelle auf eine starke Noxe in Abhängigkeit

der Schwere des Schadens von Apoptose in Nekrose übergeht.⁷⁷ In hohen Konzentrationen induziert Lidocain daher Nekrose, welche durch die Beeinflussung von Ionenströmen, der Membranintegrität oder anderer zellulärer Funktionen ausgelöst werden könnte. Das Phänomen von koexistenter Apoptose und Nekrose als Reaktion auf einen bestimmten Stimulus konnte bereits in einigen Studien gezeigt werden: Diese zeigten, dass die fehlende Verfügbarkeit von intrazellulärem Adenosintriphosphat (ATP)⁷⁸ und von Caspasen⁷⁹ eine ablaufende Apoptose in einen nekrotischen Prozess umwandeln kann. Die Entkoppelung der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung ist eine unvermeidliche Konsequenz des Verlustes des mitochondrialen Membranpotentials. Die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C unterbricht die Elektronentransportkette, was zu einer Verringerung der ATP-Produktion und zur vermehrten Entstehung von Sauerstoffradikalen führt. Diese Vorgänge können bei nicht ausreichender Verfügbarkeit von Caspasen zu Nekrose führen. Darüber hinaus ist ATP notwendig für die proapoptotische Wirkung des Apoptosoms.^{78,80} Aus diesem Grund kann ein fortschreitendes Defizit von ATP das Verhältnis von apoptotischen und nekrotischen Zelltod zugunsten der Nekrose verschieben.⁸¹ Da Lidocain in Konzentrationen, welche in der hier vorliegenden Arbeit überwiegend zu Nekrose führten, ebenfalls die mitochondriale Energieproduktion kompromittiert,⁸² ist vorstellbar, dass das resultierende Defizit an ATP eine Exekution von Apoptose verhindert.

Die Ergebnisse der Experimente mit genetisch veränderten Jurkat Zellen zeigen eindeutig, dass der mitochondriale Signalweg für die Lidocain-induzierte Apoptose verantwortlich ist. Der protektive Effekt des antiapoptotisch wirksamen Proteins Bcl-2 beweist die wichtige Rolle der Mitochondrien für die Lidocain-induzierte Apoptose. Allein der beobachtete Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) ist noch nicht beweisend für das Vorliegen von Apoptose, da er auch bei Nekrose auftritt.⁸³ So kam es auch in der hier vorgestellten Arbeit bei hohen Konzentrationen von Lidocain zu einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials ohne die Aktivierung von Caspasen. Somit ist ein Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zwar ein früher und sensibler, aber kein spezifischer Marker für Apoptose. Daher kann durch einem Verlust des mitochondrialen Membranpotentials allein nicht auf die Induktion von Apoptose durch Lidocain geschlossen werden, wie von anderen Autoren interpretiert wurde.^{31,32,61}

Im Einklang mit den hier vorgestellten Ergebnissen zeigte eine Studie an humanen Keratinozyten eine Reduktion des toxischen Effektes von Ropivacain, einem anderem Lokalanästhetikum, durch Überexpression von Bcl-2, wobei Apoptose nur durch

semiquantitative Westernblot Analysen der Procaspase 3 nachgewiesen wurde.⁵⁶ Hingegen gelang es in der vorliegenden Untersuchung die zentrale Rolle des mitochondrialen Signalweges für die Initiation der Apoptose durch Lidocain anhand Caspase 9-defizienter Zellen zu zeigen. Durch die Verwendung von Caspase 8-defizienten Zellen und FADD-defizienten Zellen konnte weiterhin ein Einfluss des Todesrezeptorsignalweges auf die Lidocain-induzierte Apoptose ausgeschlossen werden. Damit konnte erstmals und eindeutig an genetisch veränderten Zellen gezeigt werden, dass Lidocain Apoptose ausschließlich über den intrinsischen Signalweg induziert. Dies wird weiterhin untermauert durch die selektive Abnahme der inaktiven Proform von Caspase 9 an neuronalen Zellen.

Weiterhin wurde gezeigt, dass Lidocain an neuronalen Zellen zu einer Oligomerisierung des proapoptotischen Bax Proteins zu mitochondrialen Membrankanälen führt. Dies weist erneut auf eine Aktivierung des mitochondrialen Signalweges hin. Ob die Aktivierung von Bax für die Lidocain-induzierte Apoptose essentiell ist und damit als Ziel einer pharmakologischen Intervention in Frage kommt oder lediglich eine Verstärkerfunktion im Sinne einer positiven Rückkopplungsschleife erfüllt,⁸⁴ bleibt dennoch unklar.

Die Zytotoxizität von Lokalanästhetika wird von manchen Autoren auf einen unspezifischen, die Zellmembranen schädigenden Detergentieneffekt zurückgeführt.^{60,85} Die untersuchten Lokalanästhetika, darunter auch Lidocain in einer hohen Konzentration von etwa 5%, zeigten eine Selbstaggregation und es bildeten sich Mizellen aus, vergleichbar dem Verhalten von Tensiden. Bei diesen Konzentrationen trat darauf hin eine Zerstörung der untersuchten künstlichen Membranen auf. Dagegen sprechen viele der bisher vorliegenden *in vitro* Studien, welche zwar Zeichen von Apoptose nachweisen konnten, nicht aber die spezifische Aktivierung von Apoptosesignalwegen.²⁹⁻³¹ Somit war letztlich unklar, ob es sich bei den beobachteten Zeichen für Apoptose um Nebeneffekte aufgrund von Membranzerstörung handelte oder um tatsächlich ablaufende Apoptose als überwiegenden Mechanismus der Toxizität. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass durch Beeinflussung zelleigener Signalwege die Induktion von Apoptose durch Lidocain und damit die Toxizität deutlich reduziert werden kann, was prinzipiell gegen einen unspezifischen Detergentien-Effekt als Ursache für die Apoptose spricht. Dennoch erscheint es möglich, dass höhere Konzentrationen von Lidocain über einen solchen unspezifischen Effekt zu primärer Nekrose führen.

Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, induzieren Lokalanästhetika Apoptose völlig unabhängig vom extrinsischen Signalweg. Allgemeinanästhetika hingegen können

Apoptose in frühen Entwicklungsstadien von Gehirnen junger Ratten über die Aktivierung sowohl des intrinsischen als auch des extrinsischen Signalweges induzieren.⁸⁶ Zum Zeitpunkt der maximalen Synaptogenese bei 7 Tage alten Ratten kam es zu einer Aktivierung des mitochondrialen Signalweges binnen der ersten zwei Stunden der Exposition mit Anästhetika, während eine Aktivierung des extrinsischen Signalweges frühestens nach sechs Stunden nachweisbar war. Hingegen konnte die vorliegende Arbeit zeigen, dass Lidocain eindeutig über die Aktivierung des intrinsischen Signalweges und unabhängig vom extrinsischen Signalweg Apoptose induziert.

In einer kürzlich erschienenen Übersichtsarbeit wird noch einmal die Aktualität und Bedeutung der lokalen Toxizität von Lokalanästhetika unterstrichen.⁸⁷ Als Ursache für die beobachteten Fälle von Lokalanästhetika-assoziierten Cauda equina Syndromen und transienten neurologischen Syndromen (TNS) werden hier neben dem in der vorliegenden Arbeit gefundenen Mechanismus der Aktivierung mitochondrialer Apoptose noch weitere Mechanismen diskutiert: Die Freisetzung von Glutamat, der Anstieg von intrazellulärem Calcium, die Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen sowie die Inhibition von axonalem Transport durch Lokalanästhetika. Zusätzlich werden vasokonstriktorische Effekte von Lokalanästhetika, die Rolle von begleitend eingesetzten Konservierungsmitteln sowie die bereits weiter oben besprochene Detergentien-ähnliche Wirkung von Lokalanästhetika diskutiert. In der Zusammenschau schlussfolgern die Autoren,⁸⁷ dass Lokalanästhetika die Freisetzung von Glutamat bewirken,⁸⁸ was zu einem Anstieg des intrazellulären Calciums führt^{89,90} und damit über die Aktivierung Mitogen-aktivierter Proteinkinasen (MAPK) in mitochondrial vermittelter Apoptose mündet.^{62,91} Hierbei spielt insbesondere die Gruppe der p38 MAPK eine wichtige Rolle, welche durch zahlreiche Stimuli und zellulären Stress, insbesondere durch inflammatorische Zytokine und intrazellulären Calciumanstieg, aktiviert werden können.⁹² Die Richtigkeit dieser Kausalkette bleibt jedoch unbewiesen, da sowohl Glutamatfreisetzung⁹³ als auch intrazellulärer Calciumanstieg⁹⁴ ein sekundäres Merkmal mitochondrialer Apoptose und Zelltod sein könnten. Die Bedeutung der p38 MAPK für die Neurotoxizität wurde aus dem Nachweis ihrer Phosphorylierung und der schützenden Wirksamkeit eines chemischen Inhibitors (SB203580) vor Lidocain induzierter Neurotoxizität *in vitro* und *in vivo* abgeleitet.^{32,74,95} Dieser Inhibitor wurde jedoch in einer nicht selektiv

wirksamen Konzentration (10 μ M bei einer IC₅₀ von 0,07 μ M) eingesetzt und blockierte oder aktivierte daher wahrscheinlich auch viele weitere Mechanismen der Signaltransduktion außer den p38 MAPK.^{96,97} Darüber hinaus wurde kürzlich gezeigt, dass eine Inhibition der p38 MAPK per se zu einer Inhibition von Caspase 3 führen kann,⁹⁸ was zwangsläufig zu einer Reduktion von Caspase-abhängiger Apoptose führt, unabhängig von der Rolle der p38 MAPK für die Lidocain-induzierte Apoptose. Weitere Untersuchungen zur Aktivierung von p38 MAPK Signalwegen in der Lokalanästhetika-assoziierten Neurotoxizität zeigten als Folge der beobachteten p38 MAPK Phosphorylierung auch eine Aktivierung der proinflammatorischen Enzyme Phospholipase A2 und Lipoxygenase Signalwegen durch Lidocain.⁹⁵ Der Einsatz des zellpermeablen Hemmstoffs Nordihydroguajarsäure (NDGA)⁹⁹ der Lipoxygenase konnte hierbei die Toxizität von Lidocain reduzieren.⁹⁵ Aufgrund der vielfältigen¹⁰⁰, zum Teil auf antioxidativen Mechanismen beruhenden Wirkungen^{101,102} von NDGA bleibt aber die Bedeutung von Lipoxygenase Signalwegen für die Lidocain-induzierte Apoptose letztlich unklar. Alle an dieser Stelle besprochenen Vorgänge wurden zwar im Rahmen der Lidocain-induzierten Neurotoxizität beobachtet, dennoch bleibt es aus methodologischen Gründen offen, ob es sich hierbei um essentielle Mechanismen handelt, die in einer Aktivierung mitochondrial vermittelter Apoptose münden oder lediglich um Epiphänome eines bereits eingeleiteten Zelltodes.

Zusammenfassend induziert Lidocain Apoptose in humanen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen. Die beobachteten Effekte treten in Konzentrationen auf, welche bei der Anwendung von Lidocain zur Spinalanästhesie intrathekal beobachtet werden. Der Einsatz höherer Konzentrationen führt dagegen überwiegend zu Zelltod durch primäre Nekrose. Lidocain-induzierte Apoptose wird durch den mitochondrialen Signalweg der Apoptose vermittelt, führt zum Einbau von aktivierten Bax Proteinen in die Mitochondrienmembran und ist unabhängig von Caspase 8 und FADD, zweier essentieller Mediatoren des Todesrezeptorsignalweges.

5. Zusammenfassung

Lokalanästhetika sind in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkzeit neurotoxisch. Klinisch bedeutsam ist insbesondere die Neurotoxizität von Lidocain bei Spinalanästhesien. Hier kommt es bei bis zu einem Drittel der Patienten zu transienten neurologischen Symptomen. In seltenen Fällen (etwa 1:8000) treten sogar irreversible Nervenschäden auf, wie z.B. bei einem *Cauda equina*-Syndrom. Lidocain und andere Lokalanästhetika können *in vitro* Apoptose induzieren. Unbekannt ist jedoch, welcher Signalweg der Apoptose hierfür verantwortlich ist. Darüber hinaus war nach den bisherigen Untersuchungen unklar, ob Apoptose der zentrale Mechanismus der Toxizität von Lidocain ist. Daher wurde die Dosis-Toxizitäts-Beziehung von Lidocain über einen großen Konzentrationsbereich an neuronalen und nicht-neuronalen Zellen untersucht. Mittels molekulargenetischer und pharmakologischer Alteration bestimmter Mediatoren der Apoptose wurde der Konzentrationsbereich ermittelt, in dem Lidocain Apoptose induziert. Schließlich wurden die subzellulären Mechanismen der Apoptoseinduktion, Zyto- und Neurotoxizität von Lidocain untersucht

Bei den zunächst untersuchten T-Lymphomzellen des Menschen induzierte Lidocain konzentrationsabhängig Apoptose. Konzentrationen von Lidocain, wie sie nach Spinalanästhesien intrathekal vorkommen, führten zu einer durchflusszytometrisch gemessenen Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials und zu einer Externalisierung von Phosphatidylserin an der Zellmembran als Zeichen der frühen Apoptose. Darüber hinaus setzte Lidocain Cytochrom C aus den Mitochondrien ins Zytoplasma frei, wie anhand von Zellfraktionierung und Western Blot Analyse gezeigt werden konnte. Dies führte zu einer mittels Substratspaltung, Western Blot und Durchflusszytometrie nachgewiesenen Aktivierung von Caspase 3, einer Effektorcaspase der Apoptose und damit letztendlich zum Zelltod, der mit Hilfe der Trypan-Blau Methode lichtmikroskopisch quantifiziert wurde.

Um den verantwortlichen Signalweg der Lidocain-induzierten Apoptose zu identifizieren wurden genetisch veränderte T-Lymphom-Zelllinien untersucht. Hierdurch konnte bewiesen werden, dass die Überexpression des zelleigenen, antiapoptotisch wirksamen Proteins Bcl-2 die Induktion von Apoptose und damit die Toxizität klinisch relevanter Konzentrationen Lidocain inhibiert. Höhere Konzentrationen führten zu primärer Nekrose, die durch Bcl-2-Überexpression nicht zu beeinflussen war. Die durch genetische Manipulation erreichte Defizienz von Caspase 9, der Initiatorcaspase des mitochondrialen (intrinsischen)

Signalweges, inhibierte die Exekution von Apoptose nahezu vollständig und hatte damit vergleichbar schützende Effekte. Dagegen war die Ausschaltung des extrinsischen Signalweges wirkungslos hinsichtlich der Induktion von Apoptose durch Lidocain. Weder Caspase 8- (Initiatorcaspase des Todesrezeptorsignalweges) noch FADD-defiziente Zellen (intrazelluläres Adapterprotein des Todesrezeptors) waren gegenüber Lidocain-induzierter Toxizität geschützt. Um die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf neuronale Zellen zu überprüfen, wurden Neuroblastomzellen des Menschen vom Typ SHEP untersucht. Auch an diesen Zellen verursachte Lidocain in vergleichbarem Maße Apoptose und Zelltod. Dabei war die Toxizität von klinisch relevanten Lidocain Konzentrationen durch Inhibition von Caspasen erheblich zu reduzieren. Dieser Effekt verschwand jedoch bei höheren Konzentrationen und es kam Caspase-unabhängig zu primärer Nekrose. Ebenfalls an neuronalen Zellen wurde die Ausbildung mitochondrialer Kanäle aus oligomerisiertem Bax Protein mittels Immunfluoreszenz und konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um ein proapoptotisches Protein, dessen Einbau in die äußere Mitochondrienmembran Cytochrom C und andere Promotoren der Apoptose freisetzt und damit die mitochondrial vermittelte Apoptose einleiten bzw. verstärken kann.

Die in dieser Untersuchung zu Apoptose führenden Konzentrationen von Lidocain liegen etwa eine Zehnerpotenz unterhalb von denen klinisch gebräuchlicher Lösungen. Das heißt, dass bei lokaler Injektion von Lidocain prinzipiell immer die Gefahr der Zyto- bzw. Neurotoxizität besteht. Im Allgemeinen führt der rasche Abfall der Gewebekonzentration dazu, dass diese Toxizität klinisch sehr selten zu Problemen führt. Hingegen treten im lumbalen Liquor cerebrospinalis innerhalb der ersten Stunde nach intrathekaler Injektion zur Spinalanästhesie genau die Konzentrationen auf, die in der vorgestellten Untersuchung Apoptose induzieren. Somit ist Apoptose wahrscheinlich der Mechanismus, über den Lidocain - wenn auch selten - permanente neurologische Schäden verursachen kann.

Schlussfolgernd konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Aktivierung des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose in neuronalen und nicht-neuronalen Zellen der entscheidende Mechanismus für die Toxizität von Lidocain in klinisch bedeutsamen Konzentrationen ist, während der Todesrezeptorsignalweg keine Bedeutung für die Lidocain-induzierte Apoptose hat. Weiterhin verringert sowohl die genetische als auch die pharmakologische Inhibition des mitochondrialen Signalwegs der Apoptose die Toxizität von Lidocain erheblich.

6. Literaturverzeichnis

1. Groban L: Central nervous system and cardiac effects from long-acting amide local anesthetic toxicity in the intact animal model. *Reg Anesth Pain Med* 2003; 28: 3-11
2. Groban L, Deal DD, Vernon JC, James RL, Butterworth J: Cardiac resuscitation after incremental overdosage with lidocaine, bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine in anesthetized dogs. *Anesth Analg* 2001; 92: 37-43
3. Zink W, Bohl JR, Hacke N, Sinner B, Martin E, Graf BM: The long term myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blocks. *Anesth Analg* 2005; 101: 548-54
4. Zink W, Graf BM: Local anesthetic myotoxicity. *Reg Anesth Pain Med* 2004; 29: 333-40
5. Nouette-Gaulain K, Sirvent P, Canal-Raffin M, Morau D, Malgat M, Molimard M, Mercier J, Lacampagne A, Sztark F, Capdevila X: Effects of intermittent femoral nerve injections of bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine on mitochondrial energy metabolism and intracellular calcium homeostasis in rat psoas muscle. *Anesthesiology* 2007; 106: 1026-34
6. Rodola F, Anastasi F, Vergari A: Ropivacaine induced acute neurotoxicity after epidural injection. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2007; 11: 133-5
7. Axelrod EH, Alexander GD, Brown M, Schork MA: Procaine spinal anesthesia: a pilot study of the incidence of transient neurologic symptoms. *J Clin Anesth* 1998; 10: 404-9
8. Muguruma T, Sakura S, Saito Y: Epidural lidocaine induces dose-dependent neurologic injury in rats. *Anesth Analg* 2006; 103: 876-81

9. Freedman JM, Li DK, Drasner K, Jaskela MC, Larsen B, Wi S: Transient neurologic symptoms after spinal anesthesia: an epidemiologic study of 1,863 patients. *Anesthesiology* 1998; 89: 633-41
10. 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
11. Casati A, Fanelli G, Danelli G, Berti M, Ghisi D, Brivio M, Putzu M, Barbagallo A: Spinal anesthesia with lidocaine or preservative-free 2-chlorprocaine for outpatient knee arthroscopy: a prospective, randomized, double-blind comparison. *Anesth Analg* 2007; 104: 959-64
12. Johnson ME: Potential neurotoxicity of spinal anesthesia with lidocaine. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 921-32
13. Pollock JE: Transient neurologic symptoms: etiology, risk factors, and management. *Reg Anesth Pain Med* 2002; 27: 581-6
14. Rigler ML, Drasner K, Krejcie TC, Yelich SJ, Scholnick FT, DeFontes J, Bohner D: Cauda equina syndrome after continuous spinal anesthesia. *Anesth Analg* 1991; 72: 275-81
15. Hampl KF, Schneider MC, Thorin D, Ummenhofer W, Drewe J: Hyperosmolarity does not contribute to transient radicular irritation after spinal anesthesia with hyperbaric 5% lidocaine. *Reg Anesth* 1995; 20: 363-8
16. Hampl KF, Schneider MC, Ummenhofer W, Drewe J: Transient neurologic symptoms after spinal anesthesia. *Anesth Analg* 1995; 81: 1148-53

17. Schneider M, Ettl T, Kaufmann M, Schumacher P, Urwyler A, Hampl K, von Hochstetter A: Transient neurologic toxicity after hyperbaric subarachnoid anesthesia with 5% lidocaine. *Anesth Analg* 1993; 76: 1154-7
18. Schneider MC, Hampl KF, Kaufmann M: Transient neurologic toxicity after subarachnoid anesthesia with hyperbaric 5% lidocaine. *Anesth Analg* 1994; 79: 610
19. Johnson ME, Swanson JW: Procaine spinal neurotoxicity. *Anesthesiology* 2008; 109: 349-51
20. Hampl KF, Schneider MC, Drasner K: Toxicity of spinal local anaesthetics. *Curr Opin Anaesthesiol* 1999; 12: 559-64
21. Holmdahl MH: Xylocain (lidocaine, lignocaine), its discovery and Gordh's contribution to its clinical use. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1998; 113: 8-12
22. Ready LB, Plumer MH, Haschke RH, Austin E, Sumi SM: Neurotoxicity of intrathecal local anesthetics in rabbits. *Anesthesiology* 1985; 63: 364-70
23. 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
24. Kalichman MW, Powell HC, Myers RR: Pathology of local anesthetic-induced nerve injury. *Acta Neuropathol (Berl)* 1988; 75: 583-9
25. Seitz RJ, Lipfert P, Willrich A, Himmelmann F: Toxic effects of triethyl-dodecyl-ammoniumbromide (TEA-C12) on myelinated nerve fibers and blood-nerve barrier in the mouse. *Exp Brain Res* 1989; 74: 293-302

26. 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: 338-46
27. Gold MS, Reichling DB, Hampl KF, Drasner K, Levine JD: Lidocaine toxicity in primary afferent neurons from the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 285: 413-21
28. Zink W, Missler G, Sinner B, Martin E, Fink RH, Graf BM: Differential effects of bupivacaine and ropivacaine enantiomers on intracellular Ca²⁺ regulation in murine skeletal muscle fibers. *Anesthesiology* 2005; 102: 793-8
29. Friederich P, Schmitz TP: Lidocaine-induced cell death in a human model of neuronal apoptosis. *Eur J Anaesthesiol* 2002; 19: 564-70
30. Boselli E, Duflo F, Debon R, Allaouchiche B, Chassard D, Thomas L, Portoukalian J: The induction of apoptosis by local anesthetics: a comparison between lidocaine and ropivacaine. *Anesth Analg* 2003; 96: 755-6
31. Johnson ME, Uhl CB, Spittler KH, Wang H, Gores GJ: Mitochondrial injury and caspase activation by the local anesthetic lidocaine.
Anesthesiology 2004; 101: 1184-94
32. Lirk P, Haller I, Myers RR, Klimaschewski L, Kau YC, Hung YC, Gerner P: 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
33. Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326 (Pt 1): 1-16
34. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X: Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999; 15: 269-90

-
35. Sprick MR, Rieser E, Stahl H, Grosse-Wilde A, Weigand MA, Walczak H: 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
 36. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M, Wesselborg S, Peter ME: Apoptosis signaling by death receptors. *Eur J Biochem* 1998; 254: 439-59
 37. Bossy-Wetzel E, Green DR: Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res* 1999; 434: 243-51
 38. Los M, Wesselborg S, Schulze-Osthoff K: The role of caspases in development, immunity, and apoptotic signal transduction: lessons from knockout mice. *Immunity* 1999; 10: 629-39
 39. Muravchick S, Levy RJ: Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology* 2006; 105: 819-37
 40. Cory S, Huang DC, Adams JM: The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 8590-607
 41. Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Belka C, Guner D: Guardians of cell death: the Bcl-2 family proteins. *Essays Biochem* 2003; 39: 73-88
 42. Antignani A, Youle RJ: How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* 2006; 18: 685-9
 43. Belka C, Rudner J, Wesselborg S, Stepczynska A, Marini P, Lepple-Wienhues A, Faltin H, Bamberg M, Budach W, Schulze-Osthoff K: Differential role of caspase-8 and BID activation during radiation- and CD95-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 1181-90

44. Engels IH, Stepczynska A, Stroh C, Lauber K, Berg C, Schwenzler R, Wajant H, Janicke RU, Porter AG, Belka C, Gregor M, Schulze-Osthoff K, Wesselborg S: Caspase-8/FLICE functions as an executioner caspase in anticancer drug-induced apoptosis. *Oncogene* 2000; 19: 4563-73
45. Samraj AK, Keil E, Ueffing N, Schulze-Osthoff K, Schmitz I: Loss of caspase-9 provides genetic evidence for the type I/II concept of CD95-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2006; 281: 29652-9
46. Juo P, Kuo CJ, Yuan J, Blenis J: Essential requirement for caspase-8/FLICE in the initiation of the Fas-induced apoptotic cascade. *Curr Biol* 1998; 8: 1001-8
47. Reddy UR, Venkatakrishnan G, Roy AK, Chen J, Hardy M, Mavilio F, Rovera G, Pleasure D, Ross AH: Characterization of two neuroblastoma cell lines expressing recombinant nerve growth factor receptors. *J Neurochem* 1991; 56: 67-74
48. Fulda S, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM: Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells. *Cancer Res* 1998; 58: 4453-60
49. 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
50. Cossarizza A, Baccarani-Contri 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
51. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5

-
52. Darzynkiewicz N, Robinson JP, Crissman HA: Flow Cytometry, 2nd Edition. San Diego, Academic Press, 1994
 53. Radbruch A: Flow Cytometry and Cell Sorting. Heidelberg, Springer Verlag, 2000
 54. Shapiro HM: Practical Flow Cytometry, 4th Edition. New York, Wiley-Liss, 2003
 55. Benumof JL: Permanent loss of cervical spinal cord function associated with interscalene block performed under general anesthesia. *Anesthesiology* 2000; 93: 1541-4
 56. Kontargiris E, Kolettas E, Vadalouca A, Trougakos IP, Gonos ES, Kalfakakou V: 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
 57. 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
 58. Park CJ, Park SA, Yoon TG, Lee SJ, Yum KW, Kim HJ: Bupivacaine induces apoptosis via ROS in the Schwann cell line. *J Dent Res* 2005; 84: 852-7
 59. Kamiya Y, Ohta K, Kaneko Y: Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomed Res* 2005; 26: 231-9
 60. Nishimura Y, Kanada A, Yamaguchi JY, Horimoto K, Kobayashi M, Tatsuishi T, Kanemaru K, Ueno SY, Oyama Y: Cytometric analysis of lidocaine-induced cytotoxicity: a model experiment using rat thymocytes. *Toxicology* 2006; 218: 48-57
 61. Lirk P, Haller I, Hausott B, Ingorokva S, Deibl M, Gerner P, Klimaschewski L: The neurotoxic effects of amitriptyline are mediated by apoptosis and are effectively blocked by inhibition of caspase activity. *Anesth Analg* 2006; 102: 1728-33

-
62. Tan Z, Dohi S, Chen J, Banno Y, Nozawa Y: Involvement of the mitogen-activated protein kinase family in tetracaine-induced PC12 cell death. *Anesthesiology* 2002; 96: 1191-201
 63. Green D, Kroemer G: The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol* 1998; 8: 267-71
 64. 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
 65. Drasner K: Local anesthetic neurotoxicity: clinical injury and strategies that may minimize risk. *Reg Anesth Pain Med* 2002; 27: 576-80
 66. Popitz-Bergez FA, Leeson S, Strichartz GR, Thalhammer JG: Relation between functional deficit and intraneural local anesthetic during peripheral nerve block. A study in the rat sciatic nerve. *Anesthesiology* 1995; 83: 583-92
 67. Funk W, Angerer M, Sauer K, Altmeyen J: Plexus brachialis. Langanhaltendes neurologisches Defizit nach interskalenärer Blockade des Plexus brachialis (Winnie). *Anaesthesist* 2000; 49: 625-8
 68. Coskun D, Mahli A: Long lasting neurological deficit following interscalene blockade of the brachial plexus. *Reg Anesth* 2004; 29: 111
 69. Borgeat A: Neurologic deficit after peripheral nerve block: what to do? *Minerva Anesthesiol* 2005; 71: 353-5
 70. Zink W, Sinner B, Zausig Y, Graf BM: Myotoxizität von Lokalanästhetika: Experimenteller Mythos oder klinische Wahrheit? *Anaesthesist* 2007; 56: 118-27

71. Zink W, Seif C, Bohl JR, Hacke N, Braun PM, Sinner B, Martin E, Fink RH, Graf BM: The acute myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockades. *Anesth Analg* 2003; 97: 1173-9
72. Amaniti E, Drampa F, Kouzi-Koliakos K, Kapoukranidou D, Pourzitaki C, Tsalie E, Vasilakos D: Ropivacaine myotoxicity after single intramuscular injection in rats. *Eur J Anaesthesiol* 2006; 23: 130-5
73. Stevens MF, Braun S, Fazeli S, Hermanns H, Lipfert P, Werdehausen R: Apoptotic and neurotoxic potency of commonly used local anesthetics (abstract). *Reg Anesth Pain Med* 2007; 32: 25
74. Lirk P, Haller I, Colvin HP, Lang L, Tomaselli B, Klimaschewski L, Gerner P: In vitro, inhibition of mitogen-activated protein kinase pathways protects against bupivacaine- and ropivacaine-induced neurotoxicity. *Anesth Analg* 2008; 106: 1456-64
75. Werdehausen R, Braun S, Hermanns H, Stevens M: Effects of clinically used adjuvants for regional anaesthesia on the neurotoxicity of lidocaine in vitro (abstract). *Reg Anesth Pain Med* 2008; in press
76. Stevens MF, Werdehausen R, Gaza N, Hermanns H, Braun S: Ketamine-induced apoptosis is not stereospecific and mediated via the mitochondrial pathway. *Anesthesiology* 2007; 107: A719
77. Kroemer G, Reed JC: Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000; 6: 513-9
78. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P: Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; 185: 1481-6

-
79. Denecker G, Vercammen D, Declercq W, Vandenabeele P: Apoptotic and necrotic cell death induced by death domain receptors. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58: 356-70
 80. Eguchi Y, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Shimizu S, Tsujimoto Y: ATP-dependent steps in apoptotic signal transduction. *Cancer Res* 1999; 59: 2174-81
 81. Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E: Intracellular ATP, a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Toxicol Lett* 1998; 102-103: 139-42
 82. 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
 83. Ly JD, Grubb DR, Lawen A: The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update. *Apoptosis* 2003; 8: 115-28
 84. Neise D, Graupner V, Gillissen BF, Daniel PT, Schulze-Osthoff K, Janicke RU, Essmann F: Activation of the mitochondrial death pathway is commonly mediated by a preferential engagement of Bak. *Oncogene* 2007
 85. 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
 86. Yon JH, Daniel-Johnson J, Carter LB, Jevtovic-Todorovic V: Anesthesia induces neuronal cell death in the developing rat brain via the intrinsic and extrinsic apoptotic pathways. *Neuroscience* 2005; 135: 815-27
 87. Gerner P, Strichartz GR: Sensory and motor complications of local anesthetics. *Muscle Nerve* 2008; 37: 421-5

88. Ohtake K, Matsumoto M, Wakamatsu H, Kawai K, Nakakimura K, Sakabe T: Glutamate release and neuronal injury after intrathecal injection of local anesthetics. *Neuroreport* 2000; 11: 1105-9
89. Johnson ME, Saenz JA, DaSilva AD, Uhl CB, Gores GJ: Effect of local anesthetic on neuronal cytoplasmic calcium and plasma membrane lysis (necrosis) in a cell culture model. *Anesthesiology* 2002; 97: 1466-76
90. Zink W, Graf BM, Sinner B, Martin E, Fink RH, Kunst G: Differential effects of bupivacaine on intracellular Ca²⁺ regulation: potential mechanisms of its myotoxicity. *Anesthesiology* 2002; 97: 710-6
91. Cao J, Viholainen JI, Dart C, Warwick HK, Leyland ML, Courtney MJ: The PSD95-nNOS interface: a target for inhibition of excitotoxic p38 stress-activated protein kinase activation and cell death. *J Cell Biol* 2005; 168: 117-26
92. Zarubin T, Han J: Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 2005; 15: 11-8
93. Camacho A, Massieu L: Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res* 2006; 37: 11-8
94. Criddle DN, Gerasimenko JV, Baumgartner HK, Jaffar M, Voronina S, Sutton R, Petersen OH, Gerasimenko OV: Calcium signalling and pancreatic cell death: apoptosis or necrosis? *Cell Death Differ* 2007; 14: 1285-94
95. Haller I, Hausott B, Tomaselli B, Keller C, Klimaschewski L, Gerner P, Lirk P: Neurotoxicity of lidocaine involves specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase, but not extracellular signal-regulated or c-jun N-terminal kinases, and is mediated by arachidonic acid metabolites. *Anesthesiology* 2006; 105: 1024-33

-
96. Kalmes A, Deou J, Clowes AW, Daum G: Raf-1 is activated by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580. *FEBS Lett* 1999; 444: 71-4
 97. Lali FV, Hunt AE, Turner SJ, Foxwell BM: The pyridinyl imidazole inhibitor SB203580 blocks phosphoinositide-dependent protein kinase activity, protein kinase B phosphorylation, and retinoblastoma hyperphosphorylation in interleukin-2-stimulated T cells independently of p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 2000; 275: 7395-402
 98. Wang Y, Sun L, Xia C, Ye L, Wang B: P38MAPK regulates caspase-3 by binding to caspase-3 in nucleus of human hepatoma Bel-7402 cells during anti-Fas antibody- and actinomycin D-induced apoptosis. *Biomed Pharmacother* 2008
 99. Gronert K, Virk SM, Herman CA: Endogenous sulfidopeptide leukotriene synthesis and 12-lipoxygenase activity in bullfrog (*Rana catesbeiana*) erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1255: 311-9
 100. Meyer GE, Chesler L, Liu D, Gable K, Maddux BA, Goldenberg DD, Youngren JF, Goldfine ID, Weiss WA, Matthay KK, Rosenthal SM: Nordihydroguaiaretic acid inhibits insulin-like growth factor signaling, growth, and survival in human neuroblastoma cells. *J Cell Biochem* 2007; 102: 1529-41
 101. Nakayama T: Suppression of hydroperoxide-induced cytotoxicity by polyphenols. *Cancer Res* 1994; 54: 1991s-1993s
 102. Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakishi S: The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat Res* 1992; 281: 77-80

7. Danksagung

Herrn PD Dr. med. MARKUS F. STEVENS und Herrn Prof. PETER LIPFERT möchte ich herzlich für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe sowie für die Überlassung des Themas und die sehr engagierte Betreuung danken. Insbesondere gilt mein Dank ihrer Diskussionsbereitschaft, ihrer Aufgeschlossenheit und der kontinuierlichen Förderung meiner wissenschaftlichen Ausbildung.

Herrn Prof. Dr. med. JÖRG TARNOW danke ich für die freundliche Aufnahme als Doktorand seiner Klinik und seine Unterstützung bei der Vorbereitung von Publikationen und Vorträgen.

Herrn Prof. Dr. med. FRITZ BOEGE danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. med. BENEDIKT H. PANNEN danke ich für die vertrauensvolle Aufnahme als wissenschaftlicher Mitarbeiter in seine Klinik, für die persönliche Betreuung meiner klinischen und wissenschaftlichen Ausbildung.

Frau PD Dr. rer. nat. INGE BAUER danke ich für Ihre Unterstützung bei der Planung und Durchführung derzeitiger und zukünftiger Projekte zur Fortführung meiner wissenschaftlichen Arbeit.

Herrn Dr. rer. nat. FRANK EBMANN und Herrn Prof. Dr. med. KLAUS SCHULZE-OSTHOFF möchte ich für ihre aufopferungsvolle wissenschaftliche Kooperation, insbesondere bei methodischen Fragen und experimentellen Ansätzen, sowie für die konstruktive Mitarbeit an der Publikation meiner Untersuchungen danken.

Meinen sehr guten Freunden und Kollegen Herrn Dr. med. SEBASTIAN BRAUN und Herrn Dr. med. HENNING HERMANNS möchte ich für ihre Diskussionsbereitschaft und Zusammenarbeit bei gemeinsamen Projekten und Publikationen danken.

Meinen Eltern Herrn Dr. med. KLAUS WERDEHAUSEN und Frau Dr. med. KARIN WERDEHAUSEN danke ich ganz besonders für ihre jahrelange materielle und ideelle Unterstützung. Sie förderten selbstlos und mit großem Interesse mein Studium, meine wissenschaftlichen Ziele und die zahlreichen Kongressteilnahmen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Verlobten TANJA MÜLLER, die mir sowohl in der Zeit der experimentellen Arbeiten als auch in den Korrekturphasen der Arbeit stets ein liebevoller und verständnisvoller Rückhalt war.

Ich bin sehr dankbar, durch diese Promotionsarbeit, aber auch die weiteren unter der Anleitung von PD Dr. STEVENS und Prof. Dr. LIPFERT erfolgreich durchgeführten Projekte meine Faszination für die Forschung und Lehre auf dem Gebiet der Anästhesiologie entdeckt zu haben, was - so hoffe ich - mein künftiges Berufsleben weitgehend bestimmen wird.

8. Curriculum Vitae

Name: Robert Werdehausen
Geburtstag: 14. März 1979
Geburtsort: Mülheim a. d. Ruhr
Nationalität: deutsch
Anschrift: Ziegeleiweg 34, 40591 Düsseldorf
Familienstand: ledig

Ausbildung

1985 - 1989 Eduard-Grundschule, Mülheim a. d. Ruhr
1989 - 1998 Karl-Ziegler-Gymnasium, Mülheim a. d. Ruhr
1996 - 1997 staatl. geprüfter Rettungssanitäter, JUH Münster
1998 - 2000 staatl. geprüfter Rettungsassistent, DAA Köln
2001 - 2007 Medizinstudium, Heinrich-Heine Universität, Düsseldorf
2003 - 2007 Studiengang „Traditionelle Chinesische Medizin“ (TCM),
Universität Witten/Herdecke, anerkanntes Zertifikat der ÄK

Berufliche Erfahrung

1998 - 1999 Zivildienst: Rettungsdienst, JUH Mülheim a. d. Ruhr
2000 - 2001 Anstellung als Rettungsassistent, JUH Mülheim a. d. Ruhr
1999 - 2005 Mitarbeit auf der interdisziplinären Intensivstation,
Wedau Kliniken, Duisburg
2003 - 2007 Mitarbeiter der Arbeitsgruppe “Neuronale Plastizität”
(Leitung: Prof. Dr. med. P. Lipfert/Dr. med. M. F. Stevens)
Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
Seit 2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der
Klinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Düsseldorf
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. H. Pannen)

Forschungsgebiete

- Effekte von Sympathikolyse durch Regionalanästhesieverfahren (klinisch)
- Neue Verfahren in der Regionalanästhesie (klinisch)

- Mechanismen neuronaler und nicht-neuronaler Apoptose induziert durch Lokalanästhetika und Allgemeinanästhetika (experimentell)

Preise

2. Preis im wissenschaftlichen Vortragswettbewerb auf dem jährlichen Deutschen Anästhesie Congress (DAC) 2006 der Deutschen Gesellschaft für Anästhesie und Intensivmedizin
3. Posterpreis des Europäischen Regionalanästhesie Kongresses (ESRA) 2007

Zusatzqualifikationen

- | | |
|-----------|--|
| 1995 | 3-wöchiger Intensivkurs "advanced american english"
Florida Language Center (ESL), Fort Lauderdale, Florida, USA |
| 2002 | Grundkurs Sonographie, UKD |
| 2003 | Kursus der computertomographischen Bildgebung, UKD |
| 2005 | Fachkundenachweis Versuchstierkunde
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf |
| Seit 2003 | Regelmäßige Mitwirkung bei Düsseldorfer Regionalanästhesie
Symposien und Workshops, Universitätsklinikum Düsseldorf |

Soziales Engagement

Seit 1996 ehrenamtliche Mitarbeit im Bereich Teamleitung und Fortbildung im Rettungsdienst der Johanniter-Unfall-Hilfe e.V. der Stadt Mülheim an der Ruhr

Mitgliedschaften

Deutsche Gesellschaft für Anästhesie und Intensivmedizin (DGAI)
International Anesthesiology Research Society (IARS)

Publikationen und Vorträge

Originalarbeiten

Skin temperature during regional anesthesia of the lower extremity
M.F. Stevens, **R. Werdehausen**, H. Hermanns, P. Lipfert
Anesthesia & Analgesia 2006 Apr; 102(4):1247-51.

Sedation during spinal anaesthesia in infants
H. Hermanns, M.F. Stevens, **R. Werdehausen**, S. Braun, P. Lipfert, M. Jetzek-Zader
British Journal of Anaesthesia 2006 Sep; 97(3):380-4.

Uniform distribution of skin temperature increase following different regional anesthesia techniques of the lower extremity
R. Werdehausen, S. Braun, H. Hermanns, R. Freynhagen, P. Lipfert, M.F. Stevens
Regional Anesthesia and Pain Medicine 2007 Jan-Feb; 32(1):73-78.

Does interscalene catheter placement with stimulating catheters improve postoperative pain or functional outcome after shoulder surgery? - A randomized, controlled, and double-blinded trial -
M.F. Stevens, **R. Werdehausen**, E. Golla, S. Braun, H. Hermanns, A. Ilg, R. Willers, P. Lipfert
Anesthesia & Analgesia 2007 Feb; 104(2):442-7.

Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling
R. Werdehausen, S. Braun, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, H. Walczak, P. Lipfert, M.F. Stevens
Anesthesiology 2007 Jul; 107(1):136-43.

Skin temperature after interscalene brachial plexus blockade
H. Hermanns, S. Braun, **R. Werdehausen**, A. Werner, P. Lipfert, M.F. Stevens
Regional Anesthesia and Pain Medicine 2007 Nov-Dec;32(6):481-7.

Stimulating catheter as a tool to evaluate peripheral nerve function during hip rotationplasty
R. Werdehausen, S. Braun, H. Hermanns, R. Krauspe, P. Lipfert, M.F. Stevens
Regional Anesthesia and Pain Medicine 2007 Nov-Dec; 32(6):528-32.

Differential effects of spinally applied glycine transporter inhibitors on nociception in a rat model of neuropathic pain
H. Hermanns, U. Muth-Selbach, R. Williams, S. Krug, P. Lipfert, **R. Werdehausen**, S. Braun,
I. Bauer
Neuroscience Letters 2008 Nov;445(3):214-9.

Loss of spinal glycinergic neurons is not necessary for development of neuropathic pain in transgenic mice expressing enhanced green fluorescent protein in glycinergic neurons
H. Hermanns, U. Muth-Selbach, P. Lipfert, S. Braun, **R. Werdehausen**, I. Bauer
Neuroscience 2009 Mar;159(3):1148-53.

Lidocaine protects from myocardial damage due to ischemia and reperfusion in mice by its antiapoptotic effects
D.J. Kaczmarek, C. Herzog, J. Larmann, H.J. Gillmann, R. Hildebrand, M. Schmitz, A. Westermann,
T. Harendza, **R. Werdehausen**, A.W. Osthaus, F. Echtermeyer, K. Hahnenkamp, K.C. Wollert,
G. Theilmeier

Vorträge

Verlauf der Hauttemperatur nach Anlage einer kombinierten Femoralis/Ischiadicus-Blockade
M.F. Stevens, **R. Werdehausen**, P. Lipfert
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2004, Nürnberg

*Hauttemperatur bei verschiedenen Regionalanästhesien:
Untersuchungen mittels Infrarot-Thermographie*
M.F. Stevens, **R. Werdehausen**, P. Lipfert
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2005, München

*Zeitverlauf des Temperaturanstieges bei Periduralanästhesien bzw.
kombinierten Ischiadicus / Femoralisblockaden*
R. Werdehausen, M.F. Stevens, P. Lipfert
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2005, München

Infrared-thermography during regional anaesthesia
R. Werdehausen, M.F. Stevens, H. Hermanns, S. Braun, P. Lipfert
European Congress of Regional Anaesthesia (ESRA) 2005, Berlin
Regional Anesthesia and Pain Medicine 2005, Vol. 30, Issue 5, Supplement 1, Page 17.

Skin temperature during regional anaesthesia of the lower extremity
M.F. Stevens, **R. Werdehausen**, H. Hermanns, P. Lipfert
European Congress of Regional Anaesthesia (ESRA) 2005, Berlin
Regional Anesthesia and Pain Medicine 2005, Vol. 30, Issue 5, Supplement 1, Page 28.

Lidocain-induzierte Apoptose wird durch Überexpression von Bcl-2 inhibiert

R. Werdehausen, S. Braun, F. Essmann, P. Lipfert, M.F. Stevens

Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2006, Leipzig

2. Preis im wissenschaftlichen Vortragswettbewerb

Effektivität stimulierbarer interskalenärer Katheter nach Schulteroperationen:

Eine randomisierte, doppelt-blind Studie

M.F. Stevens, E. Golla, **R. Werdehausen**, S. Braun, H. Hermanns, P. Lipfert

Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2006, Leipzig

Does interscalene catheter placement with stimulating catheters improve postoperative pain or functional outcome after shoulder surgery? - A randomized, controlled, and double-blinded trial.

M.F. Stevens, **R. Werdehausen**, E. Golla, S. Braun, H. Hermanns, P. Lipfert

Jahrestagung der European Society of Anaesthesiology (ESA) Euroanaesthesia 2006, Madrid

European Journal of Anaesthesiology 2006, Vol. 23, Supplement 37: A489.

Lidocaine induced apoptosis is diminished in Bcl-2 protein-overexpressing Jurkat cells.

M.F. Stevens, **R. Werdehausen**, S. Braun, F. Essmann, P. Lipfert

Jahrestagung der European Society of Anaesthesiology (ESA) Euroanaesthesia 2006, Madrid

European Journal of Anaesthesiology 2006, Vol. 23, Supplement 37: A508.

Does interscalene catheter placement with stimulating catheters improve postoperative pain or functional outcome after shoulder surgery?

M.F. Stevens, **R. Werdehausen**, E. Golla, S. Braun, H. Hermanns, A. Ilg, P. Lipfert

Jahrestagung der European Society of Regional Anaesthesia (ESRA) 2006, Monte Carlo

Regional Anesthesia and Pain Medicine 2006, Vol. 31, Supplement 2: 22.

Sedation during spinal anaesthesia in infants

M.F. Stevens, H. Hermanns, **R. Werdehausen**, S. Braun, P. Lipfert, M. Jetzek-Zader

Jahrestagung der European Society of Regional Anaesthesia (ESRA) 2006, Monte Carlo

Regional Anesthesia and Pain Medicine 2006, Vol. 31, Supplement 2: 12.

Lidocaine-induced apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway.

M.F. Stevens, P. Lipfert, S. Braun, F. Essmann, **R. Werdehausen**

Jahrestagung der European Society of Regional Anaesthesia (ESRA) 2006, Monte Carlo

Regional Anesthesia and Pain Medicine 2006, Vol. 31, Supplement 2: 31.

Untersuchungen zum Mechanismus der Ketamin-induzierten Apoptose an Jurkat-T- und Neuroblastomzellen

S. Braun, **R. Werdehausen**, N. Gaza, H. Hermanns, P. Lipfert, M.F. Stevens

Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI 2007, Würzburg

Anästhesiologie und Intensivmedizin 2007, 7: 362-363

Vergleich somatosensorisch evozierter Potentiale bei Patienten mit neuromuskulärer und idiopathischer Skoliose

H. Hermanns, S. Braun, **R. Werdehausen**, P. Lipfert, M.F. Stevens

Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Mechanismen der Ketamin-induzierten Apoptose an nicht-neuronalen und neuronalen Zellen

S. Braun, N. Gaza, **R. Werdehausen**, S. Fazeli, H. Hermanns, P. Lipfert, M.F. Stevens

Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Mechanismus der durch Midazolam induzierten Apoptose an T-Lymphom- und Neuroblastomzellen des Menschen

N. Gaza, S. Braun, **R. Werdehausen**, S. Fazeli, H. Hermanns, P. Lipfert, M.F. Stevens

Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Die Lipophilie eines Lokalanästhetikums determiniert seine apoptotische Potenz

S. Fazeli, **R. Werdehausen**, S. Braun, N. Gaza, P. Lipfert, M.F. Stevens

Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Ropivacain- und Bupivacain-induzierte Apoptose ist nicht stereospezifisch

M.F. Stevens, S. Fazeli, **R. Werdehausen**, S. Braun, P. Lipfert
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Lidocain induziert Apoptose an neuronalen Zellen des Menschen und führt zum Einbau von Bax-Kanälen in Mitochondrien

R. Werdehausen, F. Essmann, S. Braun, H. Hermanns, S. Fazeli, P. Lipfert, M.F. Stevens
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Vergleich der apoptotischen Potenz verschiedener Lokalanästhetika an neuronalen Zellen

R. Werdehausen, S. Fazeli, S. Braun, N. Gaza, H. Hermanns, P. Lipfert, M.F. Stevens
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Ketanest S[®] induziert mehr Apoptose als die Reinsubstanz S-Ketamin an T-Lymphomzellen und Neuroblastomzellen des Menschen durch den Zusatz von Benzethonium

S. Braun, N. Gaza, **R. Werdehausen**, H. Hermanns, P. Lipfert, M.F. Stevens
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2007, Hamburg

Aufklärung des für die lokale Neurotoxizität von Lokalanästhetika verantwortlichen Signalweges der Apoptose

R. Werdehausen, S. Braun, H. Hermanns, S. Fazeli, P. Lipfert, F. Essmann, K. Schulze-Osthoff, H. Walczak, M.F. Stevens

2. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchses der Universität Düsseldorf 2007

Apoptotic and neurotoxic potency of commonly used local anesthetics

M.F. Stevens, S. Braun, S. Fazeli, H. Hermanns, P. Lipfert, **R. Werdehausen**
Jahrestagung der European Society of Regional Anaesthesia (ESRA) 2007, Valencia
Regional Anesthesia and Pain Medicine 2007, Vol. 32, Issue 5, Page 25.

Can assessment of skin temperature predict the success of interscalene brachial plexus blockade?

H. Hermanns, S. Braun, **R. Werdehausen**, P. Lipfert, M.F. Stevens
Jahrestagung der European Society of Regional Anaesthesia (ESRA) 2007, Valencia
Regional Anesthesia and Pain Medicine 2007, Vol. 32, Issue 5, Page 119.

Bax-activation during lidocaine-induced apoptosis in human neuroblastoma cells

M.F. Stevens, S. Braun, H. Hermanns, P. Lipfert, F. Essmann, **R. Werdehausen**
Jahrestagung der European Society of Regional Anaesthesia (ESRA) 2007, Valencia
Regional Anesthesia and Pain Medicine 2007, Vol. 32, Issue 5, Page 186.

3. Preis im wissenschaftlichen Posterwettbewerb*High-Volume-CVVH zur Behandlung des ANV bei Rhabdomyolyse*

S. Braun, H. Hermanns, **R. Werdehausen**, Detlef Kindgen-Milles
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2008, Dresden

Der Einfluss klinisch verwendeter Adjuvantien auf die Neurotoxizität von Lidocain in vitro

R. Werdehausen, S. Braun, H. Hermanns, M. F. Stevens
Deutscher Anästhesiologie Congress (DAC) 2008, Dresden

Effects of clinically used adjuvants for regional anaesthesia on the neurotoxicity of lidocaine in vitro

R. Werdehausen, S. Braun, H. Hermanns, M.F. Stevens
Jahrestagung der European Society of Regional Anaesthesia (ESRA) 2008, Genua
Regional Anesthesia and Pain Medicine 2008, Vol. 33, Issue 5, Page e26.

Düsseldorf, den 1. Februar 2009

9. Abstrakt

Lokalanästhetika sind in Abhängigkeit von Konzentration und Einwirkdauer neurotoxisch. Klinisch können daher transiente neurologische Symptome, selten auch permanente neurologische Schäden nach Spinalanästhesie auftreten, insbesondere bei Verwendung von Lidocain. *In vitro* induzieren Lokalanästhetika Apoptose, hingegen ist der zugrunde liegende Mechanismus der Apoptoseinduktion durch Lidocain unbekannt. Anhand genetisch veränderter Zellen des Menschen wurde daher die Bedeutung verschiedener Signalwege der Apoptose auf die Toxizität von Lidocain untersucht.

An Jurkat T-Lymphomzellen des Menschen wurde hierzu entweder der mitochondriale Signalweg der Apoptose (Bcl-2-Überexpression bzw. Caspase 9-Defizienz) oder der Todesrezeptorsignalweg (Caspase 8-Defizienz bzw. FADD-Defizienz) inhibiert. Die verschiedenen Zellstämme wurden mit Lidocain behandelt und mit den parentalen Wildtypzellen verglichen. Hierzu wurden die Zellvitalität (Trypan Blau-Methode), das mitochondriale Membranpotential (JC-1, Durchflusszytometrie), die Cytochrom C-Freisetzung (Western Blot Analysen), die Aktivierung von Caspase 3 (Substratspaltung) und die Externalisierung von Phosphatidylserin (Annexin V-Bindung) als früher Apoptosemarker gemessen. An humanen Neuroblastomzellen (Typ SHEP) wurden neben der Induktion von Apoptose durch Lidocain die Effekte eines Pancaspase-Inhibitors (Q-VD) sowie die Aktivierung des proapoptotischen Proteins Bax (konfokale Laser Scanning-Mikroskopie) als Bestandteil des mitochondrialen Signalweges untersucht.

An Jurkat Zellen reduzierte Lidocain konzentrationsabhängig das mitochondriale Membranpotential und den Anteil vitaler Zellen. Lidocain in geringeren (3-6 mM), nicht hingegen in höheren Konzentrationen (10 mM), aktivierte Caspase 3 und setzte Cytochrom C aus Mitochondrien frei. Zellen, bei denen der mitochondriale Signalweg der Apoptose genetisch inhibiert war (Bcl-2-Überexpression bzw. Caspase 9-Defizienz), waren geschützt vor der Apoptose-induzierenden Wirkung von Lidocain. Hingegen führte eine Beeinflussung des Todesrezeptorsignalweges (Caspase 8-Defizienz bzw. FADD-Defizienz) nicht zu einem Schutz vor der toxischen Wirkung von Lidocain. Auch an neuronalen Zellen des Menschen induzierte Lidocain konzentrationsabhängig Apoptose. Der eingesetzte Caspase-Inhibitor konnte die Toxizität von Lidocain in Konzentrationen unter 12 mM erheblich reduzieren. Mit Hilfe eines konfokalen Laser Scanning-Mikroskops konnte zudem der Einbau von aktivierten Bax Proteinen in Mitochondrien nachgewiesen werden.

Lidocain in niedrigen Konzentrationen, wie sie intrathekal nach Spinalanästhesien auftreten, induziert bei humanen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen Apoptose. Höhere Konzentrationen führen dagegen zu primärer Nekrose. Erstmals wurde die Aktivierung des mitochondrialen Signalweges der Apoptose an neuronalen und nicht-neuronalen Zellen des Menschen als der entscheidende Mechanismus der Lidocain-induzierten Apoptose identifiziert, während der Todesrezeptorsignalweg keinen Einfluss hat. Eine Inhibition des mitochondrialen Signalweges der Apoptose reduziert daher erheblich die Neurotoxizität von Lidocain.