

Aus der Klinik für Anästhesie und Intensivtherapie  
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Hinnerk Wulf  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

**Histologische Veränderungen an peripheren Nerven nach  
peri- und intraneuraler Injektion von Bupivacain versus  
Bupivacain & Clonidin in einem experimentellen  
Regionalanästhesiemodell**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
**Sebastian Schüppel**  
aus Heidelberg

**Marburg 2020**

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am  
19.03.2020

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan:	Herr Prof. Dr. Helmut Schäfer
Referent:	Herr PD Dr. med. Thomas Wiesmann
Korreferent:	Herr Prof. Dr. med. Frank Czubayko

*für alle Versuchsferkel*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>6</b>
<b>1.1 HINTERGRUND</b> .....	<b>6</b>
<b>1.2 ANATOMIE UND PHYSIOLOGIE DES PERIPHEREN NERVENSYSTEMS</b> .....	<b>7</b>
1.2.1 MAKROSKOPISCHE ANATOMIE DES PLEXUS BRACHIALIS .....	7
1.2.2 MIKROSKOPISCHE ANATOMIE DES PERIPHEREN NERVENSYSTEMS.....	10
1.2.3 PHYSIOLOGIE DES PERIPHEREN NERVENSYSTEMS .....	14
1.2.4 ANATOMISCHE UND PHYSIOLOGISCHE ASPEKTE ZUM SCHWEIN ALS VERSUCHSTIER .....	14
<b>1.3 REGIONALANÄSTHESIE</b> .....	<b>16</b>
1.3.1 ÜBERBLICK .....	16
1.3.2 PHARMAKOLOGIE DER LOKALANÄSTHETIKA.....	17
1.3.3 PHARMAKOLOGIE VON CLONIDIN.....	21
1.3.4 CLONIDIN ALS ADJUVANZ IN DER REGIONALANÄSTHESIE .....	22
1.3.5 KOMPLIKATIONEN DER REGIONALANÄSTHESIEN .....	23
1.3.6 PATHOPHYSIOLOGIE UND IMMUNOLOGIE DES PERIPHEREN NERVENTRAUMAS .....	24
1.3.7 ANTIINFLAMMATORISCHE EIGENSCHAFTEN VON CLONIDIN .....	26
<b>1.4 STUDIENLAGE</b> .....	<b>27</b>
<b>1.5 FRAGESTELLUNG</b> .....	<b>29</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>30</b>
<b>2.1 VERSUCHSTIERE</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2 VERSUCHSAUFBAU UND -DURCHFÜHRUNG</b> .....	<b>31</b>
2.2.1 NARKOSEEINLEITUNG UND ANÄSTHESIOLOGISCHE VERSORGUNG .....	31
2.2.2 PRÄPARATION DES PLEXUS BRACHIALIS .....	32
2.2.3 INJEKTIONS-LÖSUNGEN UND DURCHFÜHRUNG DER INTERVENTIONEN ..	33
2.2.4 NERVENENTNAHME .....	35
<b>2.3 HISTOLOGIE</b> .....	<b>35</b>
2.3.1 HISTOLOGISCHE AUFARBEITUNG.....	35
2.3.2 HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG .....	36
2.3.3 MARKSCHEIDENFÄRBUNG NACH KLÜVER-BARRERA.....	37
2.3.4 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG .....	38
2.3.5 TRAUMA-SCORE UND HISTOLOGISCHE AUSWERTUNG.....	41

<b>2.4 STATISTISCHE METHODEN</b> .....	<b>42</b>
2.4.1 FALLZAHLBERECHNUNG .....	42
2.4.2 STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	43
<b>3. ERGEBNISSE</b> .....	<b>44</b>
3.1 VERSUCHSTIERE .....	44
3.2 NERVENPROBEN .....	44
3.3 HE-FÄRBUNG .....	45
3.4 KLÜVER-BARRERA-FÄRBUNG.....	49
3.5 IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG.....	52
3.6 ERGEBNISSE DES HISTOLOGISCHEN TRAUMA-SCORES .....	55
3.7 STATISTISCHER VERGLEICH DER EINZELNEN GRUPPEN.....	58
<b>4. DISKUSSION</b> .....	<b>60</b>
4.1 ERGEBNISSE.....	60
4.2 ERGEBNISSE IM KONTEXT VORLIEGENDER LITERATUR.....	60
4.3 LIMITATIONEN .....	65
4.4 AUSBLICK UND KLINISCHE PRAXIS.....	68
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>69</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	<b>71</b>
<b>7. TABELLEN- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>80</b>
7.1 TABELLENVERZEICHNIS .....	80
7.2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS: .....	81
<b>8. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>82</b>
<b>9. VERZEICHNIS AKADEMISCHER LEHRER</b> .....	<b>84</b>
<b>10. DANKSAGUNG</b> .....	<b>85</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Als Anästhesie wird der Zustand der Empfindungslosigkeit bezeichnet, der in der Medizin zum Zwecke operativer oder diagnostischer Interventionen, aber auch aus therapeutischen Gründen erreicht werden soll. Das Spektrum der heutigen Anästhesie umfasst neben der Allgemein- auch die Regionalanästhesie. Diese kann bei bestimmten operativen Eingriffen und patientenindividuellen Voraussetzungen die Allgemeinanästhesie komplett ersetzen oder mit ihr im Sinne einer postoperativen Schmerztherapie kombiniert werden. Anatomisch lässt sich die Regionalanästhesie in eine zentrale (Peridural- und Spinalanästhesie) und eine periphere Form (Plexusanästhesien und einzelne Nervenblockaden) unterteilen. Erstmals beschrieben wurde eine Form der regionalen Betäubung im Jahr 1884 vom österreichischen Ophthalmologen Karl Koller, dem es gelang mit Hilfe einer Kokainlösung den weltweit ersten chirurgischen Eingriff unter lokaler Anästhesie der Cornea durchzuführen<sup>81</sup>.

Wie jedes medizinische Verfahren ist auch die Regionalanästhesie nicht frei von Komplikationen. Im Rahmen einer Regionalanästhesien kann es z.B. zu Nervenschäden kommen. Diese Neuropathien zeigen sich histologisch als aseptische Inflammationsreaktionen und klinisch als neurologische Defizite. Angaben zu transienten und persistierenden neurologischen Defiziten nach Operationen in Regionalanästhesie variieren je nach Lokalisation der blockierten Nerven zwischen 0,04–3,0 %<sup>3, 10, 13, 65</sup>. Somit ist die Komplikationsrate nach einer Regionalanästhesie zwar geringer als nach einer Allgemeinanästhesie<sup>6, 10</sup>, angesichts der steigenden Zahlen durchgeführter Eingriffe unter regionaler Betäubung, die zurzeit im deutschsprachigen Raum bei etwa 25 %<sup>6</sup> aller Anästhesieverfahren liegen dennoch von hoher klinischer Relevanz. Anästhesiologische Ursachen post-interventioneller Nervenschäden<sup>10, 38</sup> sind u.a. mechanische Nadel-Nerv-Traumata, Drucktraumata und die Lokalanästhetika selbst, denen in verschiedenen experimentellen Studien neurotoxische Nebenwirkungen nachgewiesen wurden<sup>42, 43, 64, 70, 81, 83, 70, 94, 100</sup>.

Zusätzlich zum Lokalanästhetikum eingesetzte Adjuvanzien (wie z. B. Clonidin, Dexmedetomidin, Dexamethason, Adrenalin) dienen dazu, die Blockadezeit zu verlängern und gleichzeitig die benötigte Menge an Lokalanästhetika und damit deren Nebenwirkungen zu reduzieren.

Clonidin ist pharmakologisch ein klassischer  $\alpha_2$ -Agonist und wurde 1966 als Antihypertonikum auf dem Markt eingeführt<sup>86</sup>. Nachdem Clonidin bei intrathekaler Gabe in tierexperimentellen Versuchen eine analgetische Wirkung zeigte<sup>73</sup>, wurde es erstmals 1984 von Tamsen und Gordth als Adjuvanz zur PDA<sup>93</sup> und 1991 zum ersten Mal als Adjuvanz zur brachialen Plexusanästhesie beschrieben<sup>20</sup>. In beiden Fällen kam es zu verlängerten Analgesiezeiten. Neben dieser co-analgetischen<sup>18, 19, 93</sup> besitzt Clonidin tierexperimentell auch eine antiinflammatorische Wirkung<sup>77 79</sup>. Der Effekt dieser antiinflammatorischen Komponente von Clonidin auf die durch Regionalanästhesien ausgelöste aseptische Inflammationsreaktion und darausfolgender Neuropathien an den jeweiligen betäubten Nerven ist bisher durch Studien kaum untersucht und Gegenstand dieser Arbeit.

## **1.2 Anatomie und Physiologie des peripheren Nervensystems**

### **1.2.1 Makroskopische Anatomie des Plexus brachialis**

Der Großteil des peripheren somatischen Nervensystems wird von den Spinalnerven gestellt. Spinalnerven treten mit einer Vorder- und einer Hinterwurzel aus dem Rückenmark aus, lagern sich in den Foramina intervertebralia zusammen und enthalten motorische, sensible und vegetative Anteile. Die 31- paarigen Spinalnerven werden wie folgt unterteilt<sup>87</sup>:

- acht zervikale Spinalnerven (C1–C8)
- zwölf thorakale Spinalnerven (Th1–Th12)
- fünf lumbale Spinalnerven (L1–L5)
- fünf sakrale Spinalnerven (S1–S5)
- ein coccygealer Spinalnerv

Im Verlauf nach distal teilen sich die Spinalnerven in verschiedene Anteile auf (R. anterior, R. posterior, R. communicans und R. meningeus). Die Rr. anteriores bilden an den Extremitätenursprüngen die Plexus. Dabei werden

Nervenfasern verschiedener Spinalnerven durchmischt und es entstehen die peripheren Nerven. Diese enthalten Fasern mehrerer Rückenmarkssegmente und versorgen die Extremitäten sowohl motorisch, sensibel als auch vegetativ. Der Plexus brachialis wird aus den Rr. anteriores der Segmente C5–Th1<sup>87</sup> gebildet und versorgt Teile der Brust, die komplette Schulter sowie Ober- und Unterarm. Anatomisch wird der Plexus brachialis in drei Abschnitte eingeteilt. Innerhalb der Skalenuslücke (begrenzt durch M. scalenus ant. und M. scalenus med.) lagern sich die Rr. anteriores der Nerven C5–Th1 zu drei Trunci zusammen:

- Truncus superior bestehend aus C5–C6
- Truncus medius bestehend aus C7
- Truncus inferior bestehend aus C8–Th1

Im weiteren Verlauf nach distal gibt jeder Truncus einen vorderen und einen hinteren Ast (sog. Divisiones anteriores und posteriores; getrennt nach Innervation von Extensoren oder Flexoren) ab. Diese Fasern lagern sich im Bereich unterhalb der Clavicula zu sog. Fasciculi zusammen, die nach ihrer relativen anatomischen Lage zur A. axillaris benannt werden<sup>87</sup>:

- Fasciculus lateralis: Vereinigung der Divisiones anteriores der superioren und medialen Trunci (C5–C7)
- Fasciculus medialis: Divisio anterior der Trunci inferior (C8–Th1)
- Fasciculus posterior: Vereinigung der Divisiones posteriores aller drei Trunci (C5–Th1)

Aus den Fasciculi gehen letztendlich u. a. die peripheren Armnerven hervor, die den Oberarm motorisch und sensibel versorgen<sup>87</sup>.

- N. musculocutaneus: entspringt direkt aus dem Fasciculus lateralis und enthält die Fasern C5–C7
- N. medianus: entspringt aus dem Fasciculus lateralis sowie medialis und enthält die Fasern C6–Th1
- N. ulnaris: entspringt direkt aus dem Fasciculus medialis und enthält die Fasern C8–Th1
- N. radialis: entspringt aus dem Fasciculus posterior und enthält die Fasern C5–Th1



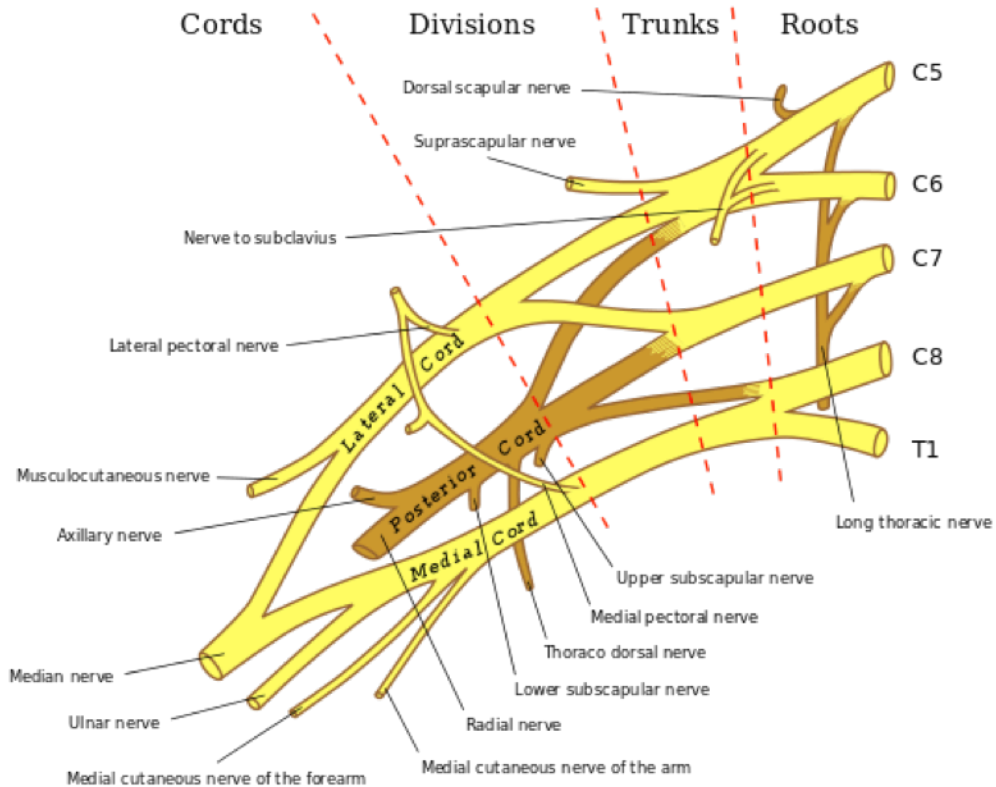


Abbildung 1 Plexus brachialis des Menschen aus <sup>31</sup>

Fasciculus lateralis	Fasciculus medialis:	Fasciculus posterior:
<ul style="list-style-type: none"> <li>N. musculocutaneus</li> <li>N. pectoralis lat.</li> <li>Radix lateralis des N. medianus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>N. ulnaris</li> <li>N. pectoralis med.</li> <li>Radix medialis des N. medianus</li> <li>N. cutaneus brachii medialis</li> <li>N. cutaneus antebrachii medialis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>N. radialis</li> <li>N. axillaris</li> <li>N. subscapularis</li> <li>N. thoracodorsali</li> </ul>

Tabelle 1 Fasciculi und die dazugehörigen Nerven der oberen Extremität aus <sup>87</sup>

### **1.2.2 Mikroskopische Anatomie des peripheren Nervensystems**

Die kleinste funktionelle Einheit des Nervensystems bildet das Neuron. Dieses besteht aus einem Zellkörper mit Zellkern (dem sog. Perikaryon), mehreren Dendriten und einem Zellfortsatz, dem sog. Axon<sup>80</sup>. Bei den Axonen wird zwischen myelinisierten und nicht myelinisierten Nervenfasern unterschieden. Myelinisierte Nervenfasern sind von Ausläufern der Schwann-Zellen (Myelinscheide) umhüllt. Die Myelinscheiden isolieren den Nerv und erhöhen somit dessen Leitungsgeschwindigkeit im Inneren. Um ein Axon seiner Länge nach komplett isolieren zu können, werden mehrere Schwann-Zellen benötigt, da eine Schwann-Zelle nur eine begrenzte Strecke (0,2–1,0 mm) des Axons isolieren kann<sup>34 80</sup>. Danach folgt eine neue Schwann-Zelle, die das nächste Teilstück des Axons isoliert. An der Stelle, an der die Myelinisierung von zwei Schwann-Zellen ineinander übergeht, entsteht physiologischerweise eine Unterbrechung der Isolierung. Diese Unterbrechung wird als Ranvier-Schnürring bezeichnet. Die Zellmembran besitzt in diesem Abschnitt zahlreiche spannungsabhängige Na<sup>+</sup>-Kanäle. Hier findet die erneute Ausbildung eines Aktionspotentials statt. Der myelinisierte Abschnitt eines Axons, der zwischen zwei Ranvier-Schnürringen liegt, wird Internodium genannt. An diesen Teilstücken findet keine Ausbildung eines Aktionspotentials statt. Diese Form der Erregungsausbreitung nennt sich saltatorisch und bedingt die hohe Leitungsgeschwindigkeit von myelinisierten Axonen<sup>80</sup>. Bei nicht myelinisierten Nervenfasern umhüllt eine Schwann-Zelle mehrere Nervenfasern. Hierdurch entsteht keine ausreichende Isolierung hin zum Extrazellulärraum, wodurch die Erregungsausbreitung hier kontinuierlich und langsamer erfolgt<sup>80</sup>. Entsprechend der Myelinisierung und der Dicke der Nervenfasern lassen sich diese in folgende Gruppen nach Erlanger und Gasser (A–C)<sup>22</sup> bzw. Lloyd und Hunt einteilen (I–IV)<sup>39 7</sup>:

Gruppe	Myelinscheide	Durchmesser (µm)	Leitungsgeschwindigkeit (m/s)	Funktion
Aα (I)	+++++	15–20	120	Motorik, Propriozeption
Aβ (II)	++++	8–12	50	Druck, Berührung
Aγ	+++	5–8	25	Muskeltonus
Aδ (III)	++	2–5	10	Schmerz, Temperatur
B	+	1–3	7	präganglionär sympathisch
C (IV)	–	0,5–1,5	2	Schmerz, Temperatur

Tabelle 2 Einteilung der Nervenfasern nach Erlanger/Gasser und Loyd/Hunt, modifiziert nach <sup>7</sup>

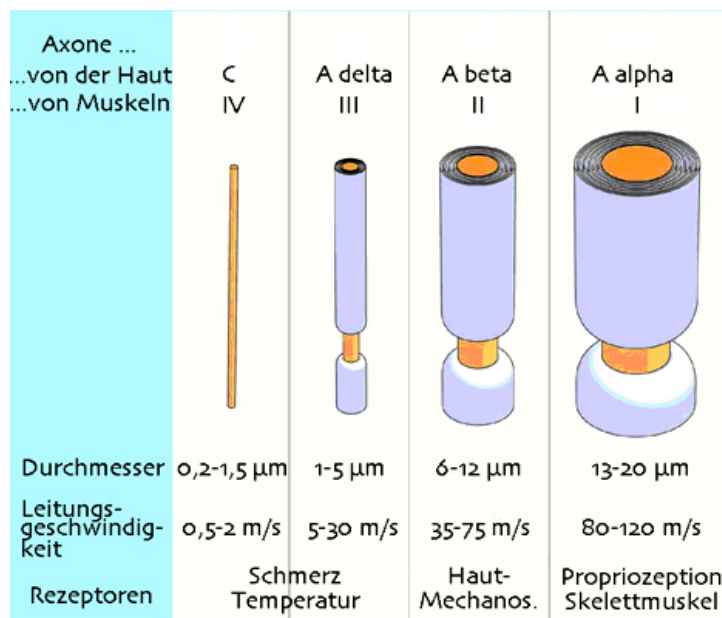


Abbildung 2 Einteilung der Nervenfasern nach Erlanger/Gasser bzw. Loyd/Hunt aus <sup>7</sup>

Ein peripherer Nerv enthält Nervenfasern verschiedener Qualitäten wie z. B. Axone von somatischen, sensiblen und vegetativen Nerven. Die Zellkörper der jeweiligen Nervenfasern liegen entweder im Vorderhorn (somatische Nerven) bzw. Seitenhorn des Rückenmarkes (vegetative Nerven) oder in den Spinalganglien (sensible Nerven)<sup>34</sup>. Diese Fasern werden neben den Schwann-Zellen zusätzlich noch hierarchisch von verschiedenen bindegewebigen Schichten umhüllt. Das Epineurium ist die äußerste Schicht des Nervs und wird als Fortsetzung der Dura mater gesehen. Es fasst einzelne durch das Perineurium begrenzte Faszikel zum makroskopisch sichtbaren Nerv zusammen. Es besteht v. a. aus kollagenem Bindegewebe, elastischen Fasern, ist somit dehnbar, sowie Fettzellen und dient dem mechanischen Schutz des Nervs, als auch der Verschiebbarkeit der einzelnen Faszikel gegeneinander. Weiterhin enthält es die Blutgefäße zur nutritiven Versorgung des Nervs<sup>34</sup>. Das Perineurium fasst mehrere Nervenfasern samt Endoneurium zu Faszikeln zusammen. Es ist ein zähes, nicht dehnbares und widerstandsfähiges Gewebe. Es besteht aus zwei Teilen: der äußeren Pars fibrosa, die dem mechanischen Schutz dient und der inneren Pars epitheloidea, die die Fortsetzung der weichen Hirnhäute darstellt<sup>34</sup>. Die Pars epitheloidea enthält u. a. Perineuralzellen, die durch ihre stabilen Tight Junctions eine Diffusionsbarriere zwischen Endoneurium und epineuralem Gewebe bilden. Die Kollagenfasern verlaufen hier leicht gewellt, um eine Verlängerung bei Bedarf gewährleisten zu können<sup>80</sup>. Das Endoneurium ist ein retikuläres Bindegewebe, das den Nerv samt seiner evtl. vorhandenen Myelinisierung direkt umgibt. Es enthält u. a. Fibroblasten, Makrophagen, Mastzellen und Kapillaren vom geschlossenen Typ zur direkten nutritiven Versorgung der neuronalen Strukturen<sup>80</sup>.

Die mikroskopische Anatomie eines peripheren Nervens ist nicht nur von theoretischer Bedeutung sondern besitzt auch klinisch praktische Relevanz.

Zwar lassen sich die verschiedenen hierarchischen Nervenstrukturen im klinischen Alltag selbst mit hochauflösenden Ultraschallgeräten visuell nicht darstellen, dennoch ist ihre Unterscheidung wichtig um verschiedene Schweregrade histologischer Nervenschädigungen und neurologischer Dysfunktionen verstehen zu können.

Ziel bei regionalanästhesiologischen Verfahren ist es das Lokalanästhetikum mit Hilfe von Sonografie und Nervenstimulation möglichst nahe perineural am gewünschten Nerven zu platzieren<sup>65</sup>. Das Epineurium gilt in der klinischen Praxis als letzte Barriere und soll im Idealfall unversehrt bleiben, um neurologische Defizite und histologische Nervenschäden zu vermeiden<sup>84, 96</sup>. Jedoch kommt es auch bei intraneuraler Applikation des Lokalanästhetikums und intaktem Perineurium (sog. intraneurale, extrafaszikuläre Nadelposition) nicht zwingend zu neurologischen Komplikationen<sup>8, 75</sup>. Müssen jedoch bei intraneuraler Lage hohe Injektionsdrücke aufgebracht werden, ist davon auszugehen, dass auch das Perineurium perforiert wurde (sog. intraneurale, intrafaszikuläre Nadelposition) und das Lokalanästhetikum direkt ins Endoneurium appliziert wird, was zu stärkeren histologischen Nervenschäden und häufigeren neurologischen Dysfunktionen führen kann<sup>35 44</sup>. Pathophysiologisch lässt sich dies u.a. dadurch erklären, dass das zähe, nicht dehnungsfähige Perineurium dem erhöhten Druck bei endoneuraler Applikation nicht nachgeben kann und die Nervenfasern dadurch stärker durch den entstehenden Druck geschädigt werden.

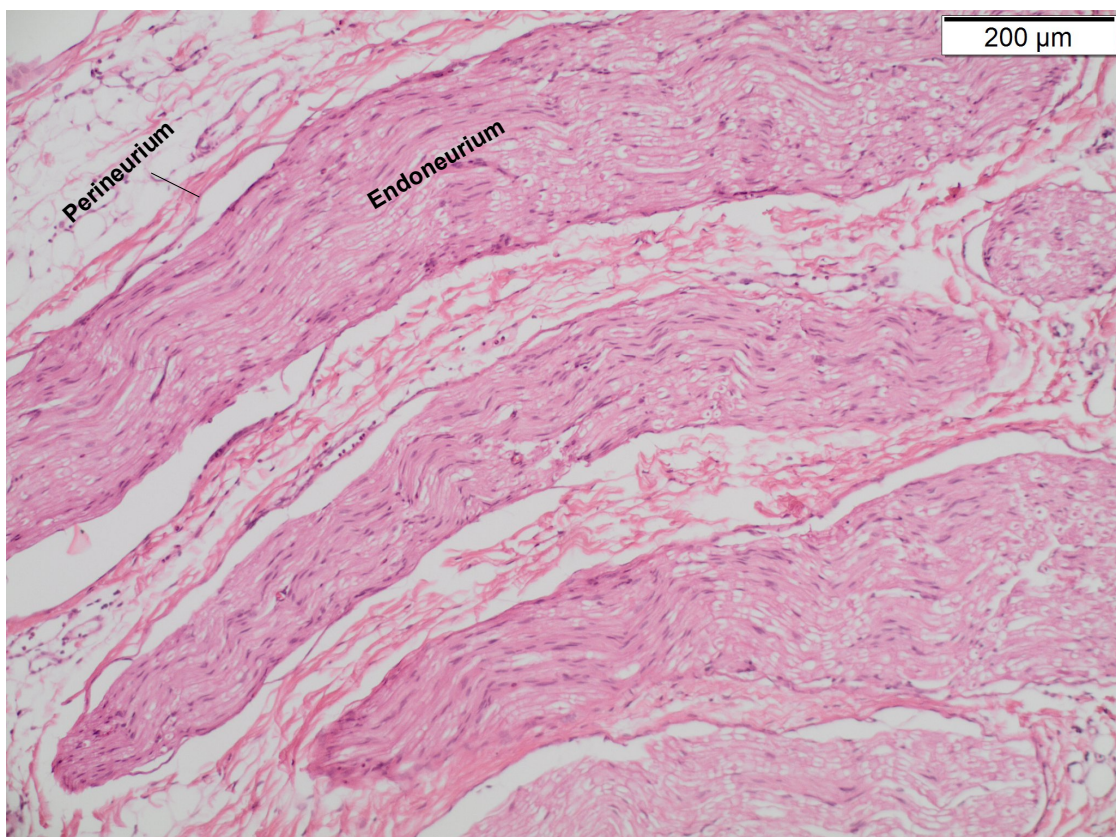


Abbildung 3 Aufbau eines peripheren Nervens, HE-Färbung, 100-fache Vergrößerung

### **1.2.3 Physiologie des peripheren Nervensystems**

Die Reizweiterleitung erfolgt durch Ausbildung eines Aktionspotentials. Das Ruhemembranpotential einer Nervenzelle liegt durch eine  $\text{Na}^+$ - und  $\text{K}^+$ -Umverteilung bei  $-70$  mV. Dadurch besteht ein elektrochemischer Gradient für  $\text{Na}^+$  in die Zelle und für  $\text{K}^+$  aus der Zelle<sup>36</sup>. Durch einen Reiz wird die Membran lokal depolarisiert und es öffnen sich ab einem Wert von  $-50$  mV spannungsabhängige Natriumkanäle. Dadurch kommt es zu einem schnellen  $\text{Na}^+$ -Einstrom in die Zelle. Die Zellmembran depolarisiert lokal und die spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle werden durch die positive Membranspannung anschließend inaktiviert. Die inaktivierten  $\text{Na}^+$ -Kanäle befinden sich in einem sog. temporären Refraktärzustand<sup>36</sup> und können für kurze Zeit selbst durch starke Reize nicht mehr aktiviert werden. Durch die Refraktärzeit wird sichergestellt, dass sich Erregungen nur in eine Richtung fortpflanzen. Durch die positive Ladungsumkehr öffnen sich spannungsabhängige  $\text{K}^+$ -Kanäle. Es kommt zum  $\text{K}^+$ -Ausstrom, die Zellmembran wird wieder auf das Ausgangsniveau von  $-70$  mV repolarisiert und die spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle sind wieder aktivierbar. Myelinisierte Nervenfasern leiten Erregungen schneller als nicht myelinisierte Nervenfasern. Der Grund ist die bereits erwähnte sog. saltatorische Erregungsleitung. Bei myelinisierten Axonen werden nur im Bereich der Ranvier-Schnürringe Aktionspotentiale ausgebildet. Die lokale Depolarisation breitet sich bis zum nächsten Schnürring aus und aktiviert erst dort erneut spannungsabhängige  $\text{Na}^+$ -Kanäle zur Ausbildung eines neuen Aktionspotentials. Dadurch können Geschwindigkeiten von bis zu  $120$  m/s erreicht werden<sup>36</sup>.

### **1.2.4 Anatomische und physiologische Aspekte zum Schwein als Versuchstier**

Grundsätzlich sind Anatomie und Physiologie des Nervensystems eines Schweins denen des Menschen auffallend ähnlich<sup>92</sup>. Die Bildung der Nerven des Plexus brachialis über Trunci und Fasciculi erfolgt beim Schwein auf vergleichbare Art und Weise, jedoch über eine kürzere Distanz<sup>66</sup>. Im Gegensatz zum Menschen besitzt das Schwein keine Clavicula<sup>66, 74</sup>. Bei den entstehenden peripheren Nerven stammen die Fasern beim Schwein im Vergleich zum Menschen zum Teil aus unterschiedlichen

Rückenmarkssegmenten<sup>66</sup>. Diese Unterschiede sind für die vorliegende Arbeit allerdings vernachlässigbar, da sowohl beim Schwein als auch beim Menschen die gleichen Muskeln durch die gleichen Nerven innerviert werden<sup>66</sup> und in dieser Arbeit nicht zwischen einzelnen Nerven unterschieden wird bzw. die jeweiligen Innervation irrelevant ist. Die Durchmesser der Schweinennerven sind mit denen der Menschen vergleichbar, was eine bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse im Hinblick auf Kanülentrauma, die Relation von injiziertem Volumen zu Nervengröße und das Ausmaß der daraus resultierenden Schädigung auf den Menschen möglich macht<sup>88</sup>.

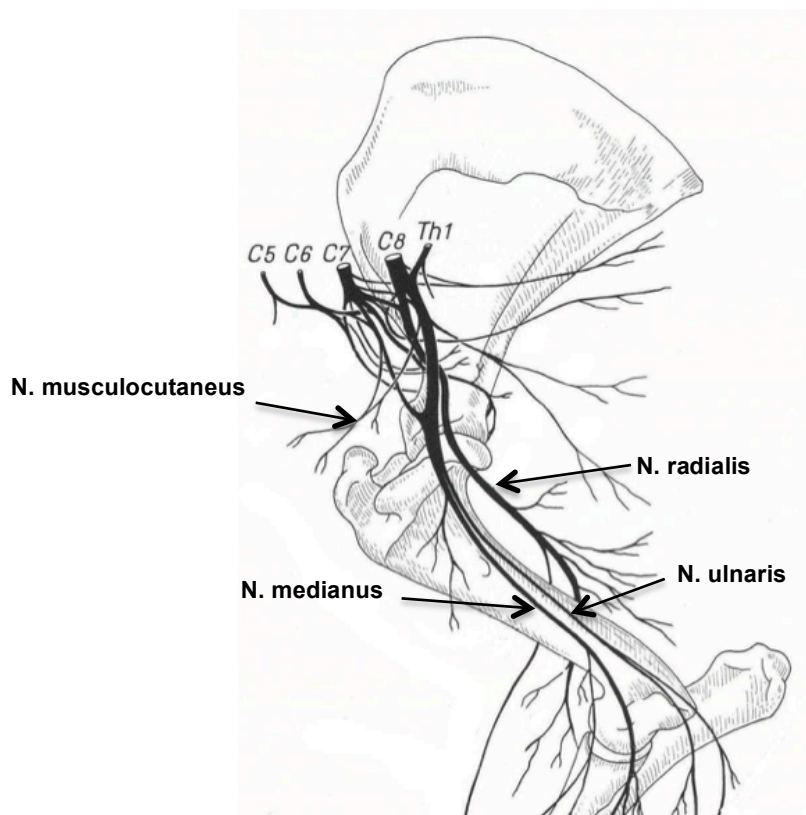


Abbildung 4 Plexus brachialis eines Hausschweines modifiziert nach<sup>66</sup>

## 1.3 Regionalanästhesie

### 1.3.1 Überblick

Das Ziel der Regionalanästhesie ist es, durch Applikation von Lokalanästhetika bestimmte Körpergebiete reversibel zu betäuben, ohne dabei das Bewusstsein zu beeinträchtigen. Es wird zwischen peripheren und zentralen, rückenmarksnahen Verfahren unterschieden. Die Verfahren können als singuläre, einzeitige oder als kontinuierliche Katheterverfahren durchgeführt werden, eine Allgemeinanästhesie komplett ersetzen oder mit ihr kombiniert werden<sup>34</sup>. Die Einteilung der einzelnen Nerven nach Erlanger/Gasser<sup>22</sup> bzw. Loyd/Hunt<sup>39</sup> (vgl. Kapitel 1.2.2) bestimmt auch deren Empfindlichkeit auf Lokalanästhetika:

Gruppe	Myelinscheide	Durchmesser (µm)	Empfindlichkeit auf LA
Aα	+++++	15	+
Aβ	++++	8	++
Aγ	+++	5	+++
Aδ	++	4	++++
B	+	3	+++++
C	0	1	++++++

Tabelle 3 Einteilung der Nerven nach Erlanger/Gasser und deren Empfindlichkeit gegenüber Lokalanästhetika (LA), modifiziert nach<sup>7 34 45</sup>

Der Grad der Myelinisierung ist verantwortlich für die Empfindlichkeit der einzelnen Nervenfasern gegenüber Lokalanästhetika. Die Nerven werden in Abhängigkeit ihres Myelinisierungsgrades umgekehrt proportional schnell und lange blockiert. Dadurch erklärt sich der Ablauf der Symptome bei Wirkeintritt einer Regionalanästhesie. Zuerst werden postganglionäre Schmerz- und Temperaturfasern (geringster Myelinisierungsgrad) ausgeschaltet.



Als letztes kommt die motorische Funktion (Nervenfasern mit höchstem Myelinisierungsgrad) zum Erliegen<sup>1</sup>. Bei richtig dosierter Lokalanästhetikagabe tritt idealerweise der sog. Differentialblock mit analgetischer Wirkung bei gleichzeitigem Erhalt der Berührungsempfindung und motorischen Funktion auf<sup>34</sup>.

### 1.3.2 Pharmakologie der Lokalanästhetika

Lokalanästhetika sind chemisch gesehen amphiphile aromatische Amine. Die Grundstruktur besteht aus einer aromatischen Ringstruktur (lipophil), einem aliphatischen Verbindungsstück und einer Aminogruppe (hydrophil).

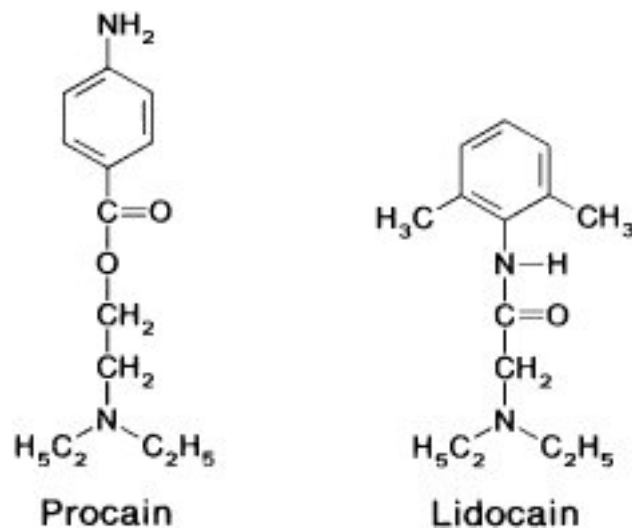


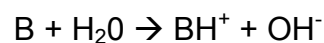
Abbildung 5 Hauptgruppen der Lokalanästhetika aus<sup>45</sup>

Anhand der chemischen Struktur des aliphatischen Zwischenstückes wird zwischen Lokalanästhetika vom ‚Ester-‘ und vom ‚Amid-Typ‘ unterschieden<sup>45</sup>. Heutzutage werden in der klinischen Anästhesie weit überwiegend nur noch Lokalanästhetika vom Amid-Typ angewandt<sup>34</sup>.

Ester-Typ	Amid-Typ
<ul style="list-style-type: none"> <li>– Procain</li> <li>– Tetracain</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>– Lidocain</li> <li>– Prilocain</li> <li>– Mepivacain</li> <li>– Bupivacain</li> <li>– Ropivacain</li> </ul>

Tabelle 4 Hauptgruppen der Lokalanästhetika und deren Vertreter, modifiziert nach <sup>34</sup>

Lokalanästhetika sind chemisch schwache Basen mit einem pKs zwischen 7,8 und 9. In wässriger Lösung liegen sie abhängig vom pH-Wert der umgebenden Lösung als deprotonierte lipophile Base (B) oder als protonierte hydrophile Säure (BH<sup>+</sup>) vor. Lokalanästhetika sind in der protonierten (hydrophilen) Form pharmakodynamisch aktiv, können allerdings nur in der deprotonierten (lipophilen) Form zu ihrem Wirkort an der Innenseite der Zellmembran der Axone gelangen.



Bei physiologischem pH-Wert (7,4) liegen je nach pKs-Wert des Lokalanästhetikums zwischen 3 % und 20 % der Moleküle in deprotonierter Form vor<sup>45</sup>. Je niedriger der pKs des Lokalanästhetikums ist, desto mehr deprotonierte Form des Lokalanästhetikums liegt vor und desto schneller ist die Anschlagzeit eines Lokalanästhetikums<sup>34</sup>. In sauren Geweben (pH<6; wie z. B. in entzündetem Gewebe) liegen die Lokalanästhetika fast nur protoniert vor und verlieren dadurch ihre Wirkung<sup>34</sup>.

Die Metabolisierung der Lokalanästhetika ist abhängig von ihrer chemischen Gruppenzugehörigkeit. Lokalanästhetika vom Ester-Typ (z. B. Procain) werden schnell und organunabhängig durch Plasmacholinesterasen inaktiviert. Bei Patienten mit Cholinesterasemangel kann die Halbwertszeit verlängert sein. Die bei Hydrolyse entstehenden Aminoalkohole und Carbonsäuren werden anschließend renal eliminiert.

Lokalanästhetika vom Amid-Typ (z. B. Bupivacain) werden in der Leber über Biotransformation abgebaut und anschließend renal eliminiert. Die

Halbwertszeit der Lokalanästhetika vom Amid-Typ ist abhängig von der Leberfunktion deutlich länger als die der Lokalanästhetika vom Ester-Typ<sup>45</sup>.

Lokalanästhetika blockieren reversibel und unselektiv die  $\alpha$ -Untereinheiten der spannungsabhängigen  $\text{Na}^+$ -Kanäle<sup>34</sup> an der Innenseite der Nervenfasern und unterbrechen somit die Erregungsfortleitung bzw. die Bildung von Aktionspotentialen. In deprotonierter, ungeladener Form passiert das Lokalanästhetikum die Zellmembran. Im Inneren der Zelle wird das Lokalanästhetikum in seine pharmakodynamisch aktive, protonierte Form umgewandelt. In protonierter Form treten Lokalanästhetika mit bestimmten Aminosäureresten (Phe und Tyr) der  $\alpha$ -Untereinheit des  $\text{Na}^+$ -Kanals in Kontakt (5. und 6. Segment der 1., 3. und 4. Domäne)<sup>45</sup> und blockieren den Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen und somit die Erzeugung von Aktionspotentialen.

Das Spektrum der Nebenwirkungen umfasst v. a. systemisch toxische Reaktionen – sowohl am Nervensystem als auch am kardiovaskulären System – allergische Reaktionen und direkte neurotoxische Effekte am Nerv. Die Schwere der toxischen Reaktion hängt von der verwendeten Gesamtdosis und der Schnelle des Konzentrationsanstieges (v. a. bei versehentlichen intravasalen Injektionen) ab. Toxische Reaktionen treten bei Überschreiten einer für das Lokalanästhetikum bestimmten Schwellenkonzentration auf. Im Vordergrund stehen dabei die Auswirkungen auf Gewebe, die ebenfalls neurophysiologisch erregbare Zellen enthalten. Dabei kann es v. a. zu folgenden Komplikationen kommen:

- Zentralnervöse Reaktionen: Schwindel, Nausea, Taubheitsgefühl der Zunge, metallischer Geschmack, Muskelzittern bis hin zu Krampfanfällen (durch Dämpfung der kortikalen inhibitorischen Neurone) und Koma<sup>45</sup>
- Kardiovaskuläre Reaktionen: treten erst bei ca. fünfmal höheren Plasmakonzentrationen auf als neurologische Reaktionen, da die Schwelle für neurologische Komplikationen geringer ist als für kardiale. Sie äußern sich als Hypotonien durch verminderte Inotropie und Arrhythmien. Die höchste Kardiotoxizität aller Lokalanästhetika besitzt Bupivacain gefolgt von Ropivacain<sup>98</sup>.

Allergische Reaktionen treten im Allgemeinen selten auf, am häufigsten jedoch bei der Verwendung von Lokalanästhetika des Ester-Typs, getriggert durch die beim Abbau entstehende Paraaminobenzoesäure. Die Symptome reichen von Hauterscheinungen bis hin zum anaphylaktischen Schock. Bei Lokalanästhetika vom Amid-Typ können v. a. zugesetzte Konservierungsstoffe (z. B. Methylparaben) allergische Reaktionen hervorrufen<sup>45</sup>.

In mehreren experimentellen Studien konnte sowohl an tierischen als auch an menschlichen Nervengeweben eine direkte Neurotoxizität der Lokalanästhetika nachgewiesen werden<sup>42 43 64 83 70, 94 100</sup>. Die angesprochene Neurotoxizität war sowohl zeit- als auch dosisabhängig, jedoch unabhängig von der chemischen Struktur des jeweiligen Lokalanästhetikums (Amide/Ester)<sup>94</sup>. Je lipophiler, je höher die analgetische Potenz und je länger die Wirkdauer eines Lokalanästhetikums ist, desto höher ist auch seine Toxizität. Perez-Castro et al. stellten demnach eine steigende Zytotoxizität der Lokalanästhetika auf menschliche neuronale Zellen auf (Mepivacain < Lidocain < Ropivacain < Bupivacain). Für Bupivacain ließ sich am In-vitro-Modell einheitlich die höchste Toxizität<sup>70 94</sup> sowohl auf Neurone als auch auf Gliazellen<sup>100</sup>, nachweisen. Diese klaren Befunde aus Zellkulturuntersuchungen decken sich allerdings nur geringfügig mit klinischen Erfahrungen. Hier zeigt die Verwendung von Lidocain zur Spinalanästhesie die höchste Inzidenz für postinterventionelle transiente neurologische Symptome (TNS)<sup>71, 101</sup>. Eine mögliche Erklärung hierzu ist, dass Lidocain in der klinischen Praxis höher konzentriert bzw. dosiert eingesetzt wird als Bupivacain. Untersuchungen zur Toxizität bei peripherer Regionalanästhesie liegen nicht vor.

Molekulare Mechanismen, die die Neurotoxizität der Lokalanästhetika erklären können, sind z. B. ein erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration, mitochondriale Dysfunktionen und die intrazelluläre Produktion von Sauerstoffradikalen<sup>98</sup>. Zudem reduzieren alle Lokalanästhetika konzentrationsabhängig den Blutfluss innerhalb eines Nervs, was mit erhöhtem metabolischen Stress durch eine Gewebeischämie und einer möglicherweise konsekutiv erhöhten Rate an Nervenschäden einhergeht<sup>11</sup>.

In aller Regel werden jedoch in der Klinik korrekt angewandte Formen der Regionalanästhesie gut vertragen und Nervenschäden, die direkt auf das Lokalanästhetikum zurückzuführen sind, sind extrem selten<sup>43</sup>. Außerdem ist

die Inzidenz neurologischer Komplikationen nach Regionalanästhesie verglichen mit Komplikationen nach Allgemeinanästhesie geringer<sup>3 10</sup>. Dennoch entstehen durch perineurale und akzidentielle intraneurale Injektionen aseptische Inflammationen und letztendlich auch Nervenschäden die u.a. auf das Lokalanästhetikum zurückgeführt werden können<sup>11, 98</sup>.

### 1.3.3 Pharmakologie von Clonidin

Clonidin ist chemisch gesehen ein Imidazolderivat und pharmakologisch der klassische Vertreter eines zentral und auch peripher wirksamen  $\alpha_2$ -Agonisten. Neben dem  $\alpha_2$ -Agonismus ist zusätzlich noch eine Wirkung an Imidazolrezeptoren beschrieben, wodurch v. a. der blutdrucksenkende Effekt zustande kommt<sup>45</sup>. Zudem ist auch eine im Vergleich zum  $\alpha_2$ -Rezeptor 200-fach geringere Affinität zum  $\alpha_1$ -Rezeptor beschrieben, durch die bestimmte Wirkungen wie z. B. eine initiale, nach zu schneller Injektion kurzanhaltende Tachykardie und Hypertonie erklärt werden können<sup>45</sup>.  $\alpha_2$ -Rezeptoren sind prä- und postsynaptisch lokalisierte molekularbiologisch unterschiedliche G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, die supraspinal (hier v. a. Ncl. tractus solitarii und Locus coeruleus), spinal und peripher zu finden sind. Clonidin übt über den präsynaptischen  $\alpha_2$ -Rezeptor einen hemmenden Einfluss auf sympathische Nervenfasern – im Sinne einer negativen Rückkopplung – aus, indem es durch Bindung des Rezeptors die Ausschüttung von Noradrenalin hemmt. Hierdurch lassen sich insbesondere die sedative und antihypertensive Wirkung erklären<sup>45</sup>. Auch bindet Clonidin an postsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren, bewirkt jedoch dort eine Aktivierung. Postsynaptische  $\alpha_2$ -Rezeptoren sind v. a. im Locus coeruleus lokalisiert von wo aus absteigende hemmende, adrenerge Bahnen die Schmerzweiterleitung im Hinterhorn des Rückenmarks reduzieren. Das dadurch aktivierte zentrale adrenerge System scheint eine entscheidende Rolle bei der endogenen supraspinalen und spinalen Analgesie zu spielen. Durch die Aktivierung der postsynaptischen  $\alpha_2$ -Rezeptoren wird zwar der Sympathikus aktiviert, aber auch zugleich die zentrale Schmerzverarbeitung unterdrückt<sup>17 18 29 73 76</sup>. Anwendungen findet Clonidin in der Prämedikation, der Narkoseführung von Alkoholikern im Sinne einer Delirprophylaxe, als Begleitmaßnahme von Alkohol-, Benzodiazepin- und Opiatentzug, der Therapie des postoperativen Shivering, als Reservemedikament für schwer

einstellbare Hypertoniker, sowie als Koanalgetikum bei bestimmten Schmerzsyndromen<sup>45</sup>.

### **1.3.4 Clonidin als Adjuvanz in der Regionalanästhesie**

Das Ziel der Adjuvanzen ist es, die Anschlagzeit der Lokalanästhetika zu verkürzen, ihren analgetischen Effekt zu verlängern und gleichzeitig ihre notwendige Dosis zu reduzieren<sup>50</sup>, ohne dabei systemische Nebenwirkungen oder eine verlängerte motorische Blockade auszulösen bzw. zu verstärken. Häufig verwendete Adjuvanzen sind z. B. Opioide (wie z. B. Morphin, Buprenorphin, Sufentanil), Adrenalin, Clonidin, Dexmedetomidin, Dexamethason und Midazolam<sup>34 50</sup>. Clonidin als Adjuvanz zeigt bei zentralen<sup>18 19 49 63 93</sup> und peripheren regionalanästhesiologischen Verfahren<sup>5, 48, 72 85</sup> eine dosisabhängige Verlängerung der Analgesiezeit. Der genaue Wirkmechanismus von Clonidin am Nerv, der die verlängerte Analgesiezeit erklären könnte, ist unklar und 3aktuell Gegenstand experimenteller Forschung. In verschiedenen Studien konnte eine direkte Beeinflussung der Nervenphysiologie durch Clonidin nachgewiesen werden. Clonidin war in der Lage, speziell an C- und A $\delta$ -Fasern die K<sup>+</sup>-Leitfähigkeit zu erhöhen und somit das Ruhemembranpotential zu stabilisieren<sup>23</sup>. Dadurch wurde die Bildung und Weiterleitung von Aktionspotentialen an isolierten Nervenzellen In-vitro erschwert bzw. unterdrückt, allerdings in sehr viel höheren als klinisch relevanten Konzentrationen<sup>15 27 28 52 76</sup>. Zudem postulierten Brummett et al.<sup>14</sup> einen lokalen vasokonstriktiven Effekt von Clonidin über den  $\alpha_2b$ -Rezeptor. Durch die lokale Vasokonstriktion wird analog zum Adrenalin der Abtransport des Lokalanästhetikums vom Wirkort verhindert. Dieser Effekt scheint jedoch nicht so stark ausgeprägt zu sein wie beim Adrenalin<sup>29</sup>. Nishikawa et al.<sup>67</sup> konnten beim Vergleich zwischen Adrenalin und Clonidin als Adjuvanz zu Lidocain keinen verzögerten Anstieg der Plasmakonzentration von Lidocain in der Clonidiningruppe, wohl aber einen verzögerten Anstieg und sogar eine geringere Plasmakonzentration von Lidocain bei simultaner Injektion von Adrenalin nachweisen.

Nachteile, die v. a. auftreten, wenn Clonidin als Adjuvanz in höheren Konzentrationen (> 5 $\mu$ g/kgKG oder > 300 $\mu$ g Gesamtdosis) injiziert wird und die wahrscheinlich auf eine systemische Reabsorption zurückzuführen sind, sind

eine erhöhte Rate an Hypotonien, Bradykardien, Sedierung, Schwindel, Synkopen und zum Teil auch Entsättigungen  $<90\%$ <sup>57 72</sup>. Zudem wurde in manchen Studien<sup>2, 16 40</sup> keine signifikante Verlängerung der Analgesiezeit nachgewiesen, wenn Clonidin als Adjuvanz zur Regionalanästhesie verwendet wurde. Kam es zu verlängerten Analgesiezeiten, schwankten diese jedoch stark interindividuell von Patient zu Patient, waren daher nur schwer antizipierbar und gingen ebenfalls mit verlängerten motorischen Blockaden einher<sup>16 40 57 72</sup>.

### **1.3.5 Komplikationen der Regionalanästhesien**

Die periphere Regionalanästhesie gilt im Allgemeinen als sicheres Narkoseverfahren mit geringer Komplikationsrate<sup>3 4 10 13</sup>. Die Komplikationen lassen sich in neurologische oder systemische unterteilen. Die meisten Komplikationen beruhen auf akzidentieller Verletzung von Nerven (neurologische Komplikationen) oder angrenzender Strukturen wie Gefäße (systemische Komplikationen bei intravasaler Injektion von Lokalanästhetika). Die peripheren Verfahren sind im Vergleich zu zentralen Regionalanästhesien mit einer höheren Inzidenz an systemischen und einer geringeren Inzidenz an neurologischen Komplikationen assoziiert<sup>24</sup>. Bei akzidentieller Gefäßpunktion und konsekutiver intravasaler Injektion von Lokalanästhetika kann es zu systemischen Komplikationen wie Krampfanfällen (0,08 %), Herzstillstand sowie Herzrhythmusstörungen ( $<0,001\%$ ) und letztendlich in Extremfällen sogar zum Tode ( $<0,0001\%$ ) kommen<sup>3 4</sup>.

Postoperative neurologische Dysfunktionen sind multifaktoriell bedingt und können sich sehr unterschiedlich äußern, z. B. als Parästhesien, Taubheitsgefühlen oder Muskelschwäche. In den bisherigen Studien zur Inzidenz<sup>3 10 13</sup> variieren die Angaben, auch weil neurologische Symptome bzw. Dysfunktionen und damit die Ein- und Ausschlusskriterien in den jeweiligen Studien nicht einheitlich definiert worden sind. Bei den resultierenden sensiblen, motorischen oder kombinierten neurologischen Komplikationen wird zwischen reversiblen (0,4-3,0%)<sup>3 13</sup> und selteneren, länger anhaltenden irreversiblen Schäden (0,04-0,001%) unterschieden<sup>13 65</sup>. Patienten mit vorbestehenden Nervenerkrankungen (z.B. Multipler Sklerose, diabetische Neuropathie) sind dabei vermutlich anfälliger gegenüber Nerventraumata und neigen daher vermehrt zu Komplikationen nach einer Operation in

Regionalanästhesie<sup>41</sup>. Ursachen intraoperativ erworbener neurologischer Dysfunktionen sind vielfältig und eine genaue retrospektive Zuordnung fällt schwer. Generell kann zwischen anästhesieunabhängigen (chirurgisches Trauma, Tourniquet, Fehllagerung, perioperative Inflammation, präexistente Neuropathien) und anästhesieabhängigen Ursachen unterschieden werden. Anästhesieabhängige Ursachen für postoperative Neuropathien können folgende sein<sup>10, 38, 88</sup>:

- **Mechanische Trauma durch direkten Nadel-Nerv-Kontakt mit oder ohne Perforation des Nerven**<sup>90 96</sup>
- **mechanische Kompression des Nerven von außen:** Unbemerkte Verletzung perineuraler kleiner Gefäße kann zur Hämatombildung mit anschließender Kompression des Nerven führen<sup>38 65</sup>.
- **Neurotoxizität der Lokalanästhetika** in Abhängigkeit ihrer Einwirkzeit, Menge und Konzentration<sup>70, 94 100</sup>
- **intraneurale Punktion in Kombination mit hohen Injektionsdrücken (>15psi)**<sup>35, 44</sup>

### 1.3.6 Pathophysiologie und Immunologie des peripheren Nerventraumas

Nach Seddon lassen sich pathophysiologisch drei verschiedene Typen von Schädigungen unterschiedlicher Schweregrade am peripheren Nerven unterscheiden<sup>10 88</sup>:

- **Neurapraxie:** leichte Schädigung. Funktionsausfall ohne strukturellen Schaden am Nerv. Äußert sich als verminderte Nervenleitgeschwindigkeit. Meist innerhalb von einer Woche reversibel.
- **Axonotmesis:** mittelgradige Schädigung. Isolierte reversible Axonschädigung bei erhaltener Hüllstruktur des Nervens. Regeneration beginnt nach sechs Wochen.
- **Neurotmesis:** schwere Schädigung. Komplette irreversible Durchtrennung von Axon und umgebender Hüllstruktur. Bedarf einer mikrochirurgischen Therapie.



Durch Nervenschädigung verschiedener Ursachen (Kompression von außen, Nadel-Nerv-Kontakt, intraneurale Injektion oder chemisch-toxisch durch Lokalanästhetika) kommt es obligatorisch zu einer sog. aseptischen Entzündungsreaktion innerhalb von 48 Stunden nach erfolgtem Trauma kommen<sup>61 62</sup>. Getriggert wird diese Entzündungsreaktion v. a. durch entstandene Zelltrümmer<sup>21</sup>.

Zunächst werden ortsständige Makrophagen und Mastzellen zum Ort des Geschehens rekrutiert und aktiviert. Makrophagen stellen ungefähr 2–6 % der Zellen des peripheren Nervensystems<sup>68</sup>. Die aktivierten Makrophagen und Mastzellen schütten Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, verschiedene Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF und TNF- $\alpha$ ), Histamin und Heparin aus<sup>26 60</sup>. Durch den entstandenen Zelldetritus werden parallel auch die umliegenden Schwann-Zellen aktiviert. Diese erkennen Zelldebris über TLR-2-Rezeptoren und bilden daraufhin ebenfalls chemotaktisch wirksame Zytokine (IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ )<sup>55</sup>. Durch die sezernierten Entzündungsmediatoren wird die Inflammationsreaktion unterhalten und verstärkt. Immunzellen wie T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten und Monozyten werden aus dem Blut rekrutiert. Diese Immunzellen, v. a. die Granulozyten, verstärken ihrerseits den Inflammationsprozess durch Sekretion weiterer Entzündungsmediatoren<sup>25</sup>. Die Entzündungsmediatoren sensibilisieren auch Nozizeptoren, wodurch der durch den Entzündungsprozess hervorgerufene Schmerz entsteht<sup>51</sup> (vgl. Kapitel 1.3.7). Avitales Gewebe wird insbesondere von aus dem Blut eingewanderten Phagozyten (Makrophagen und neutrophile Granulozyten) phagozytiert. Makrophagen können bestimmte Strukturen der phagozytierten Zelltrümmer über ihren MHC-II-Rezeptor an CD<sub>4</sub><sup>+</sup>-T-Helferzellen präsentieren. Dadurch werden diese aktiviert und sezernieren INF- $\gamma$  sowie TNF- $\alpha$ , die dann wiederum die zelluläre Abwehrfunktion von Makrophagen aktivieren<sup>46 60</sup>.

Makrophagen unterhalten nicht nur den Entzündungsprozess, sondern sind auch im großen Maße mit regulatorischen TH<sub>2</sub>-Zellen an der Regeneration der beschädigten Nerven beteiligt. Sie stimulieren die Sekretion von ENGF (*endoneurial nerve growth factor*)<sup>46</sup> und beenden die Entzündungsreaktion durch z. B. Sekretion antiinflammatorischer Zytokine wie IL-10.

Endo- und perineurale Makrophagenakkumulation als Zeichen einer gerade ablaufenden oder stattgehabten aseptischen Inflammationsreaktion im

Nervengewebe gilt als verlässlicher Marker für ein Nervenstrauma<sup>56 61 62</sup>. Die Makrophagenakkumulation erreicht ihren Höhepunkt nach ca. drei Tagen. Dabei wird ein direkter Zusammenhang zwischen der Größe des Traumas bzw. der Makrophagenakkumulation und der Schwere der klinischen Symptome vermutet<sup>21</sup>.

### **1.3.7 Antiinflammatorische Eigenschaften von Clonidin**

Die (vgl. Kapitel 1.3.6) zu Beginn eines Nervenstraumas von ortständigen Makrophagen freigesetzten proinflammatorischen Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  sorgen neben Chemotaxis und Aufrechterhaltung der Inflammation, auch für Schmerzentstehung, Demyelinisierung und Apoptose der Axone (sog. Waller-Degeneration)<sup>76 77</sup>. Sowohl zentral (epidural und spinal) als auch perineural verabreichtes Clonidin ist in der Lage, den nach peripherer Nervenverletzung entstehenden Schmerz zu modifizieren oder gar zu vermindern<sup>54 76 77 78 79 99</sup>. Daher wird Clonidin auch bei chronischen neuropathischen Schmerzen als Koanalgetikum eingesetzt. Perineural injiziertes Clonidin vermindert nachweislich sowohl die Anzahl von Makrophagen und Lymphozyten im geschädigten Gewebe als auch deren Fähigkeit zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ )<sup>79</sup>. Zudem erhöht es in Immunzellen die Produktion von antiinflammatorischen Zytokinen wie IL-10 und TGF $\beta$ -1<sup>76 77 78</sup>. Diese Effekte induziert Clonidin über einen  $\alpha_2$ -Adrenorezeptor, den die rekrutierten Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten auf ihrer Oberfläche tragen<sup>33 53 54 78 79</sup>. Der genaue Signaltransduktionsweg ist noch unbekannt. Es wird jedoch eine Wirkung über veränderte Genexpression angenommen, da die Effekte erst mit zeitlicher Verzögerung eintreten<sup>53 54 79</sup>. Darüber hinaus wird vermutet, dass die bei peripherer Nervenverletzung entstehenden Zytokine auch nach zentral transportiert werden und dort im Hinterhorn des Rückenmarkes die Neuronenplastizität derartig verändern, dass chronischer Schmerz entstehen kann. Beispielsweise zeigt sich eine vermehrte Expression von pCREB nach peripherer Nervenschädigung in bestimmten Neuronen des Hinterhorns. pCREB ist ein Transkriptionsfaktor für mehrere Gene, die die Synchronizität und den Lerneffekt von Neuronen beeinflussen<sup>54 69</sup>. Auch soll er eine Rolle bei der Entstehung von chronischen neuropathischen Schmerzen spielen. Interessanterweise sinkt seine Expression im Rückenmark, wenn

perineural Clonidin injiziert wird. Die wahrscheinlichste Erklärung dafür scheint die durch Clonidin verminderte Produktion proinflammatorischer Zytokinen am Ort des Geschehens zu sein<sup>54 69</sup>. Eine eigene neurotoxische Wirkung von Clonidin konnte selbst bei hohen Konzentrationen weder in In-vivo noch in In-vitro Modellen nachgewiesen werden<sup>95 50</sup>.

## 1.4 Studienlage

Bereits Selander et al.<sup>84</sup> konnten 1979 nachweisen, dass eine intraneurale Injektion von Lokalanästhetika am jeweiligen Nerv histologische Veränderungen hervorruft. In den darauffolgenden Jahren wurde die durch intraneural injiziertes Lokalanästhetikum hervorgerufene Nervenschädigung durch weitere Studien genauer untersucht, beschrieben und bestätigt<sup>42 43 64 70, 94 100</sup>. Selander et al. erwähnten zudem bereits 1979, dass Adrenalin die histologischen Veränderungen am Nerven verstärkt. Clonidin als Adjuvanz zur Regionalanästhesie ist in der Lage, die Blockade- und Analgesiezeit zu verlängern<sup>5 17 21 48 49 63 72 19, 85</sup>. Neben diesem co-analgetischen besitzt Clonidin auch einen antiinflammatorischen Effekt<sup>54 76 77 78 79 99</sup> (vgl. Kapitel 1.3.7). Die Auswirkungen der antiinflammatorischen Eigenschaften von  $\alpha_2$ -Agonisten wie z.B. Clonidin auf Nervenschädigungen verschiedener Ursachen (z.B. Neurotoxizität der Lokalanästhetika) und die darauffolgende aseptische Inflammationsreaktion wurde in folgenden Studien thematisiert.

Romero-Sandoval et al.<sup>78 79</sup> untersuchten an Ratten den Effekt von Clonidin auf ein artifiziell induziertes Nerventrauma am N. ischiadicus in einem standardisierten PSNL (partial sciatic nerve ligation) Modell. Sie konnten einen antiinflammatorischen Effekt von Clonidin bei einer durch Ligatur induzierten Neuroinflammation nachweisen. Nach perineuraler Clonidin-Injektion zeigte sich im Vergleich zu perineuraler NaCl Injektion am traumatisierten Nerv histologisch und laborchemisch eine signifikant verminderte Inflammationsreaktion.

Brummet et al.<sup>14</sup> untersuchten ebenfalls an Ratten die anästhesiologischen und histologischen Veränderungen bei perineuraler Injektion von Bupivacain im Vergleich mit perineuraler Injektion von Bupivacain & Dexmedetomidin (wie Clonidin ebenfalls ein  $\alpha_2$ -Agonist). Hier zeigte sich neben einer verlängerten

motorischen und sensorischen Blockadezeit, histologisch nach 24 Stunden eine signifikant geringere Inflammation an Nerven mit perineuraler Injektion von Bupivacain & Dexmedetomidin als im Vergleich zu alleiniger Bupivacain Injektion. Als Grund für die verringerte Inflammation nannten die Autoren die antiinflammatorischen Effekte der  $\alpha_2$ -Agonisten. Nach 14 Tagen zeigte sich bezüglich der Klinik und der histopathologischen Veränderungen kein signifikanter Unterschied mehr.

Memari et al.<sup>58</sup> wiederum konnten durch ihre histologischen Untersuchungen an Ischiadicusnerven von Ratten nachweisen, dass Dexmedetomidin auch 14 Tage nach perineuraler Injektion von Bupivacain in der Lage ist dessen Neurotoxizität zu reduzieren.

Werdehausen et al.<sup>95</sup> untersuchten in einem In-vitro-Modell die Auswirkung von Regionalanästhesie-Adjuvanzien, wie z. B. Clonidin, auf die durch Lidocain induzierte Neurotoxizität an menschlichen Neuroblastomzellen und Ratten-Astrozyten. Hier konnte keine erhöhte Apoptoserate durch hochdosiert hinzugefügtes Clonidin im Vergleich mit der alleinigen Applikation von Lidocain beobachtet werden.

Williams et al.<sup>97</sup> erforschten ebenfalls in einem In-vitro-Modell die Auswirkung von Regionalanästhesie-Adjuvanzien, wie z.B. Clonidin, auf die durch Ropivacain induzierte Neurotoxizität an isolierten sensorischen Ratten-Neuronen. Auch hier zeigte sich keine signifikante Erhöhung der Apoptoserate durch hochdosierte Clonidin-Zugabe im Vergleich zur alleinigen Verwendung von Ropivacain.

Wie dieser Überblick zeigt, existieren bisher Studien, die zum einen beweisen, dass hochdosiertes Clonidin In-vitro die Neurotoxizität von Lokalanästhetika nicht verstärkt<sup>95 97</sup>. Zum anderen gibt es Studien, die vermuten lassen, dass die antiinflammatorischen Effekte von  $\alpha_2$ -Agonisten (wie z.B. Clonidin oder Dexmedetomidin) die Inflamationsreaktionen nach Nervenschäden reduzieren<sup>77 78, 79</sup> bzw. die Neurotoxizität von Lokalanästhetika abschwächen können<sup>14 58</sup>. Es fehlt jedoch bisher konkret an wissenschaftlichen Arbeiten, die den Einfluss von Clonidin auf die durch intra- oder perineurale Injektion von Bupivacain ausgelöste aseptische Inflamationsreaktion und die damit einhergehenden histologischen Nervenschäden an einem Großtiermodell untersuchen.

## 1.5 Fragestellung

Die Verwendung von Adjuvanzen (wie z.B. Clonidin) zusätzlich zum Lokalanästhetikum bei regionalanästhesiologischen Verfahren ist in der Klinik gut etabliert. Ziel der Adjuvanzen ist es die Wirkdauer der Lokalanästhetika bei gleichzeitig verringerter Gesamtdosis und damit verminderter Toxizität zu erhöhen. Neben co-analgetischen Effekten besitzt Clonidin tierexperimentell zusätzlich antiinflammatorische Eigenschaften. Ob dieses antiinflammatorische Potential von Clonidin in der Lage ist die neurotoxischen Eigenschaften der Lokalanästhetika signifikant abzuschwächen ist in der Literatur bisher nicht eingehend untersucht worden. Zudem gibt es bisher nur wenige Untersuchungen die den Effekt von Injektionen verschiedener Testlösungen in peri- und intraneurale Nervenkompartimente miteinander vergleichen (siehe hierzu auch Kap. 1.2.2)

Ziel dieser Arbeit ist es, den antiinflammatorischen Effekt von Clonidin auf die durch intra- und perineurale Injektion von Bupivacain ausgelöste Neuroinflammation anhand histologischer Nervenveränderungen im Großtiermodell darzustellen. Um eine sichere Unterscheidung zwischen intra- und perineuraler Lage der Injektionsnadel gewährleisten zu können, wurden die verwendeten Nervenanteile zuvor operativ dargestellt. Zur besseren Übertragbarkeit der gefundenen Ergebnisse auf den Menschen wurde als Großtiermodell ein porcines Modell gewählt. Der durch intra- oder perineurale Injektion von Bupivacain ausgelöste histologische Schaden an den Nerven des deutschen Landschweines wurde mit intra- oder perineuralneuraler Injektion von Bupivacain in Kombination mit Clonidin nach einer Einwirkzeit von 48 Stunden verglichen. Die Schwere der Nervenschäden wurden histologisch anhand eines ordinalskalierten Trauma-Scores nach Steinfeldt et al.<sup>90</sup> eingeteilt.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere

Als Tiermodell wurde das Schwein gewählt, da es zum einen ethisch nicht vertretbar wäre die Versuche mit anschließender Nervenentnahme am Menschen durchzuführen. Zum anderen ist das Schwein bezüglich des Immunsystems, des Metabolismus von Medikamenten, des Herz-Kreislauf- sowie des Atemsystems und auch der anatomischen Proportionen des brachialen Plexus dem Menschen im Vergleich zu anderen gewöhnlichen Versuchstieren (Ratten oder Kaninchen) ähnlicher<sup>91, 92</sup>. Auch verfügt die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Steinfeldt und Herrn PD Dr. Wiesmann aufgrund bereits zuvor mehrfach durchgeführter, vergleichbarer Versuchsaufbauten über mehrjährige Erfahrung mit diesem Großtiermodell. Die Genehmigung für die Versuchsdurchführung erfolgte durch das Regierungspräsidium Gießen (Ref: 50/2007, Hessen, Deutschland) gemäß den Konventionen von Helsinki (*Helsinki conventions for the use and care of animals*). Es wurden 13 weibliche Jungschweine der Rasse ‚deutsches Landschwein‘ (*Sus scrofa domesticus*) verwendet. Gezüchtet wurden die Tiere in der Lehr- und Forschungsstation ‚Oberer Hardthof‘ in Gießen. Um präexistente Erkrankungen auszuschließen, wurden die Tiere vor Einschluss in die Studie tierärztlich untersucht. Die Schweine wurden zwei Tage vor Versuchsbeginn in die Forschungseinrichtung geliefert, um sich an die Umgebung zu gewöhnen. Versorgt wurden sie mit standardisiertem Ferkelfutter (Typ Raiffeisen Hessen) bis acht Stunden und mit Wasser bis zwei Stunden vor OP-Beginn. Die ganze Zeit über wurden sie von ausgebildeten Tierpflegern versorgt. Da Schweine sensibel auf äußeren Stress reagieren<sup>92</sup>, wurde auf eine möglichst stressfreie und gewohnte Umgebung geachtet.

## **2.2 Versuchsaufbau und -durchführung**

### **2.2.1 Narkoseeinleitung und anästhesiologische Versorgung**

Zur Prämedikation bekamen die Tiere jeweils intramuskulär Diazepam (2 mg/kg Körpergewicht, Diazepam-ratiopharm®, Ratiopharm GmbH, Deutschland) und nach ca. 10–15 Minuten ein Gemisch aus Ketamin (20 mg/kgKG) + Atropin (0,02 mg/kgKG) injiziert. Anschließend wurden sie bei Bedarf noch durch einen mit Isofluran befeuchteten Tupfer zusätzlich betäubt und bei ausreichender Sedierungstiefe und erhaltener Spontanatmung mit dem Bauch voran auf dem OP-Tisch platziert. An einer dorsalen Ohrvene wurde ein intravenöser Zugang (20G, Vasofix® Safety, Fa. B. Braun, Melsungen) platziert. Über diesen wurde die Narkose mittels Propofol (10–20 mg/kgKG/h, Propofol-®Lipuro 2 %, Fa. B. Braun, Melsungen) und Sufentanil (0,7–1,0 µg/kgKG/h, Sufentanil-hameln®, hameln pharma plus GmbH, Deutschland) über Spritzenpumpen (Perfusor® compact S, Fa. B. Braun, Melsungen) in Form einer TIVA aufrechterhalten. Für den perioperativen Flüssigkeitsersatz wurde Ringer-Acetat (Fa. B. Braun, Melsungen) über Infusomaten (Infusomat® fm, Fa. B. Braun, Melsungen) verabreicht. Parallel wurde das Standardmonitoring bestehend aus Pulsoxymetrie (befestigt am Schwanz des Tieres; Eagle 4000®, Marquette Hellige GmbH, Deutschland), modifizierter EKG-Ableitung und nichtinvasiver Blutdruckmessung (befestigt am Hinterlauf des Tieres) angeschlossen. Die Körperkerntemperatur wurde kontinuierlich über eine nasale Temperatursonde (Fa. Maquet, Darmstadt) gemessen. Nach Präoxygenierung und ausreichender Sedierung wurden die Tiere auf dem Bauch liegend durch einen Endotrachealtubus intubiert, (Rüschelit®, 5 mm Innendurchmesser, Fa. Teleflex Medical, Irland) sowie anschließend druckkontrolliert und kapnometriegesteuert beatmet. Die Respiratoreinstellungen (Siemens Servo 300, Fa. Maquet, Darmstadt) wurden wie folgt gewählt:

- Atemfrequenz: 10–15/Minute
- inspiratorischer Druck über PEEP: 10–15 mbar
- PEEP: 5–8 mbar
- I:E-Verhältnis: 1:2
- FiO<sub>2</sub>: 0,3

- Endtidale CO<sub>2</sub>-Bereich (Capnocount® mini, Fa. Weinmann, Deutschland) 32–45 mmHg

Zur sicheren Zufuhr der perioperativen Flüssigkeit und der TIVA wurde ultraschallgesteuert ein ZVK (8 French, 3-Multilumen-Venenverweilkatheter, Fa. Arrow Deutschland, Erding) in die V. jugularis interna platziert. Um während der Versuchszeit von 48 Stunden eine suffiziente Beatmung und Bronchialtoilette zu garantieren, wurden die Tiere chirurgisch tracheotomiert und durch einen gekürzten Endotrachealtubus (Rüschelit®, 7 mm Innendurchmesser, Fa. Teleflex Medical, Irland) beatmet. Zur Überwachung einer adäquaten Organperfusion und Flüssigkeitsbilanzierung wurde ebenfalls ultraschallgesteuert ein suprapubischer Blasenkatheter platziert. Alle invasiven Maßnahmen wurden stets unter streng sterilen Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich erhielten die Versuchstiere zur perioperativen Antibiotikaprophylaxe alle acht Stunden 1,5 g Cefuroxim (MIP Pharma, Blieskastel). Die Narkose wurde über 48 Stunden aufrechterhalten. Die Tiere wurden alle zwei Stunden gedreht und ein Recruitment-Manöver durchgeführt um respiratorische Komplikationen durch Atelektasenbildung zu vermindern.

### **2.2.2 Präparation des Plexus brachialis**

Für die chirurgische Präparation des Plexus brachialis wurden die Schweine in Rückenlage gebracht, die Vorderläufe nach außen gestreckt und befestigt. Die Axillen wurden mit einem chirurgischen Hautantiseptikum (Kodan®, Fa. Schülke & Mayr, Norderstedt) desinfiziert. Unter sterilen Bedingungen (Abdecktücher und OP-Kleidung) wurde nach einer Hautinzision von 10–15 cm und stumpfer Tiefenpräparation der Plexus brachialis atraumatisch dargestellt. Der M. pectoralis major wurde im Laufe der Präparation scharf durchtrennt. Je nach geplantem Vorgehen (intra- oder perineuraler Injektion) wurde entweder die Gefäß-Nerven-Scheide eröffnet, die Nerven einzeln freigelegt und mittels eines Stimulators (Elektrostimulator; Polystim II Polymedic®, Fa. Temena Group, Frankreich) identifiziert oder die Gefäß-Nerven-Scheide wurde belassen. Anschließend wurde an den Hinterläufen des Schweines der N. tibialis auf einer Seite freipräpariert, aufgesucht und mittels einer Ligatur (Vicryl®, Fa. Ethicon, Norderstedt) ein Maximalschaden initiiert. Dieser wurde am Versuchsende als Positivkontrolle verwendet. Der N.



tibialis der Gegenseite wurde belassen und erst am Ende des Versuches unbeschadet als Negativkontrolle entnommen.

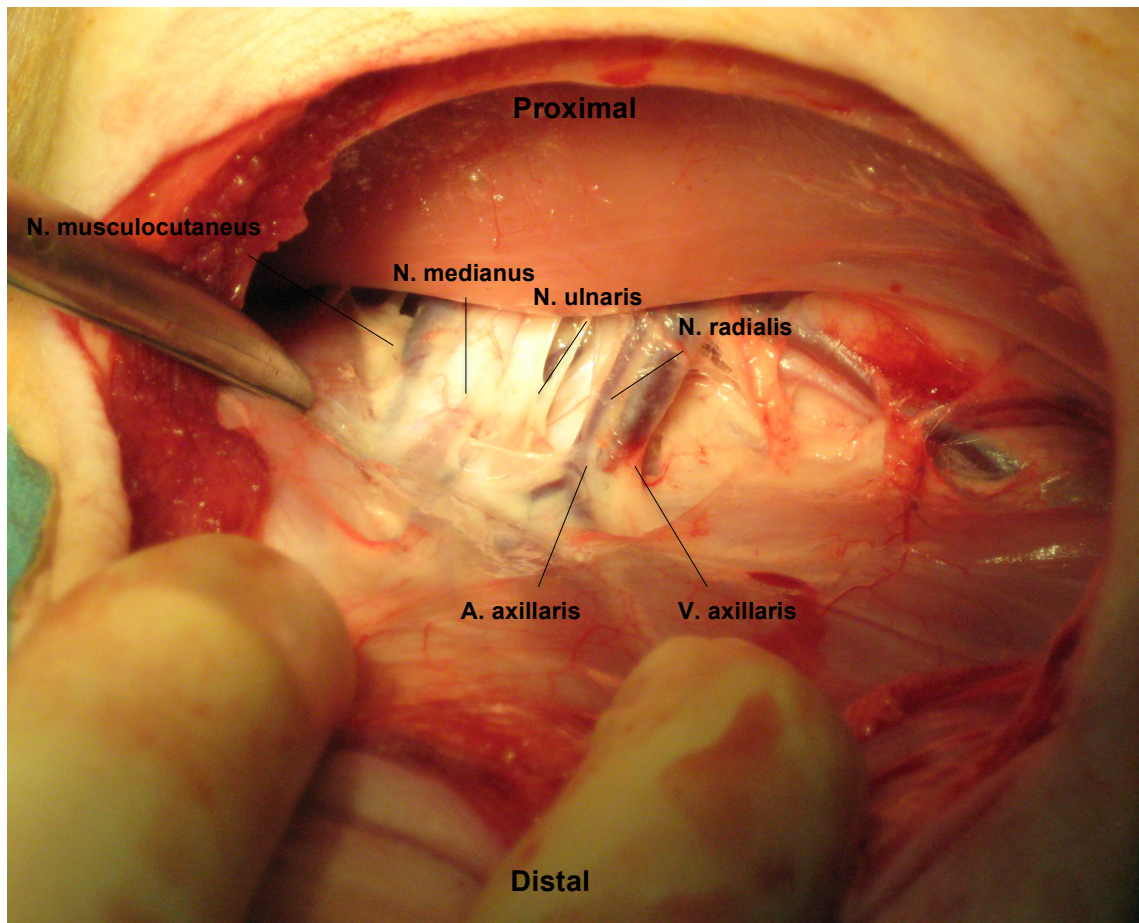


Abbildung 6 OP-Situs, Plexus brachialis eines Versuchsschweines bei eröffneter Gefäß-Nervenscheide

### 2.2.3 Injektionslösungen und Durchführung der Interventionen

Als Lokalanästhetikum wurde Bupivacain verwendet (Carbostesin® 0,5 %, Fa. AstraZeneca GmbH, Österreich). Untersuchte Adjuvanz war Clonidin (Clonidin-ratiopharm® 0,15 mg/mL). Clonidin wurde auf eine Konzentration von 3,75 µg/mL verdünnt und verwendet. Als Kontrolllösung wurde physiologische Kochsalzlösung (Natriumchlorid 0,9 %, Fa. B. Braun, Melsungen) verwendet. Bei intraneuraler Injektion wurde je Nerv 1 ml und bei perineuraler Injektion wurden je Gefäß-Nerven-Scheide 15 ml der jeweiligen Lösung verwendet. Durch die jeweiligen Injektionslösungen und die Interventionen an den später entnommenen Nerven ergaben sich folgenden Gruppen.

**Interventionsgruppen:**

<p><b>Bupivacain intraneural/perineural</b></p> <p>Einflüsse von Bupivacain als Einzelsubstanz auf den Nerv</p>	<p><b>Bupivacain &amp; Clonidin intraneural/perineural</b></p> <p>Einflüsse der Komb. Bupivacain &amp; Clonidin auf den Nerv</p>
---	--

Tabelle 5 Interventionsgruppen

**Kontrollgruppen:**

<b>Negativkontrolle</b>	<b>Positivkontrolle</b>
<p><b>NaCl intraneural/perineural</b></p> <p>Kontrolle des Injektionstraumas</p>	<p><b>Ligatur N. tibialis:</b></p> <p>Maximaltrauma zur Kontrolle des Trauma- Scores</p>
<p><b>Plexus brachialis ohne Intervention:</b></p> <p>Kontrolle des Operationstraumas</p>	
<p><b>N. tibialis ohne Intervention:</b></p> <p>Kontrolle systemischer Einflüsse ohne Operationstrauma</p>	

Tabelle 6 Kontrollgruppen

Mit einer 30G-Kanüle (BD Eclipse® Needle, Fa. BD, USA) wurde die jeweilige Injektionslösung entweder unter Sicht direkt in den freipräparierten Nerven (Gruppe intraneural) oder ebenfalls unter Sicht in die intakte Gefäß-Nerven-Scheide (Gruppe perineural) injiziert. Nach erfolgter Intervention wurden die Wunden mittels Hautnaht Vicryl® Plus, Fa. Ethicon, Norderstedt) verschlossen und steril (Telacomp® Kompressen, Fa. Paul Hartmann, Heidenheim) abgedeckt.

### **2.2.4 Nervenentnahme**

Nach 48-stündiger Allgemeinanästhesie und hämodynamischer Überwachung der Versuchstiere wurden die zu Versuchsbeginn mit den jeweiligen Testlösungen bearbeiteten Nerven erneut chirurgisch aufgesucht und entnommen. Neben den bereits einmal freigelegten und in entsprechender Weise bearbeiteten Nerven wurde nun auch der übriggebliebene N. tibialis freipräpariert und ohne Intervention entnommen. Alle Nerven wurden anschließend 48 Stunden in Behälter mit 4%ige Formaldehydlösung eingelegt. Die Resektate wurden mit Hilfe randomisierter Zahlen verblindet.

Die Versuchstiere wurden abschließend mit einem Kaliumchloridbolus (4 mmol/kgKG) in tiefer Allgemeinanästhesie getötet und die Kadaver fachgerecht entsorgt.

## **2.3 Histologie**

Histologische Schnitte wurden angefertigt, um die durch die Interventionen stattgefundenen mikroskopischen Veränderungen untersuchen, beurteilen und miteinander vergleichen zu können. Insgesamt wurden drei verschiedene Färbemethoden angewandt (HE, Klüver-Barrera und Immunhistochemie).

### **2.3.1 Histologische Aufarbeitung**

Die in Formalin fixierten Nerven wurden zunächst in Paraffin (Parablast, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland) eingebettet. Anschließend wurden mit einem Rotationsmikrotom (Mikrotom HM 340E®, Fa. Microm, Walldorf) 5 µm dicke Schnitte angefertigt. Je zwei Schnitte wurden auf einen Objektträger gelegt. Dabei wurde nach folgendem Schema bis zur vollständigen Aufarbeitung des Präparates vorgegangen:

1. ein Schnitt auf Standardobjektträger für HE-Färbung
2. zwei Schnitte auf speziellem Objektträger für Immunhistochemie
3. ein Schnitt auf Standardobjektträger für HE-Färbung
4. zwei Schnitte auf Standardobjektträger für Klüver-Barrera-Färbung

Nach jedem Zyklus wurden vier Schnitte verworfen. Die beladenen Objektträger wurden anschließend auf einer Wärmeplatte getrocknet und

später in einem Wärmeofen (Fa. Heraeus Med, Hanau) bei 60 Grad Celsius 24 Stunden belassen, um sie am Glas haftend zu machen.

### 2.3.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Das Akronym HE steht für das basische Hämatoxylin und das saure Eosin. Die HE-Färbung beruht auf den verschiedenen chemischen und elektrostatischen Eigenschaften der einzelnen Zellbestandteile. Mit Hilfe der HE-Färbung lassen sich chemisch gesehen saure bzw. basophile Zellstrukturen (z. B. das endoplasmatische Retikulum oder Zellkerne) durch den basischen Farbstoff Hämalaun blau anfärben<sup>80</sup>. Basische bzw. azidophile Zellstrukturen (z. B. Mitochondrien) werden durch den sauren Farbstoff Eosin rötlich dargestellt<sup>59 80</sup>. Bei der Anfertigung der HE-Färbung mittels Linear-Färbeautomaten (COT20; Medite GmbH; 31303 Burgdorf, Deutschland) wurde das Färbeschema nach Mayer (Merck KG, Darmstadt, Deutschland) des Instituts für Pathologie der Philipps-Universität Marburg zu Grunde gelegt.

#### Färbeprotokoll HE-Färbung

Lösung	Dauer
1. Xylol	3 Minuten
2. Ethanol 100 %	2 Minuten
3. Ethanol 96 %	1 Minute
4. Ethanol 70 %	1 Minute
5. Aqua dest.	1 Minute
6. Hämalaun	4 Minuten
7. Aqua dest.	2 Minuten
8. Eosin	3 Minuten
9. Ethanol 96 %	2 Minuten
10. Ethanol 100 %	2 Minuten
11. Xylol	2 Minuten

**Tabelle 7 HE-Färbeschema des Institutes für Pathologie der Philipps-Universität Marburg**

Am Ende der Färbung wurde auf die zuvor gefärbten Objektträger mit Hilfe eines Automaten (Promounter RCM 2000, Fa. Medite, Burgdorf) ein Deckgläschen aufgebracht. Die HE-Färbung diente als Übersichtsfärbung, um zum einen die Stärke der Inflammationsreaktion eines Nerven im Gesamten zu beurteilen und zum anderen, um den Ort der stärksten Inflammation in einem Nerv zu detektieren.

### **2.3.3 Markscheidenfärbung nach Klüver-Barrera**

Bei der Klüver-Barrera-Färbung werden Markscheiden und Zellkörper dargestellt. Zum einen werden mittels eines basischen Kupferkomplexes (Name des Farbstoffes: Luxol-Fast-Blau) Markscheiden hellblau dargestellt. Der Kupferkomplex ähnelt strukturell Chlorophyll und lagert sich an Neurokeratingerüste<sup>80</sup>. Zum anderen werden mit einer Kresylviolett-Färbung (Nissl-Färbung) sog. Nissl-Körperchen violett dargestellt<sup>59</sup>. Als Nissl-Körperchen werden RNA-haltige Strukturen bezeichnet, wie z. B. das endoplasmatische Retikulum, die sich bei Neuronen nur im Zellkörper befinden. Bei Zerstörung der Markscheiden zeigen sich im betroffenen Bereich nicht gefärbte, weiße Flecken, sog. Patches.

Von jedem Nerv wurde nur je ein Präparat mit Klüver-Barrera-Färbung angefertigt. Gewählt wurde der Schnitt welcher dem Bereich mit der stärksten Entzündungsreaktion im HE-Präparat direkt benachbart war. Die Färbung wurde vom Institut für Neuropathologie der Philipps Universität Marburg durchgeführt.

### Färbeprotokoll Klüver-Barrera

Arbeitsschritte	Dauer
1. Entparaffinieren mit Xylol	5 Minuten
2. Spülung mit Ethanol 96 %	10 Minuten
3. Inkubation mit Luxol-Echtblaulösung bei 56 C	120 Minuten
4. Rehydrierung	10 Minuten
5. Spülung mit Natronlauge 0,01 %	10 Minuten
6. Spülung mit Aqua dest.	1 Minute
7. Gegenfärbung mit Kresylviolettlösung bei 56 °C	6 Minuten
8. Dehydrierung	5 Minuten
9. Spülung mit Xylol	5 Minuten

**Tabelle 8 Klüver-Barrera-Färbeschema des Institutes für Neuropathologie der Philipps-Universität Marburg**

#### 2.3.4 Immunhistochemische Färbung

Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen können spezifische Oberflächenmoleküle (z. B. CD-Moleküle) auf verschiedenen Zellen (z. B. auf Makrophagen) nachgewiesen werden. CD-Moleküle (*Cluster of Differentiation*) sind eine Gruppe von Membran-Glykoproteinen, die sich auf der Oberfläche verschiedener Immunzellen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befinden und u. a. zur Differenzierung dieser Zellen herangezogen werden können<sup>30</sup>. Beispielsweise befindet sich das CD68-Protein sowohl in zytoplasmatischen Granula als auch in Membranen von Makrophagen<sup>30</sup>. Diese Färbemethode ermöglicht es daher, Makrophagen von evtl. vorhandenen anderen Immunzellen, wie z. B. neutrophile Granulozyten und Lymphozyten, zu unterscheiden. Um das CD68-Molekül darstellbar zu machen, müssen die Proben zuvor mit Trypsin behandelt werden<sup>59</sup>.

Das Prinzip der Immunhistochemie beruht auf dem spezifischen Erkennen bestimmter Antigene und deren farblicher Darstellung. Bei der immunhistochemischen Färbung werden zwei Antikörper verwendet. Der sog. Primärantikörper richtet sich spezifisch gegen das nachzuweisende Epitop (in diesem Falle CD68), während sich der Sekundärantikörper gegen den Fc-Teil

des Primärantikörpers richtet und Enzyme zur späteren Farbreaktion gekoppelt trägt. Verwendet wurde die sog. ABC-(Avidin-Biotin-Complex)-Methode<sup>12</sup>. Der Sekundärantikörper enthält viele Biotin-Reste. Über diese wird mittels Avidin eine Peroxidase an den Antikörper gekoppelt. Das verwendete Enzym ist die sog. HRP (*horseradish peroxidase*; *Meerrettichperoxidase*). Peroxidasen sind Enzyme, die Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) reduzieren können. Die in diesem Falle frei werdenden Elektronen und Protonen wandeln das verwendete farblose Chromogen (Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid) in ein stabiles braunes Endprodukt um, das am Ort des ursprünglichen Antigens als Braunfärbung sichtbar wird. Um optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen und die Bindungseigenschaften von Antikörpern und die Enzymreaktion nicht zu beeinflussen, wurden Pufferlösungen (PBS = phosphate buffered saline und TRIS = Trishydroxymethylaminoethan) verwendet und die Temperatur bei 37 °C gehalten. Endogen vorhandene Peroxidasen wurden durch Substratzugabe (0,6%ige Wasserstoffperoxidlösung in Methanol) im Überschuss gehemmt.

Kontrolliert wurde der Erfolg dieser Färbemethode anhand von im Schnitt enthaltenen Erythrozyten, deren Peroxidasen im Idealfall gehemmt wurde. Die Positivkontrolle erfolgte durch ein Gewebestück (Schweinemilz), das reichlich Makrophagen mit dem gesuchten CD68-Molekül enthält.

Auch hier wurde wieder pro Nerv nur ein Objektträger gefärbt. Gewählt wurde der Objektträger, der dem Bereich mit der stärksten Entzündung im HE-Präparat direkt benachbart war. Die Färbung wurde ebenfalls durch das Institut für Pathologie der Philipps Universität Marburg durchgeführt.

**Färbeprotokoll Immunhistochemie**

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Dauer</b>
1. Entparaffinieren mit Xylol	5 Minuten
2. Rehydrierung mit absteigender Ethanolreihe (100-100-96-70%)	je 3 Minuten
3. Spülung mit Aqua dest.	2 Minuten
4. Blockierung der endogenen Peroxidase	30 Minuten
5. Trypsinbehandlung zur Demaskierung von CD68 bei 37 °C	15 Minuten
6. Spülung mit Aqua dest.	2 Minuten
7. Spülung mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS)	5 Minuten
8. Inkubation mit 10 % ‚Normal-Horse-Serum‘	10 Minuten
9. Inkubation mit Primärantikörper bei 37 °C	60 Minuten
10. Spülung mit WashBuffer	5 Minuten
11. Inkubation mit Sekundärantikörper	30 Minuten
12. Spülung mit WashBuffer	5 Minuten
13. Inkubation mit Avidin-Biotin-Complex	30 Minuten
14. Spülung mit phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS)	5 Minuten
15. Inkubation mit Diaminobenzidin-Substratlösung	10 Minuten
16. Spülung mit Aqua dest.	3 Minuten
17. Gegenfärbung mit Hämalaun	1 Minute
18. Bläuen	3 Minuten
19. Dehydrierung in aufsteigender Ethanolreihe (96-96-100-100%)	je 3 Minuten

**Tabelle 9 Immunhistochemie-Färbeschema des Institutes für Pathologie der Philipps-Universität Marburg**



### 2.3.5 Trauma-Score und histologische Auswertung

Zur Auswertung wurden die gefärbten Präparate durch ein Lichtmikroskop (Olympus BX 51; Olympus Deutschland GmbH, 2009 Hamburg, Deutschland) in 40-, 100- und 200-facher Vergrößerung beurteilt. Die Nervenschäden wurden anhand von drei Hauptmerkmalen (Inflammation, Hämatom und Myelinschäden) beurteilt und mit Hilfe eines Scores in Anlehnung an Steinfeldt et al.<sup>90</sup> in fünf Schweregrade (0–4) eingeteilt.

Score	Definition
0	kein Zeichen eines Traumas
1	kleinere Bereiche mit dezenter Akkumulation inflammatorischer Zellen
2	größere Bereiche mit massiver Akkumulation inflammatorischer Zellen
3	Bereiche mit definitiven Zeichen einer Inflammation und eines Hämatoms
4	Bereiche mit definitiven Zeichen einer Inflammation, Hämatom und eines Myelinschadens

**Tabelle 10** Histologischer Trauma-Score aus <sup>90</sup>

Aufgrund der drei Hauptmerkmale, anhand derer der Nervenschaden beurteilt werden kann, wurden auch die drei beschriebenen Färbungen benötigt:

- HE-Färbung zur Beurteilung des Leukozytengehalts und eines eventuellen Hämatoms
- Klüver-Barrera-Färbung zur Beurteilung eines Myelinschadens
- CD68-Immunhistochemie zur Beurteilung einer Entzündung bzw. zur sicheren Detektion von Makrophagen

Zunächst wurden nur die HE-gefärbten Präparate (hinsichtlich der Intervention für den Untersucher verblindet) eines Nervs auf Leukozytengehalt und ein evtl. vorhandenes Hämatom hin untersucht. Leukozyten zeigten sich in der HE-Färbung als große Zellen mit hoher Kern-Plasma-Relation. Ziel der Untersuchung der HE-gefärbten Präparate war es, in jedem Nerv den Abschnitt mit dem höchsten Schaden zu detektieren. Jedem Objektträger

wurde dabei ein Score-Wert zugeteilt. In der HE-Färbung konnten entsprechend des Trauma-Scores nur Werte von 0–3 vergeben werden. Die bewerteten Objektträger wurden, um eine möglichst Anwender unabhängige Beurteilung des Traumas zu erreichen, durch geschulte und erfahrene Mitglieder der Arbeitsgruppe zusätzlich und ebenfalls verblindet bewertet. Bei Uneinigkeit wurde sich nach gemeinsamer Beurteilung und Diskussion auf einen definitiven Wert geeinigt. Bestand weiterhin Unstimmigkeit, wurde ein Pathologe zur Beurteilung hinzugezogen. Von jedem Nerv wurden zusätzlich noch in dem Bereich, der den stärksten Schaden aufwies, ein benachbarter Objektträger mit Klüver-Barrera-Färbung (erst jetzt konnte der Myelinschaden beurteilt und evtl. ein Score von 4 vergeben werden) und ein benachbarter Objektträger mit immunhistochemischer Färbung (zum definitiven Nachweis von Makrophagen mittels CD68-Antikörpern) angefertigt und mikroskopiert. Jeder Nerv wurde letztendlich im Ganzen mit nur einem Score-Wert bewertet, dieser entsprach dem Wert des Bereichs mit stärksten Schaden innerhalb dieses Nervens.

## **2.4 Statistische Methoden**

### **2.4.1 Fallzahlberechnung**

Mit Hilfe des *sample size calculator* G\*Power (Version 3.1.7, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Deutschland), wurden die Fallzahlen so kalkuliert, dass bei einer statistischen Power von 90 % ein Unterschied von einem Score-Wert von mindestens ‚1‘ zwischen den verschiedenen Gruppen als signifikant detektiert werden konnte. Die Wahrscheinlichkeit für das Eintreten des Fehlers 2. Art ( $\beta$ -Fehler) betrug somit 10 %. Zudem stützte sich die Fallzahlberechnung auf eine geschätzte Standardabweichung (gemäß der Erfahrung aus zuvor durch die Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Dr. Steinfeldt durchgeführten Studien<sup>89 90</sup>) von 0,5 und auf ein Signifikanzniveau von 5 % (Wahrscheinlichkeit für das Eintreten des Fehlers 1. Art bzw.  $\alpha$ -Fehler; Anteil falsch positiver Ergebnisse). Es wurde eine Verlustrate (z. B. durch das vorzeitige Versterben der Tiere, Infektionen im Operationsgebiet oder durch akzidentielle Zerstörung der Nerven bei deren Bearbeitung) von 20 % angenommen.

Die Verteilung der Fallzahlen zwischen Kontroll- und Interventionsgruppe betrug 1:1, während sie bei der intraneuralen und perineuralen Injektion 3:2 betrug. Somit wurde eine Mindestanzahl von zwölf Injektionen pro Gruppe geschätzt und, um Verluste auszugleichen, wurden vierzehn Injektionen pro Gruppe geplant. Für die Negativ- und Positivkontrollen wurde mit jeweils neun Nerven geplant.

Da pro Schwein sechs bis acht Injektionen in den Plexus brachialis und zwei Interventionen an den tibialen Nerven möglich sind, mussten bei einer Gesamtfallzahl von siebenzig Nerven mindestens zwölf Schweine für die Studie verwendet werden.

#### **2.4.2 Statistische Auswertung**

Aus den maximalen, ordinalskalierten Score-Werten wurden die Medianwerte der jeweiligen Gruppe ermittelt und innerhalb der 25. und 75. Perzentile angegeben. Aufgrund der nicht normalverteilten Daten erfolgte eine nichtparametrische statistische Testung. Zunächst wurde ein Kruskal-Wallis-Test zum Vergleich der medianen Score-Werte zwischen den einzelnen Gruppen angewandt. Hiermit wurde überprüft, ob es einen Unterschied zwischen den medianen Score-Werten der einzelnen Gruppen gab und damit, ob der experimentelle Aufbau erfolgreich war. Bei einem durch diesen Test detektierten signifikanten Unterschied wurde ein paarweiser Vergleich der unterschiedlichen Gruppen mittels Mann-Whitney-Test durchgeführt.

Aufgrund multipler Testungen wurde mit Hilfe der Bonferroni-Methode eine Kumulierung des  $\alpha$ -Fehlers ausgeschlossen. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant angesehen. Zur statistischen Auswertung wurde die Software IBM SPSS Statistics, release 22.0, IBM, Armonk, USA, benutzt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Versuchstiere

In der vorliegenden Studie wurden für die geplanten Interventionen insgesamt 13 anästhesierte Schweine verwendet. Bis auf ein Schwein überlebten alle Versuchstiere die Eingriffe bis zum Versuchsende. Das eine verstorbene Schwein starb vor Versuchsende aufgrund eines Herz-Kreislauf-Stillstandes. Daher wurde ein weiteres Versuchstier genutzt und erhielt die geplanten Interventionen. Die übrigen Schweine konnten ohne Zeichen einer systemischen Infektion oder sonstiger kardiopulmonaler Komplikationen bis zum Versuchsende erfolgreich überwacht werden.

#### 3.2 Nervenproben

Insgesamt wurden 111 Nerven entnommen und histologisch untersucht.

<b>Intervention</b>	<b>Anzahl der Nerven</b>
Bupivacain & Clonidin intraneural	13
Bupivacain intraneural	12
Bupivacain & Clonidin perineural	18
Bupivacain perineural	15
NaCl intraneural	10
NaCl perineural	9
NaCl & Clonidin intraneural	8
Plexus brachialis ohne Intervention	8
N. tibialis ohne Intervention	9
Ligatur N. tibialis	9

Tabelle 11 Anzahl der Nerven aufgeteilt auf die jeweiligen Gruppen

Bei der Entnahme kam es makroskopisch zu keinen zusätzlichen Traumatisierungen wie z. B. Einblutungen oder Rupturen der Nerven. Bei den Nerven, an denen eine intraneurale Injektion durchgeführt wurde, war die Einstichstelle nicht mehr sichtbar. In der Ligaturgruppe (positive

Kontrollgruppe) zeigten alle Nerven bereits makroskopisch sichtbare Schwellungen und Gewebeeinblutungen.

### **3.3 HE-Färbung**

Die HE-Färbung wurde als Screening-Verfahren benutzt. Die Nerven wurden auf Leukozytengehalt und Hämatom hin untersucht. Das Auftreten von Leukozyten wurde als Inflammation interpretiert und die Nerven je nach Stärke der Leukozytenakkumulation mit einem Score von 1–2 bewertet. Trat zusätzlich noch ein Hämatom auf, wurde ein Mindestscore von 3 vergeben.

Eine Leukozytenakkumulation zeigte sich insgesamt bei vierundsechzig von einhundertelf Nerven (57,65 %).

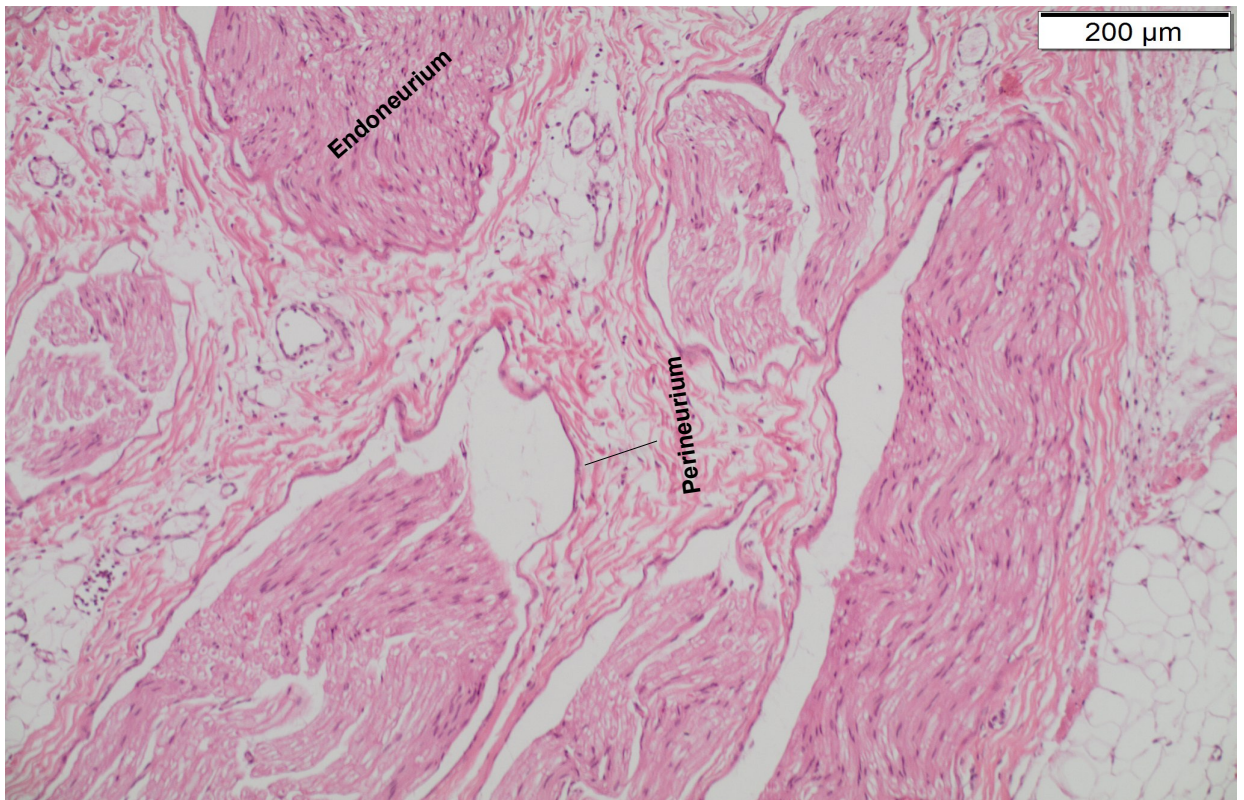
In der Gruppe ‚Bupivacain & Clonidin intraneural‘ waren Leukozytenansammlungen in elf von dreizehn Nerven (84,61 %) zu finden. Im Vergleich dazu zeigte die Gruppe ‚Bupivacain intraneural‘ eine Akkumulation von Leukozyten in elf von zwölf Nerven (91,7 %). In den perineuralen Gruppen zeigte die Gruppe ‚Bupivacain & Clonidin perineural‘ in elf von achtzehn Nerven (61,11 %) und die Gruppe ‚Bupivacain perineural‘ in neun von fünfzehn Nerven (60 %) eine Ansammlungen von Leukozyten. In der Gruppe ‚NaCl intraneural‘ gab es in fünf von zehn Nerven (50 %) eine Ansammlung von Leukozyten, bei der Gruppe ‚NaCl perineural‘ zeigte dagegen nur einer von neun Nerven (11,1 %) eine solche Akkumulation. In der Gruppe ‚NaCl & Clonidin intraneural‘ waren es fünf von acht Nerven (62,5 %). Bei den Negativkontrollen zeigte die Gruppe ‚Plexus brachialis ohne Intervention‘ in zwei von acht Nerven (25 %) und die Gruppe ‚N. tibialis ohne Intervention‘ in null von neun Nerven (0 %) eine Leukozytenansammlung. In der Gruppe der Positivkontrolle (Maximalschaden) ‚Ligatur des N. tibialis‘ wiesen alle neun Nerven (100 %) eine Inflammation im Sinne einer Leukozytenakkumulation auf.

Perineurale Einblutungen fanden sich in zwölf der einhundertelf Nerven (9,25 %). In der Interventionsgruppe ‚Bupivacain intraneural‘ waren es drei von zwölf Nerven (25 %) und in der Gruppe ‚Bupivacain perineural‘ war es einer von fünfzehn Nerven (6,7 %), bei denen eine Einblutung gefunden werden konnte. In der positiven Kontrollgruppe mit Maximalschaden ‚Ligatur N. tibialis‘ zeigten sich in acht von neun Nerven (88,9 %) Hämatome. Die übrigen Nerven

in den anderen Gruppen waren frei von Hämatomen. Das Auftreten eines Hämatoms war stets mit dem Auftreten einer Leukozytenakkumulation und daher mit einer Entzündung assoziiert. Jedoch zeigte nicht jede Leukozytenakkumulation auch gleichzeitig eine Einblutung.

<b>Intervention</b>	<b>Anzahl der Nerven mit Leukozytenakkumulation (%)</b>	<b>Anzahl der Nerven mit Hämatom (%)</b>
Bupivacain & Clonidin intra neural	11 von 13 (84,61)	0 von 13 (0)
Bupivacain intra neural	11 von 12 (91,7)	2 von 12 (16,67)
Bupivacain & Clonidin peri neural	11 von 18 (61,11)	0 von 18 (0)
Bupivacain peri neural	9 von 15 (60)	1 von 15 (6,7)
NaCl intra neural	5 von 10 (50)	0 von 10 (0)
NaCl peri neural	1 von 9 (11,1)	0 von 9 (0)
NaCl & Clonidin intra neural	5 von 8 (62,5)	0 von 8 (0)
Plexus brachialis ohne Intervention	2 von 8 (25)	0 von 8 (0)
N. tibialis ohne Intervention	0 von 9 (0)	0 von 9 (0)
Ligatur N. tibialis	9 von 9 (100)	8 von 9 (88,9)

**Tabelle 12** Leukozytenakkumulation und Hämatomverteilung, aufgeteilt nach den jeweiligen Gruppen



**Abbildung 7 HE-Färbung; peripherer Nerv (Gruppe: Bupivacain + Clonidin intraneural), 100-fache Vergrößerung**

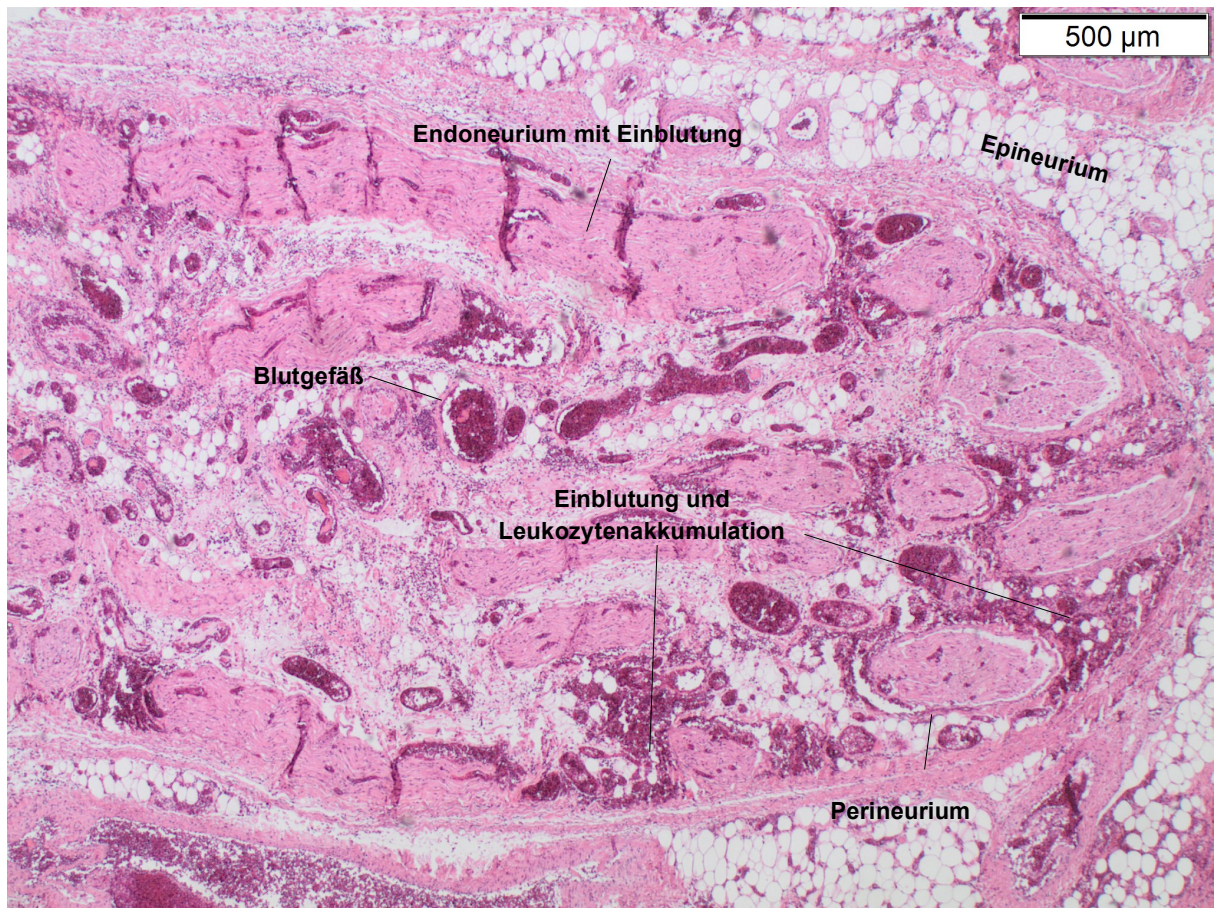


Abbildung 8 HE-Färbung; N. tibialis mit Leukozytenakkumulation und Einblutung (Gruppe: Ligatur), 40-fache Vergrößerung

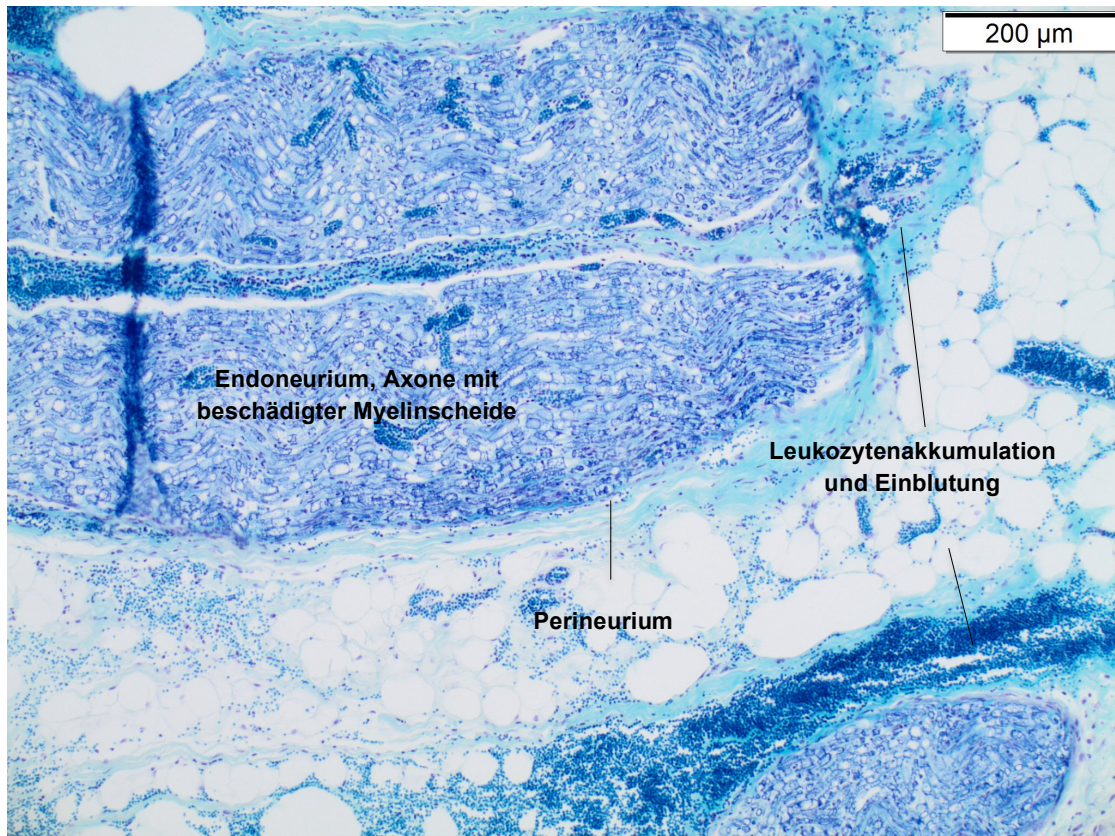


### 3.4 Klüver-Barrera-Färbung

Ein Myelinschaden und damit ein Score-Wert von 4 konnte nur an Nerven aus der Gruppe des Maximalschadens ‚Ligatur N. tibialis‘ diagnostiziert werden. Hier zeigte sich in acht von neun Fällen (88,9 %) eine Veränderung der Myelinscheide im Sinne einer abgeschwächten oder fehlenden blauen Anfärbung in der Klüver-Barrera-Färbung. Parallel waren in den benachbarten HE-Schnitten stets auch eine starke Leukozytenakkumulation und ein perineurales Hämatom aufzufinden. In allen übrigen Gruppen trat kein Myelinschaden auf. Das Auftreten eines Myelinschadens war daher stets an das Vorhandensein eines starken Traumas bzw. einer starken Entzündung gekoppelt.

<b>Intervention</b>	<b>Anzahl der Nerven mit Myelinschaden (%)</b>
Bupivacain & Clonidin intraneural	0 von 13 (0)
Bupivacain intraneural	0 von 12 (0)
Bupivacain & Clonidin perineural	0 von 18 (0)
Bupivacain perineural	0 von 15 (0)
NaCl intraneural	0 von 10 (0)
NaCl perineural	0 von 9 (0)
NaCl & Clonidin intraneural	0 von 8 (0)
Plexus brachialis ohne Intervention	0 von 8 (0)
N. tibialis ohne Intervention	0 von 9 (0)
Ligatur N. tibialis	8 von 9 (88,9)

Tabelle 13 Myelinschäden in den jeweiligen Gruppen



**Abbildung 9 Klüver-Barrera-Färbung; N. tibialis mit Myelinschaden, Leukozytenakkumulation und Einblutung (Gruppe: Ligatur), 100-fache Vergrößerung**

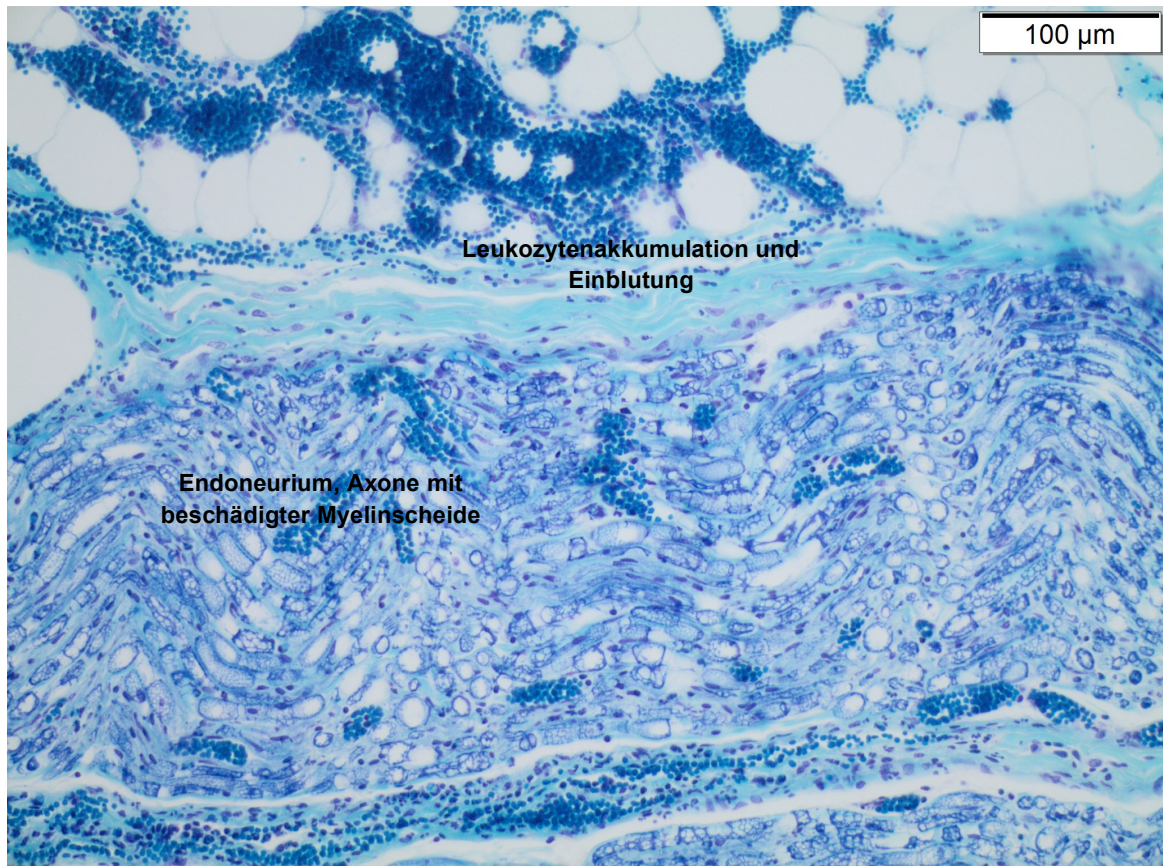


Abbildung 10 Klüver-Barrera-Färbung; N. tibialis mit Myelinschaden, Leukozytenakkumulation und Einblutung (Gruppe: Ligatur), 200-fache Vergrößerung

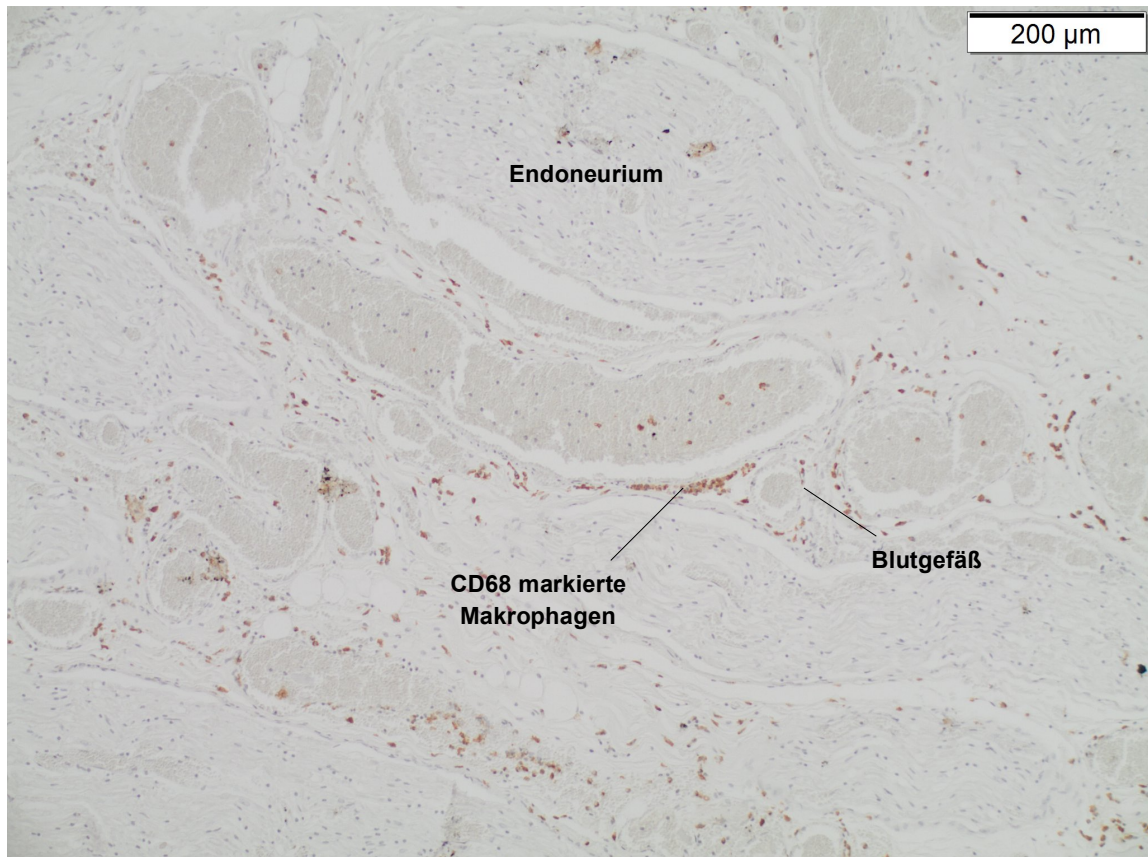
### 3.5 Immunhistochemische Färbung

Mit Hilfe des immunhistochemischen Nachweises des CD68-Proteins ließ sich in einhundertzehn der insgesamt einhundertelf (99,09 %) entnommenen Nerven Makrophagen nachweisen. Lediglich in der Kontrollgruppe ‚intranuraler NaCl-Injektion‘ zeigte sich in einem Nerv keinerlei Nachweis von Makrophagen. Die nachgewiesene Makrophagenakkumulation in allen anderen Präparaten trat in räumlicher Übereinstimmung mit einer zuvor in der HE-Färbung detektierten Leukozytenakkumulation auf.

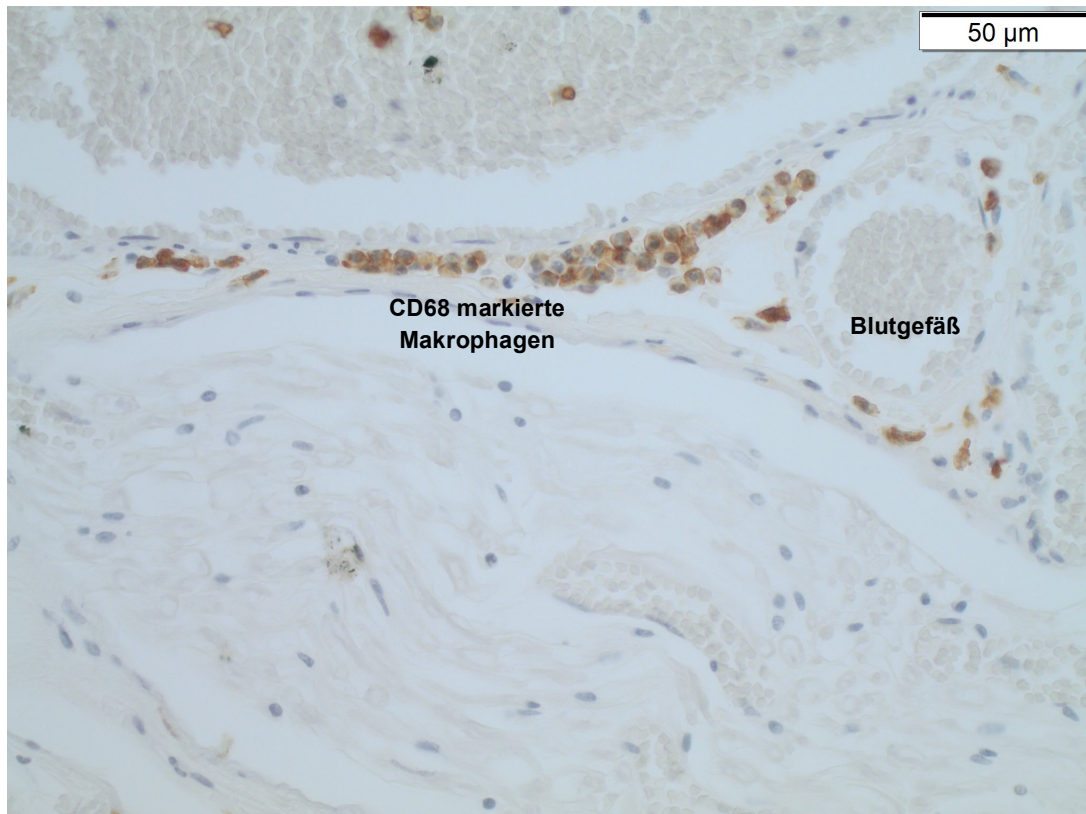
Folgende Tabelle zeigt das Verhältnis der Makrophagen zur Gesamtzahl der Leukozyten in den jeweiligen Nerven in Prozent. Hierzu wurde bei 200facher Vergrößerung, 5 repräsentative Gesichtsfelder ausgezählt.

<b>Intervention</b>	<b>CD68-positive Zellen; Mittelwert in % (Standardabweichung)</b>
Bupivacain & Clonidin intraneural	23,46 (15,19)
Bupivacain intraneural	29,58 (17,38)
Bupivacain & Clonidin perineural	18,89 (14,71)
Bupivacain perineural	18,67 (13,95)
NaCl intraneural	15,50 (14,80)
NaCl perineural	5,56 (1,67)
NaCl & Clonidin intraneural	10,0 (4,63)
Plexus brachialis ohne Intervention	8,13 (2,59)
N. tibialis ohne Intervention	6,11 (2,20)
Ligatur N. tibialis	55,56 (24,04)

**Tabelle 14** prozentualer Anteil CD68-positiver Zellen zur Gesamtleukozytenzahl, aufgeteilt nach Gruppen



**Abbildung 11 CD68-Immunhistochemische-Färbung, N. tibialis mit Makrophagenansammlung (Gruppe: Ligatur), 100-fache Vergrößerung**



**Abbildung 12 CD68-Immunhistochemische-Färbung; N. tibialis mit Makrophagenansammlung (Gruppe Ligatur), 400-fache Vergrößerung**

### 3.6 Ergebnisse des histologischen Trauma-Scores

Der primäre Endpunkt der vorliegenden Arbeit war der entstandene histologische Nervenschaden in der Gruppe ‚Bupivacain intraneural‘ versus die Gruppe ‚Bupivacain & Clonidin intraneural‘, quantifiziert anhand des oben beschriebenen Trauma-Scores nach Steinfeldt et al.<sup>88</sup>.

Jede Interventions- oder Kontrollgruppe wurde im Ganzen mit nur einen Score-Werte bewertet. Dieser Wert entspricht dem Median der Score-Werte der einzelnen Nerven innerhalb der jeweiligen Gruppe. In Klammer wird der Interquartilsabstand angegeben. Der mediane Score-Wert gibt die Stärke der histologischen Inflammationsreaktion bzw. des histologischen Nervenschadens wieder.

Die Interventionsgruppen ‚Bupivacain intraneural‘ und ‚Bupivacain & Clonidin intraneural‘ zeigten beide histologisch milde inflammatorische Veränderungen und wurden mit einem medianen Score von 1 (1– 2) gewertet.

Ebenfalls leichte histologische Nervenschäden mit einem medianen Score von 1 (0–1) traten in den Gruppen ‚Bupivacain perineural‘ und ‚Bupivacain & Clonidin perineural‘ auf.

Die Nerven der negativen Kontrollgruppen (‚Plexus brachialis ohne Intervention‘ und ‚N. tibialis ohne Intervention‘) zeigten allesamt keine histologischen Veränderungen und erhielten dementsprechend einen Score im Median von 0 (0–0).

Die Nerven der Positivkontrolle (‚Ligatur des N. tibialis‘) hingegen wiesen stets die stärkste Inflammation mit begleitendem intraneuralem Hämatom und Myelinschaden auf. Daher wurde die Nerven dieser Gruppe mit einem Score im Median von 4 (4–4) bewertet.

In der Gruppe ‚NaCl-Injektion‘ zeigte sich bei perineuraler Injektion keine Nervenschädigung (Median 0) bzw. bei intraneuraler Injektion eine sehr leichte Schädigung (Median 0,5). Bei der Kombination ‚NaCl & Clonidin intraneural‘ wiesen die Nerven im Schnitt eine etwas stärkere Entzündung auf (Median 1,0).

Intervention	mediane Score-Werte (IQR)
Bupivacain & Clonidin intraneural	1,0 (1,0–2,0)
Bupivacain intraneural	1,0 (1,0–2,0)
Bupivacain & Clonidin perineural	1,0 (0,0–1,0)
Bupivacain perineural	1,0 (0,0–1,0)
NaCl intraneural	0,5 (0,0–1,0)
NaCl perineural	0 (0,0–0,0)
NaCl & Clonidin intraneural	1,0 (0,0–1,0)
Plexus brachialis ohne Intervention	0 (0,0–0,0)
N. tibialis ohne Intervention	0 (0,0–0,0)
Ligatur N. tibialis	4 (4,0–4,0)

Tabelle 15 mediane Score-Werte der einzelnen Gruppen

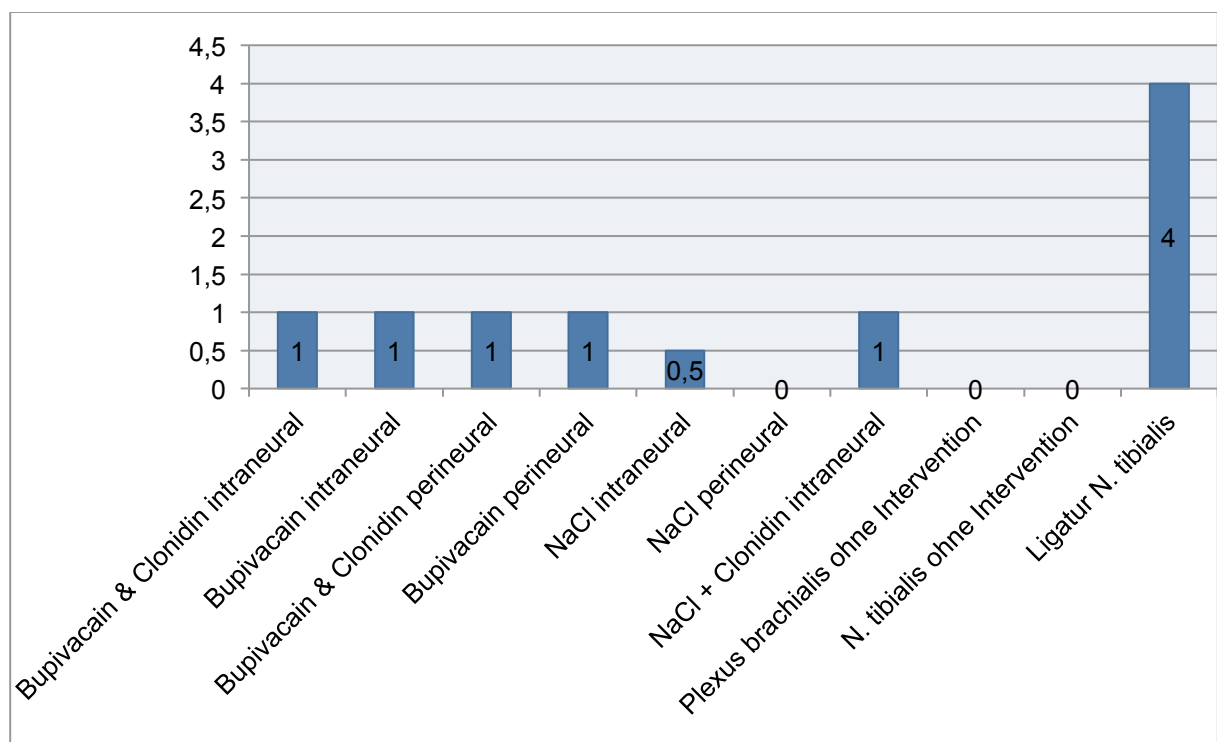


Abbildung 13 mediane Score-Werte der einzelnen Gruppen



<b>Intervention</b>	<b>Anzahl</b>	<b>Score-Werte (IQR)</b>	<b>Hämatom (%)</b>	<b>Myelinschaden (%)</b>	<b>CD68<sup>+</sup>-Zellen (SD)</b>
Bupivacain & Clonidin intraneural	13	1,0 (1–2)	0 (0)	0 (0)	23,46 (15,19)
Bupivacain intraneural	12	1,0 (1–2)	2 (16,67)	0 (0)	29,58 (17,38)
Bupivacain & Clonidin perineural	18	1,0 (0-1)	0 (0)	0 (0)	18,89 (14,71)
Bupivacain perineural	15	1 (0–1)	1 (6,67)	0 (0)	18,67 (13,95)
NaCl intraneural	10	0,5 (0–1)	0 (0)	0 (0)	15,50 (14,80)
NaCl perineural	9	0 (0–0)	0 (0)	0 (0)	5,56 (1,67)
NaCl & Clonidin intraneural	8	1,0 (0–1)	0 (0)	0 (0)	10,0 (4,63)
Plexus brachialis ohne Intervention	8	0 (0–0)	0 (0)	0 (0)	8,13 (2,59)
N. tibialis ohne Intervention	9	0 (0-0)	0 (0)	0 (0)	6,11 (2,20)
Ligatur N. tibialis	9	4 (4–4)	8 (88,9)	8 (88,9)	55,56 (24,04)

**Tabelle 16 Übersicht deskriptive Statistik**

### 3.7 Statistischer Vergleich der einzelnen Gruppen

Im globalen Vergleich der einzelnen Gruppen untereinander zeigte sich durch den Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied bezüglich der medianen Score-Werte. Die Nullhypothese (keine Unterschiede der medianen Score-Werte unabhängig von den jeweiligen Gruppen bzw. der injizierten Substanzen und Ort der Injektion) konnte verworfen und ein paarweiser Vergleich der verschiedenen Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt werden.

Beim Vergleich der medianen Score-Werte der beiden Interventionsgruppen ‚Bupivacain intraneural‘ und ‚Bupivacain & Clonidin intraneural‘ konnte im Mann-Whitney-U-Test kein signifikanter Unterschied in Bezug auf den histologischen Nervenschaden festgestellt werden ( $p=0,372$ ).

Wurde die Lokalisation der Injektionen in den verschiedenen Gruppen miteinander verglichen, zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Beim Vergleich von ‚Bupivacain & Clonidin intraneural‘ mit ‚Bupivacain & Clonidin perineural‘ und ‚NaCl intraneural‘ mit ‚NaCl perineural‘ ließen sich jeweils keine signifikanten Unterschiede bezüglich des histologischen Nervenschadens nachweisen ( $p=0,091$ ,  $p=0,076$ ).

Im Vergleich der Interventionsgruppe ‚Bupivacain intraneural‘ mit den negativen Kontrollgruppen ‚Plexus brachialis ohne Intervention‘ und ‚N. tibialis ohne Intervention‘ zeigte sich jeweils eine signifikant stärkere Schädigung der Nerven in den Interventionsgruppen ( $p=0,008$  bzw.  $p<0,001$ ). Auch konnte gezeigt werden, dass eine intraneurale Bupivacain Injektion die Nerven signifikant stärker schädigt als eine intraneurale NaCl-Injektion ( $p=0,007$ ).

Beim Vergleich von ‚Bupivacain intraneural‘ mit der Positivgruppe ‚Ligation N. tibialis‘ waren die Nerven der positiven Kontrollgruppe signifikant stärker geschädigt ( $p=0,001$ ).

Der Vergleich der Interventionsgruppe ‚Bupivacain & Clonidin intraneural‘ mit der Kontrollgruppe ‚NaCl intraneural‘ zeigte wiederum eine signifikant stärkere Nervenschädigung in der Interventionsgruppe ( $p=0,027$ ). Ebenso der Vergleich von ‚Bupivacain intraneural‘ mit ‚NaCl + Clonidin intraneural‘ ( $p=0,024$ ).

<b>Vergleich</b>	<b>p-Wert</b>
Bupivacain intraneural / Bupivacain & Clonidin intraneural	0,372
Bupivacain & Clonidin intraneural / Bupivacain & Clonidin perineural	0,091
NaCl intraneural / NaCl perineural	0,076
Bupivacain intraneural / NaCl intraneural	0,007
Bupivacain intraneural / Plexus brachialis ohne Intervention	0,008
Bupivacain intraneural / N. tibialis ohne Intervention	0,001
Bupivacain intraneural / Ligatur N. tibialis	0,001
Bupivacain + Clonidin intraneural / NaCl intraneural	0,027
Bupivacain intraneural / NaCl + Clonidin intraneural	0,024

Tabelle 17 Überblick über die durchgeführten Vergleiche

## **4. Diskussion**

### **4.1 Ergebnisse**

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich hinsichtlich des primären Endpunktes – Vergleich der histologischen Nervenraumatisierung nach intraneuraler Bupivacain Injektion versus intraneuraler Bupivacain & Clonidin Injektion – kein signifikanter Unterschied ( $p=0,372$ ). Nach vorliegender Auswertung kann demnach kein ausreichend immunmodulierender, entzündungshemmender oder gar neuroprotektiver Effekt von Clonidin auf die durch intraneurale Injektion von Bupivacain hervorgerufene Neuroinflammation nachgewiesen werden.

Ebenso zeigte sich kein Unterschied im histologischen Nervenschaden beim Vergleich der Lokalisation der Injektionen miteinander. Perineurale verglichen mit intraneuralen Injektionen sowohl von Bupivacain & Clonidin ( $p=0,091$ ) als auch von NaCl ( $p=0,076$ ) verursachen gemäß den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbare histologische Nervenraumatisierungen.

Die bekannte und in der Literatur bereits mehrfach beschriebene Neurotoxizität von Bupivacain wurde im Rahmen dieser Arbeit erneut bestätigt. Dies zeigte sich anhand des Vergleiches der Interventionsgruppe ‚Bupivacain intraneural‘ versus der Kontrollgruppe ‚NaCl intraneural‘ ( $p=0,007$ ). Es fand sich eine signifikant stärkere Neuroinflammation in der Bupivacaingruppe.

### **4.2 Ergebnisse im Kontext vorliegender Literatur**

Wie durch eine Vielzahl von Studien bisher bewiesen, rufen alle Lokalanästhetika in Abhängigkeit ihrer Konzentration und Einwirkdauer eine aseptische Inflammation am Nerv hervor<sup>42 43 64 81 83 70, 94 100</sup>. Damit sind Lokalanästhetika eine mögliche Ursache und ein Risikofaktor für das Auftreten postoperativer Neuropathien nach Eingriffen in Regionalanästhesie. Die Auswirkungen der im Rahmen einer Regionalanästhesie eventuell hinzugefügten Adjuvanz Clonidin auf diese Entzündungsreaktion und auf eine

mögliche konsekutive Nervenläsion sind in der Literatur noch nicht eindeutig beschrieben. Clonidin besitzt neben einer co-analgetischen<sup>18 19 93</sup> auch eine antiinflammatorische bzw. immunmodulatorische Wirkung<sup>54 76 77 78 79 99</sup>. Dadurch wurde die Hypothese formuliert, dass Clonidin die aseptische Inflammationsreaktion durch intraneural injiziertes Bupivacain modulieren bzw. abschwächen kann.

Romero-Sandoval und Eisenach wiesen durch ihre Arbeiten an einem standardisierten Nervenstrauma-Modell (PSNL; *partial sciatic nerve ligation*) an Rattennerven nach, dass perineural injiziertes Clonidin in der Lage ist, das Vorkommen von Leukozyten und deren Zytokinproduktion zu Gunsten einer antiinflammatorischen Konstellation zu verschieben und damit auch die begleitenden Schmerzen zu reduzieren<sup>77 78 79</sup>. Verglichen wurde der Einfluss von perineural injiziertem Clonidin mit perineural injiziertem NaCl. Clonidin reduzierte im Vergleich zu NaCl signifikant die Anzahl proinflammatorischer Leukozyten, die Menge proinflammatorischer Zytokine (v. a. IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ) und den dadurch entstehenden neuropathischen Schmerz. Zeitgleich nahm die Anzahl von antiinflammatorischen Leukozyten und Zytokinen (z.B. TGF- $\beta$ -1) am Schädigungsort zu. Proinflammatorische Zytokine sind u.a. für die Entstehung und Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen verantwortlich. Produziert werden sie v. a. von Makrophagen und Lymphozyten. Makrophagen sind eine Untergruppe der Leukozyten, die in vorliegender Studie mittels immunhistochemischer-CD68-Färbung nachgewiesen wurden, unter der Annahme, dass die Menge der Makrophagen die Schwere der Entzündungsreaktion widerspiegelt. In vorliegender Arbeit zeigte sich bei intraneuraler Injektion von Bupivacain in Kombination mit Clonidin keine signifikante Reduktion der histologischen Nervenschädigung und der Anzahl an Makrophagen verglichen mit alleiniger intraneuraler Bupivacain Injektion. Die bei Romero-Sandoval und Eisenach in Folge einer perineuralen Clonidin Injektion beschriebene vermehrte antiinflammatorische Zytokinproduktion ist nach den Ergebnissen vorliegender Studie demnach nicht in der Lage, den histologischen Nervenschaden durch intraneural injiziertes Bupivacain innerhalb von 48 Stunden signifikant zu reduzieren. Einschränkend ist zu erwähnen, dass die Versuche bei Romero-Sandoval und Eisenach an Rattennerven durchgeführt wurden, denen zuvor ein

standardisiertes Trauma zugefügt wurde. Ein Lokalanästhetikum wie z.B. Bupivacain wurde nicht verwendet. Zudem wurde nach 24 Stunden und nach 3 Tagen das Schmerzverhalten der Versuchstiere, die Leukozytenpopulation und deren Zytokinproduktion im Gewebe untersucht. Eine histologische Untersuchung fand zu keinem Zeitpunkt statt.

Brummet et al.<sup>14</sup> untersuchten sowohl die anästhesierenden als auch die histopathologischen Auswirkungen von Dexmedetomidin auf perineural injiziertes Bupivacain. Dexmedetomidin ist wie Clonidin ein  $\alpha_2$ -Agonist. An Rattennerven wurden u. a. die durch perineurale Injektion von Bupivacain mit der durch perineuraler Injektion von Bupivacain & Dexmedetomidin verursachte Inflammation und der histologische Nervenschaden verglichen. Die perineurale Inflammation und die mikroskopische Nervenstruktur wurden histologisch nach 24 Stunden und nach 14 Tagen untersucht. Bei Vergleich der Bupivacain Gruppe mit der Bupivacain & Dexmedetomidin Gruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion der perineuralen Inflammation nach 24 Stunden, während nach 14 Tagen gruppenübergreifend keine Unterschiede in der Inflammation mehr festgestellt werden konnten. Von den Autoren wird analog zum Clonidin ebenfalls ein antiinflammatorischer Effekt von Dexmedetomidin über den  $\alpha_2$ -Rezeptor postuliert. Die mikroskopische Nervenstruktur war in allen Gruppen sowohl nach 24 Stunden als auch nach 14 Tagen intakt.

Beim Vergleich der Arbeit von Brummet et al. mit vorliegender Arbeit fällt v.a. die signifikant reduzierte perineurale Inflammation nach 24 Stunden bei Zugabe von Dexmedetomidin auf. Einschränkend ist jedoch zu erwähnen dass Brummet et al. Rattennerven verwendeten, statt Clonidin wurde Dexmedetomidin als  $\alpha_2$ -Agonist angewandt, die histologische Auswertung erfolgte nach 24 Stunden und 14 Tagen statt nach 48 Stunden und zur Bewertung der Inflammation wurde ein anderer Nerven-Trauma-Score verwendet als in vorliegender Studie. Zudem war die Arbeitshypothese bei Brummet et al. eine andere. Primär wollten Brummet et al. mit ihrer Arbeit nachweisen, dass hochdosiertes Dexmedetomidin in der Lage ist die durch Bupivacain induzierte Anlagesiezeit zu verlängern ohne dabei einen zusätzlichen Nervenschaden zu induzieren. Dexmedetomidin wurde daher vergleichsweise in höheren Dosen verwendet als Clonidin in vorliegender

Arbeit.

Memari et al.<sup>58</sup> wiederum konnten in einer histologischen Untersuchung an Ischiadicusnerven von Ratten nachweisen, dass Dexmedetomidin die durch perineural injiziertes Bupivacain ausgelöste Nerventraumatisierung 14 Tage nach Injektion abschwächen kann. Es zeigte sich bei perineuraler Injektion von Bupivacain & Dexmedetomidin im Vergleich zu alleiniger perineuraler Bupivacain Injektion 14 Tage nach Injektion eine signifikant reduzierte Inflammationsreaktion sowie eine höhere Dichte an myelinisierten Axonen pro Nerv. Auch hier wird die Vergleichbarkeit mit vorliegender Arbeit durch die Tatsachen eingeschränkt, dass Memari et al. die Untersuchung an Rattennerven durchführten, Dexmedetomidin statt Clonidin verwendeten, die histologische Auswertung erst nach 14 Tagen stattfand und die Bewertung von Inflammation und Nervenschäden durch andere Scores bzw. Kriterien erfolgte.

Werdehausen et al.<sup>95</sup> untersuchten In-Vitro an Ratten-Astrozyten und menschlichen Neuroblastomzellen die Neurotoxizität von Lidocain in Kombination mit verschiedenen Adjuvanzen (u. a. Clonidin). Die Adjuvanzen wurden in der Arbeit in bis zu 10-fach höherer Dosierung als klinisch üblich verwendet, um eine ausreichende Sicherheit postulieren zu können. Bei der Kombination von Lidocain mit Clonidin zeigte sich in beiden Zelllinien (Neuroblastomzellen und Astrozyten) keine erhöhte Rate an Apoptose. Dementsprechend postulierten die Autoren eine ausreichende Sicherheit für Clonidin in Kombination mit Lidocain bezogen auf die Apoptose an menschlichen Neuronen. Analog zeigten sich auch in vorliegender Arbeit keine Zeichen einer verstärkten Inflammation, wenn Clonidin als Adjuvanz zu Bupivacain verwendet wird.

Generell lassen sich In-vitro-Experimente nicht ohne weiteres auf In-vivo-Konstellationen übertragen. Der primäre Endpunkt bei Werdehausen et al. war die Apoptose, während dies bei vorliegender Arbeit die histologischen Nervenschäden waren. Zudem wurde bei Werdehausen et al. ein anderes Lokalanästhetikum in höherer Dosierung als in vorliegender Arbeit (Lidocain vs. Bupivacain) verwendet. Bupivacain besitzt eine höhere Neurotoxizität als Lidocain (vgl. Kapitel 1.3.2)<sup>70, 100</sup> jedoch deutet nach den Ergebnissen vorliegender Arbeit nichts daraufhin, dass Clonidin diese Toxizität noch

zusätzlich verstärkt.

Williams et al.<sup>97</sup> untersuchten ebenfalls die Auswirkungen von Adjuvanzen (u. a. Clonidin) auf die durch das Lokalanästhetikum Ropivacain induzierte Neurotoxizität in einem In-vitro-Modell. Verwendet wurden in besagter Arbeit sensorische Nervenkörper bestimmter Ratten, die einer Testlösung ausgesetzt wurden, deren Auswirkung nach 2 und nach 24 Stunden untersucht wurden. Hier zeigte sich beim Zusatz von Clonidin ein zum Teil widersprüchlicher Effekt. Wurde der Nerv zwei Stunden lang der Testlösung Clonidin & Ropivacain ausgesetzt, trat eine erhöhte Apoptoserate auf, die sich dann nach 24 Stunden wieder egalisierte. Auch wenn Clonidin mit anderen Substanzen wie Buprenorphin und Dexamethason kombiniert wurde, ließ sich nach 24 Stunden ebenfalls keine erhöhte Apoptoserate nachweisen. Es kann auch hier wiederum geschlussfolgert werden, dass Clonidin keine eigene Neurotoxizität aufweist bzw. die Neurotoxizität von Lokalanästhetika nicht verstärkt. Diese Tatsache deckt sich allen Einschränkungen in der Vergleichbarkeit beider Studien zum Trotz (In-vitro Rattenerven vs. In-vivo Schweinerven, Ropivacain vs. Bupivacain, Apoptose vs. histologischer Nervenschaden, höhere supraklinische vs. klinische Dosierung von Lokalanästhetikum und Adjuvanz) auch wieder mit den Ergebnissen aus vorliegender Arbeit. Hier zeigte die Zugabe von Clonidin zu Bupivacain keine erhöhte Nervenraumatisierung als die alleinige Injektion von Bupivacain.

Schon seit Jahrzehnten ist die schädliche Wirkung intraneural injizierter Lokalanästhetika bekannt<sup>84</sup>. Dies führte zur klinischen Praxis die Lokalanästhetika mit Hilfe von Nervenstimulation und Sonografie möglichst Nahe an den gewünschten Nerv zu platzieren, ohne das Epineurium jedoch zu perforieren<sup>65</sup>. In den letzten Jahren wurden zunehmend klinische Studien veröffentlicht, bei denen es selbst nach intraneuraler Injektion nicht zwingend zu bleibenden neurologischen Schäden kam<sup>8, 9, 75, 82</sup> und welche damit die jahrelang geltende Überzeugung, wonach intraneurale Injektionen zwingend zu vermeiden seien, herausfordern.

Auch Kapur et al.<sup>44</sup> und Hadzic et al.<sup>35</sup> belegten mit ihren Untersuchungen an Hunden, dass nicht jede intraneurale Injektion zu vergleichbaren Neuropathien führt. Hohe initiale Injektionsdrücke (>15 psi) bei intraneuraler Nadelposition deuten auf eine intrafaszikuläre Lage hin und waren mit deutlicheren



histologischen Schäden und verlängerten sensorischen sowie motorischen Defiziten (> 7 Tage) assoziiert. Während geringere Injektionsdrücke (<12 psi) bei intraneuraler Nadelposition auf eine extrafaszikuläre Lage hindeuten und geringere neurologische Defizite zur Folge hatten. Pathophysiologisch lässt sich dies durch die geringere Dehnungsfähigkeit der Perineuriums erklären, wodurch die Nervenfasern bei intrafaszikulärer Injektion stärker druckgeschädigt werden. (Vgl Kapitel 1.2.2)

In diesem Zusammenhang untersuchten Wiesmann et al.<sup>96</sup> in einem vergleichbaren Versuchsaufbau wie in vorliegender Arbeit die histologischen Nervenschäden bei intraneuraler Injektion von 2mL Bupivacain 0,5% verglichen mit intraneuraler Injektion von Ringerlösung. Es zeigte sich unabhängig von der injizierten Testlösung in beiden Gruppen eine milde Inflammation ohne signifikanten Unterschied in der histologischen Nervenraumatisierung ( $p=0,772$ ). Die Kollegen schlussfolgerten daraus, dass nur eine strikte Vermeidung der Nervenperforation eine Nervenschädigung verhindern kann. Dies deckt sich nur zum Teil mit den Ergebnissen aus vorliegender Arbeit. Hier zeigte sich beim Vergleich perineuraler mit intraneuraler Injektion der gleichen Testlösungen (z.B. ‚Bupivacain & Clonidin intraneural‘ vs. ‚Bupivacain & Clonidin perineural‘  $\rightarrow p=0,091$ ; oder ‚NaCl intraneural‘ vs. ‚NaCl perineural‘  $\rightarrow p=0,076$ ) kein signifikanter Unterschied im histologischen Nervenschaden. Dementsprechend kann die strikte Vermeidung der Nervenperforation zur Verhinderung von Nervenschäden nicht abschließend empfohlen. Die hier gefundenen Ergebnisse sollten jedoch nicht als Implikation für eine intraneurale Injektion bei peripheren Nervenblockaden dienen, vielmehr sollte es ein Anreiz sein die Thematik der intraneuralen Injektion und die daraus folgenden Neuropathien durch weitere Studien genauer zu untersuchen.

### **4.3 Limitationen**

Eine kritische Beurteilung des Versuchsaufbaus und der Methodik ist zur korrekten Beurteilung der Ergebnisse unabdingbar. Nachfolgend angesprochene Aspekte können die Aussagekraft der gefundenen Ergebnisse einschränken.

Der primäre Endpunkt dieser Arbeit war der histologische Nervenschaden. Mögliche klinische Symptome der histologisch gefundenen Schäden wurden nicht evaluiert. Somit kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob die hier gefundenen histologischen Schäden auch klinische Symptome verursachen und in welcher Form und Auswirkung diese miteinander korrelieren. Eine postinterventionelle neurophysiologische Untersuchung ist auf Grundlage des vorliegenden Modelles nicht möglich. Tierethische Bedenken schlossen ein Wiedererwachen nach den multiplen Injektionen und einer Überprüfung innerhalb eines definierten Zeitintervalls aus. Darüber hinaus sind neurologische Funktionstests bei Schweinen – ähnlich wie auch bei anderen Großtieren – im Gegensatz zu bestimmten Tests bei Nagetieren (Maus, Ratte) nicht validiert worden.

Tiermodelle bieten zudem immer nur bedingte Übertragbarkeit in Bezug auf die klinische Routine am Menschen. Das hier verwendete Schweinemodell bietet im Vergleich zu anderen Tiermodellen bezüglich des anatomischen Maßstabs und der Immunologie eine geeignete Voraussetzung für valide Daten<sup>91, 92</sup>. Jedoch ist nicht klar, ob die hier gefunden histologischen Veränderungen an gesunden, jungen Schweinen die Verhältnisse an mittelalten und alten Patienten mit z.T. präexistenten chronischen Nervenerkrankungen, wie z. B. Polyneuropathie im Rahmen eines Diabetes mellitus, adäquat widerspiegeln. Es ist davon auszugehen, dass Patienten mit Erkrankungen, die bei chronischem Verlauf zu Polyneuropathien führen, sensibler auf Nervenraumata im Rahmen einer Regionalanästhesie reagieren<sup>41</sup>.

Die Interventionen wurden an zuvor operativ freipräparierten Nerven des Plexus brachialis durchgeführt. Dieses Vorgehen sicherte auf der einen Seite die eindeutige Identifizierung der Nerven und auch, falls erforderlich, die eindeutige Unterscheidung zwischen peri- und intraneuraler Lage der Injektionsnadeln. Auf der anderen Seite ist diese Herangehensweise klinisch untypisch und eine operativ bedingte Nervenschädigung kann trotz sorgfältigen Vorgehens nicht völlig ausgeschlossen werden. Kontrolliert wurde ein möglicher operativer neuronaler Schaden mittels der Kontrollgruppe (‚Plexus brachialis ohne Intervention‘) und der Negativgruppe (‚N. tibialis ohne

Intervention'). Beide zeigten im Rahmen der Auswertung keine signifikanten histologischen Nervenschäden.

Für das zur präventiven Abdeckung verwendete Antibiotikum aus der Medikamentengruppe der Cephalosporin der 2. Generation (Cefuroxim) sind neurotoxische Nebeneffekte im zentralen Nervensystem beschrieben<sup>32, 47</sup>. Ein entsprechender Nebenwirkungshinweis ist von der Herstellungsfirma allerdings nicht veröffentlicht. Die Mediane der Negativgruppe („N. tibialis ohne Intervention“), mit der systemische Komplikationen des Versuchsaufbaus kontrolliert wurden, zeigten keine signifikanten histologischen Veränderungen an den untersuchten peripheren Nerven.

Bei der intraneuralen Injektion der Testlösungen wurden keine Messungen des Injektionsdrucks durchgeführt. Intraneurale Lage in Kombination mit hohen Injektionsdrücken (>15 psi) deuten auf eine intrafaszikuläre Nadelposition hin, welche mit höheren klinischen und histologischen Nervenschäden assoziiert sind<sup>35, 44</sup>. Der bei intraneuraler Injektion aufbrachte Druck stellt somit einen unabhängigen Risikofaktor für Nervenschäden dar und kann histologische Veränderungen in vorliegender Arbeit möglicherweise beeinflusst haben.

Die Einwirkdauer der verschiedenen Lösungen auf die Nerven wurde auf 48 Stunden festgelegt, da nach diesem Zeitintervall mit großer Wahrscheinlichkeit histologische Veränderungen<sup>21, 61, 62</sup> und klinische Beschwerden<sup>10</sup> zu erwarten sind. Gegen eine längere Versuchsdauer spricht das mit steigender Allgemeinanästhesiedauer sich erhöhende Risiko nosokomialer Infektionen durch die eingebrachten Katheter und die künstliche Beatmung. Eventuell nach kürzerer oder längerer Expositionsdauer auftretende oder sich verstärkende neuropathologische Veränderungen werden dementsprechend nicht detektiert.

Der zur Detektion des CD68-Antigens eingesetzte Antikörper war nicht spezifisch für Schweine evaluiert. Einige Untersuchungen legen zudem nahe, dass das CD68-Glykoprotein nicht nur auf Makrophagen, sondern auch auf anderen Zellen wie T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Tumorzellen exprimiert wird<sup>30, 37</sup>. Eine Verwechslung ist daher nicht auszuschließen.

#### **4.4 Ausblick und klinische Praxis**

In der vorliegenden Untersuchung zeigte sich keine signifikante Reduktion der durch intraneurale Bupivacain Injektion induzierten Neuroinflammation durch Clonidin, weswegen auch kein ausreichend antiinflammatorischer Effekt von Clonidin unter den hier durchgeführten Bedingungen postuliert werden kann. Weitere Studien werden benötigt, um das fragliche antiinflammatorische Potential von Clonidin auf die Neurotoxizität von Lokalanästhetika im Kontext peripherer Nervenblockaden genauer beschreiben zu können, etwa mit höheren Dosen und kürzeren bzw. längeren Einwirkzeiten. Zudem werden Studien zum klinisch-neurologischen Outcome notwendig sein, um bestimmten histologischen Veränderungen einer neurologische Symptomatik zuweisen zu können bzw. um zu erforschen, ob die Schwere der histologischen Veränderungen mit klinischen Symptomen korreliert. Durch weitere Studien in Zukunft wird darüber hinaus zu klären sein, welcher der beiden  $\alpha_2$ -Agonisten (Clonidin oder Dexmedetomidin) einen stärkeren antiinflammatorischen Effekt auf die durch Bupivacain induzierte Neurotoxizität besitzt und ob diese auch eine wirkliche klinische Relevanz (z.B. für Risikopatienten) hat.

Nicht jede intraneurale Injektion führt zu vergleichbaren histologischen Nervenraumata und klinisch relevanten neurologischen Dysfunktionen. Die derzeitige Studienlage deutet daraufhin, dass intraneural liegende Nadeln zusätzlich genauer unterteilt werden sollten in intra- bzw. extrafaszikulär. In zukünftigen Untersuchungen sollte das schädigende Potenzial je nach intraneuraler Lage genauer untersucht werden und weiterhin mit perineuralen Injektion verglichen werden um abschließend klären zu können welche Form der Applikation nervenschonender und effektiver ist.

Von besonderer klinischer Relevanz ist außerdem die Frage, wie sich Lokalanästhetika und Adjuvantien (z. B. Clonidin) bei Patienten mit bereits vorbestehenden Nervenerkrankungen wie diabetischer Polyneuropathie oder Multipler Sklerose auswirken. Wie bereits erwähnt, reagieren Patienten mit vorbestehenden Nervenerkrankungen sensibler gegenüber Nervenraumata und neigen daher vermehrt dazu, nach einer Regionalanästhesie Komplikationen zu entwickeln<sup>41</sup>.

## 5. Zusammenfassung

**Einleitung:** Sowohl intra- als auch perineurale Injektionen von Lokalanästhetika führen zu Inflammationsreaktionen im jeweiligen Nerven und sind daher einer der Hauptgründe für postinterventionelle neurologische Dysfunktionen. Während einer Regionalanästhesie werden regelmäßig Adjuvanzien eingesetzt, um die erforderliche Dosis an Lokalanästhetika zu reduzieren und deren Wirkdauer zu verlängern. Die Auswirkungen der eingesetzten Adjuvanzien auf diese Entzündungsreaktion sind bisher nicht ausreichend untersucht worden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Effekt von Clonidin auf die durch Bupivacain hervorgerufene Inflammationsreaktion zu untersuchen.

**Material und Methoden:** Mit Hilfe von insgesamt 13 vollanästhesierten Hausschweinen wurden 111 Nerven mit den Testlösungen aufbereitet. Die Nerven wurden 48 Stunden vor der Entnahme entweder mit NaCl, Bupivacain, oder Bupivacain & Clonidin perineural oder intraneural bearbeitet. Nach der Entnahme wurden die Nerven histologisch aufbereitet (HE-Färbung, CD68-Färbung und Klüver-Barrera-Färbung). Durch die folgende verblindete mikroskopische Analyse wurden den Nerven abhängig vom Grad ihrer traumabedingten Schädigung Score-Werte von 0 (keine Schädigung) bis 4 (starke Schädigung) zugeteilt.

**Ergebnisse:** Beim Vergleich der intraneuralen Injektion von Bupivacain mit der intraneuralen Injektion von Bupivacain & Clonidin konnte kein signifikanter Unterschied in der Nerventraumatisierung festgestellt werden ( $p=0,372$ ). Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied beim Vergleich der Injektionskompartimente (perineural vs. intraneural) miteinander. In der Interventionsgruppe „Bupivacain intraneural“ zeigte sich jedoch stets ein signifikant höherer Nervenschaden als in den negativen Kontrollgruppen (0,007 bzw. 0,008).

**Schlussfolgerung:** In der vorliegenden Studie konnte kein antiinflammatorischer Effekt von Clonidin auf die durch Bupivacain ausgelöste Entzündungsreaktion nach intraneuraler Injektion nachgewiesen werden. Ebenso zeigte sich kein Unterschied bzgl. der Lokalisation der Injektion. Intraneurale Injektionen führten nicht zu stärkeren histologischen Schäden.

## Summary

**Introduction:** The intraneural as well as perineural injection of local anesthetics can produce inflammation within the nerve. This fact is a key factor for neurological sequelae after regional anesthesia. Beside local anesthetics, there are other drugs which can be added to prolong the block time and reduce the total dose requirement of local anesthetics at the same time. One of these drugs is clonidine. The effect of clonidine on bupivacaine-induced inflammation has not been investigated to any great extent. The aim of this study was to investigate the modulating effect of clonidine on bupivacaine-induced inflammation.

**Material and methods:** In total, 13 pigs were used to perform the intraneural as well as perineural injection of the test solution of the intervention (bupivacaine, bupivacaine + clonidine) or negative control group (sodium chloride) into their axillary brachial nerves. After 48h of maintained general anesthesia, 111 nerves were excised, including those of the negative and positive control group, were histologically prepared and underwent blinded histological examination. All nerves were analyzed for signs of inflammation, intraneural hematoma and myelin damage and were categorized using a score ranging from 0 (no damage) to 4 (severe damage).

**Results:** The comparison between the intraneural injection of bupivacaine alone and the intraneural injection of bupivacaine and clonidine indicated no significant difference in histological damage ( $p=0,372$ ). Also the comparison between intraneural and perineural injection showed no significant difference. The intervention groups always indicated greater damage than the negative control group (e.g. ‚bupivacaine intraneural’ compared with ‚sodium chloride intraneural’  $p=0,007$ ).

**Conclusion:** This animal study revealed no neuroprotective effect of clonidine on bupivacaine-induced inflammation. Also there was no difference between intraneural and perineural injection. Intraneural injection does not lead to more peripheral nerve damage.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Allman K, Wilson I, O'Donnell A. Oxford Handbook of Anaesthesia; 4th Edition. New York: Oxford University Press 2016.
2. Andersen JH, Jaeger P, Sonne TL, et al. Clonidine used as a perineural adjuvant to ropivacaine, does not prolong the duration of sensory block when controlling for systemic effects: A paired, blinded, randomized trial in healthy volunteers. PLoS One. 2017;12(9):e0181351.
3. Auroy Y, Benhamou D, Bargues L, et al. Major complications of regional anesthesia in France: The SOS Regional Anesthesia Hotline Service. Anesthesiology. 2002;97(5):1274-1280.
4. Auroy Y, Narchi P, Messiah A, et al. Serious complications related to regional anesthesia: results of a prospective survey in France. Anesthesiology. 1997;87(3):479-486.
5. Bailard N, Ortiz J, Flores R. Additives to local anesthetics for peripheral nerve blocks: Evidence, limitations, and recommendations. Am J Health Syst Pharm. 2014;71(5):373-385.
6. Bartussek E, Fatehi S, Motsch J, et al. Survey on practice of regional anaesthesia in Germany, Austria, and Switzerland. Der Anästhesist. 2004;53(10):836-846.
7. Bear MF, Paradiso M, Connors BW. Neuroscience: Exploring the Brain, 4th Edition. Philadelphia: Wolster Kluwer 2015.
8. Bigeleisen PE. Nerve puncture and apparent intraneural injection during ultrasound-guided axillary block does not invariably result in neurologic injury. Anesthesiology. 2006;105:779-783.
9. Bigeleisen PE, Moayeri N, Groen GJ. Extraneural versus intraneural stimulation thresholds during ultrasound-guided supraclavicular block. Anesthesiology. 2009;110(6):1235-1243.
10. Borgeat A, Blumenthal S. Nerve injury and regional anaesthesia. Curr Opin Anaesthesiol. 2004;17(5):417-421.
11. Bouaziz H, Iohom G, Estebe JP, et al. Effects of levobupivacaine and ropivacaine on rat sciatic nerve blood flow. Br J Anaesth. 2005;95(5):696-700.
12. Bratthauer G. The avidin-biotin complex (ABC) method and other avidin-biotin binding methods. Methods Mol Biol. 1999;115:203-214.

13. Brull R, McCartney CJ, Chan VW, et al. Neurological complications after regional anesthesia: contemporary estimates of risk. *Anesth Analg.* 2007;104(4):965-974.
14. Brummett CM, Norat MA, Palmisano JM, et al. Perineural administration of dexmedetomidine in combination with bupivacaine enhances sensory and motor blockade in sciatic nerve block without inducing neurotoxicity in rat. *Anesthesiology.* 2008;109(3):502-511.
15. Butterworth JF, Strichartz GR. The alpha-2 -adrenergic agonists clonidine and guanfacine produce tonic and phasic block of conduction in rat sciatic nerve fibers. *Anesth Analg.* 1993;76(2):295-301.
16. Duma A, Urbanek B, Sitzwohl C, et al. Clonidine as an adjuvant to local anaesthetic axillary brachial plexus block: a randomized, controlled study. *Br J Anaesth.* 2005;94(1):112-116.
17. Eisenach JC, De Kock M, Klimscha W.  $\alpha$ 2-Adrenergic Agonists for Regional Anesthesia: A Clinical Review of Clonidine (1984-1995). *Anesthesiology.* 1996;85(3):655-674.
18. Eisenach JC, Detweiler D, Hood D. Hemodynamic and analgesic actions of epidurally administered clonidine. *Anesthesiology.* 1993;78(2):277-287.
19. Eisenach JC, DuPen S, Dubois M, et al. Epidural clonidine analgesia for intractable cancer pain. The Epidural Clonidine Study Group. *Pain.* 1995;61(3):391-399.
20. Eledjam JJ, Deschod J, Viel EJ, et al. Brachial plexus block with bupivacaine: effects of added alpha-adrenergic agonists: comparison between clonidine and epinephrine. *Can J Anaesth.* 1991;38:870-875.
21. Eliav E, Herzberg U, Ruda MA, et al. Neuropathic pain from an experimental neuritis of the rat sciatic nerve. *Pain.* 1999;83(2):169-182.
22. Erlanger J, Gasser H. *Electrical Signs of Nervous Activity*: University of Pennsylvania Press 1968.
23. Erne-Brand F, Jirounek P, Drewe J, et al. Mechanism of antinociceptive action of clonidine in nonmyelinated nerve fibres. *Eur J Pharmacol.* 1999;383(1):1-8.
24. Faccenda KA, Finucane BT. Complications of regional anaesthesia Incidence and prevention. *Drug Saf.* 2001;24(6):413-442.



25. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5(14):1317-1327.
26. Galli SJ, Nakae S, Tsai M. Mast cells in the development of adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2005;6(2):135-142.
27. Gaumann DM, Brunet PC, Jirounek P. Clonidine enhances the effects of lidocaine on C-fiber action potential. *Anesth Analg.* 1992;74(5):719-725.
28. Gaumann DM, Brunet PC, Jirounek P. Hyperpolarizing afterpotentials in C fibers and local anesthetic effects of clonidine and lidocaine. *Pharmacology.* 1994;48(1):21-29.
29. Gaumann DM, Forster A, Griessen M, et al. Comparison between clonidine and epinephrine admixture to lidocaine in brachial plexus block. *Anesth Analg.* 1992;75(1):69-74.
30. Gottfried E, Kunz-Schughart L, Weber A, et al. Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. *Scandinavian journal of immunology.* 2008;67(5):453-463.
31. Gray H. *Anatomy of the Human Body*: PHILADELPHIA: LEA & FEBIGER, 1918.
32. Grill M, Maganti R. Cephalosporin-induced neurotoxicity: clinical manifestations, potential pathogenic mechanisms, and the role of electroencephalographic monitoring. *Ann Pharmacother.* 2008;42(12):1843-1850.
33. Grosu I, Lavand'homme PM. Continuous regional anesthesia and inflammation: a new target. *Minerva Anesthesiol.* 2015;81(9):1001-1009.
34. Hadzic A. *Hadzic's Textbook of Regional Anesthesia and Acute Pain Management*, 2nd Edition. New York City: McGraw-Hill Higher Education 2017.
35. Hadzic A, Dilberovic F, Shah S, et al. Combination of intraneural injection and high injection pressure leads to fascicular injury and neurologic deficits in dogs. *Reg Anesth Pain Med.* 2005;29:417-423.
36. Hall JE. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*; 13th Edition. Jackson: Elsevier 2015.

37. Hameed A, Hruban R, Gage W, et al. Immunohistochemical expression of CD68 antigen in human peripheral blood T cells. *Human pathology*. 1994;25(9):872-876.
38. Hogan QH. Pathophysiology of Peripheral Nerve Injury During Regional Anesthesia. *Regional Anesthesia & Pain Medicine*. 2008;33(5):435-441.
39. Hunt C. Relation of function to diameter in afferent fibers of muscle nerves. *Journal of General Physiology*. 1954;38(1):117-131.
40. Jaiswal R, Bansal T, Mehta S, et al. A study to evaluate the effect of adding Clonidine to Ropivacaine for axillary plexus blockade. *Asian J Pharm Clin Res*. 2013;6:165-168.
41. Jeng CL, Torrillo TM, Rosenblatt MA. Complications of peripheral nerve blocks. *Br J Anaesth*. 2010;105 Suppl 1:i97-107.
42. Kalichman MW. Physiologic mechanisms by which local anesthetics may cause injury to nerve and spinal cord. *Reg Anesth*. 1993;18 (6Suppl):448-452.
43. Kalichman MW, Moorhouse DF, Powell HC, et al. Relative neural toxicity of local anesthetics. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1993;52(3):234-240.
44. Kapur E, Vuckovic I, Dilberovic F, et al. Neurologic and histologic outcome after intraneural injections of lidocaine in canine sciatic nerves. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2007;51(1):101-107.
45. Katzung BG. *Basic & Clinical Pharmacology*; 14th Edition. San Francisco: Mc-Graw-Hill Education 2017.
46. Kiefer R, Kieseier BC, Stoll G, et al. The role of macrophages in immune-mediated damage to the peripheral nervous system. *Prog Neurobiol*. 2001;64(2):109-127.
47. Kim KB, Kim SM, Park W, et al. Ceftiaxone-induced neurotoxicity: case report, pharmacokinetic considerations, and literature review. *J Korean Med Sci*. 2012;27(9):1120-1123.
48. Kirksey MA, Haskins SC, Cheng J, et al. Local Anesthetic Peripheral Nerve Block Adjuvants for Prolongation of Analgesia: A Systematic Qualitative Review. *PLoS One*. 2015;10(9):e0137312.

49. Klimscha W, Chiari A, Krafft P, et al. Hemodynamic and analgesic effects of clonidine added repetitively to continuous epidural and spinal blocks. *Anesth Analg*. 1995;80(2):322-327.
50. Knight JB, Schott NJ, Kentor ML, et al. Neurotoxicity of common peripheral nerve block adjuvants. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2015;28(5):598-604.
51. Koda H, Mizumura K. Sensitization to mechanical stimulation by inflammatory mediators and by mild burn in canine visceral nociceptors in vitro. *J Neurophysiol*. 2002;87(4):2043-2051.
52. Kroin JS, Buvanendran A, Beck DR, et al. Clonidine prolongation of lidocaine analgesia after sciatic nerve block in rats is mediated via the hyperpolarization-activated cation current, not by alpha-adrenoreceptors. *Anesthesiology*. 2004;101(2):488-494.
53. Lavand'homme P, Eisenach JC. perioperative administration of the alpha2-adrenoreceptor agonist clonidine at the site of nerve injury reduces the development of mechanical hypersensitivity and modulates local cytokine expression. *Pain*. 2003;105:247-254.
54. Lavand'homme PM, Ma W, De Kock M, et al. Perineural alpha(2A)-adrenoceptor activation inhibits spinal cord neuroplasticity and tactile allodynia after nerve injury. *Anesthesiology*. 2002;97(4):972-980.
55. Lee H, Jo EK, Choi SY, et al. Necrotic neuronal cells induce inflammatory Schwann cell activation via TLR2 and TLR3: implication in Wallerian degeneration. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;350(3):742-747.
56. Leskovaar A, Moriarty LJ, Turek JJ, et al. The macrophage in acute neural injury: changes in cell numbers over time and levels of cytokine production in mammalian central and peripheral nervous systems. *J Exp Biol*. 2000;203(Pt 12):1783-1795.
57. McCartney C, Duggan E, Apatu E. Should we add clonidine to local anesthetic for peripheral nerve blockade? A qualitative systematic review of the literature. *Reg Anesth Pain Med*. 2007;32(4):330-338.
58. Memari E, Hosseinian MA, Mirkheshti A, et al. Comparison of histopathological effects of perineural administration of bupivacaine and

- bupivacaine-dexmedetomidine in rat sciatic nerve. *Exp Toxicol Pathol.* 2016;68(10):559-564.
59. Mescher A. *Junqueiras Basic Histology, Text and Atlas.* New York City: McGraw-Hill Education 2016.
60. Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev.* 2006;51(2):240-264.
61. Mueller M, Leonhard C, Wacker K, et al. Macrophage response to peripheral nerve injury: the quantitative contribution of resident and hematogenous macrophages. *Lab Invest.* 2003;83(2):175-185.
62. Mueller M, Wacker K, Ringelstein EB, et al. Rapid response of identified resident endoneurial macrophages to nerve injury. *Am J Pathol.* 2001;159(6):2187-2197.
63. Murga G, Samsó E, Valles J, et al. The effect of clonidine on intra-operative requirements of fentanyl during combined epidural/general anaesthesia. *Anaesthesia.* 1994;49(11):999-1002.
64. Myers RR, Kalichman MW, Reisner LS, et al. Neurotoxicity of local anesthetics: altered perineurial permeability, edema, and nerve fiber injury. *Anesthesiology.* 1986;64(1):29-35.
65. Neal JM, Barrington MJ, Brull R, et al. The Second ASRA Practice Advisory on Neurologic Complications Associated With Regional Anesthesia and Pain Medicine: Executive Summary 2015. *Reg Anesth Pain Med.* 2015;40(5):401-430.
66. Nickel R, Schummer A, Seiferle E. *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere. Band 4. Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen.* Stuttgart: Parey 2004.
67. Nishikawa T, Dohi S. Clinical evaluation of clonidine added to lidocaine solution for epidural anesthesia. *Anesthesiology.* 1990;73(5):853-859.
68. Olsson Y. Degranulation of mast cells in peripheral nerve injuries. *Acta Neurol Scand.* 1967;43(3):365-374.
69. Pancaro C, Ma W, Vincler M, et al. Clonidine-induced neuronal activation in the spinal cord is altered after peripheral nerve injury. *Anesthesiology.* 2003;98(3):748-753.

70. Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, et al. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. *Anesth Analg*. 2009;108(3):997-1007.
71. Pollock JE. Neurotoxicity of intrathecal local anaesthetics and transient neurological symptoms. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2003;17(3):471-484.
72. Pöpping DM, Elia N, Marret E, et al. Clonidine as an Adjuvant to Local Anesthetics for Peripheral Nerve and Plexus Blocks: A Meta-analysis of Randomized Trials. *Anesthesiology*. 2009;111(2):406-415.
73. Reddy SV, Maderdrut JL, Yaksh TL. Spinal cord pharmacology of adrenergic agonist-mediated antinociception. *J Pharmacol Exp Ther*. 1980;213(3):525-533.
74. Reimers H. Der Plexus Brachialis der Haussäugetiere. *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte*. 1925;76(6):653-753.
75. Robards C, Hadzic A, Somasundaram L, et al. Intraneural injection with low-current stimulation during popliteal sciatic nerve block. *Anesth Analg*. 2009;109(2):673-677.
76. Rodrigo A, Aghajanian GK. Opiate- and alpha2 -adrenoceptor-induced hyperpolarizations of locus ceruleus neurons in brain slices. *J Neurosci*. 1985;5(9):2359-2364.
77. Romero-Sandoval EA, Eisenach JC. Clonidine reduces hypersensitivity and alters the balance of pro- and anti-inflammatory leukocytes after local injection at the site of inflammatory neuritis. *Brain Behav Immun* 2007;21(5):569-580.
78. Romero-Sandoval EA, Eisenach JC. Perineural clonidine reduces mechanical hypersensitivity and cytokine production in established nerve injury. *Anesthesiology*. 2006;104(2):351-355.
79. Romero-Sandoval EA, McCall C, Eisenach JC. Alpha2-adrenoceptor stimulation transforms immune responses in neuritis and blocks neuritis-induced pain. *J Neurosci*. 2005;25(39):8988-8994.
80. Ross MH, Wojciech P. *Histology: A Text and Atlas, With Correlated Cell and Molecular Biology*. 7th Edition. Philadelphia: Wolsters Kluwer 2015.

81. Ruetsch YA, Böni T, Borgeat A. From cocaine to ropivacaine: the history of local anesthetic drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2001;1(3):175-182.
82. Russon K, Blanco R. Accidental intraneural injection into the musculocutaneous nerve visualized with ultrasound. *Anesth Analg*. 2007;105:1504-1505.
83. Selander D. Neurotoxicity of local anesthetics: animal data. *Reg Anesth*. 1993;18(6 Suppl):461-468.
84. Selander D, Brattsand R, Lundborg G, et al. Local anesthetics: importance of mode of application, concentration and adrenaline for the appearance of nerve lesions. An experimental study of axonal degeneration and barrier damage after intrafascicular injection or topical application of bupivacaine. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1979;23(2):127-136.
85. Singelyn FJ, Gouverneur JM, Robert A. A minimum dose of clonidine added to mepivacaine prolongs the duration of anesthesia and analgesia after axillary brachial plexus block. *Anesth Analg*. 1996;83(5):1046-1050.
86. Stähle H. A historical perspective: development of clonidine. *Best Pract & Res Clin Anaesthesiol*. 2000;14(2):237-246.
87. Standering S. *Gray's Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice*. 41st Edition. Oxford: Elsevier Ltd, Oxford 2015.
88. Steinfeldt T. Nerve injury due to peripheral nerve blocks: Pathophysiology and aetiology. *AINS*. 2012;47 (5):328-333.
89. Steinfeldt T, Graf J, Vassiliou T, et al. Systematic evaluation of the highest current threshold for regional anaesthesia in a porcine model. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2010;54(6):770-776.
90. Steinfeldt T, Nimphius W, Werner T, et al. Nerve injury by needle nerve perforation in regional anaesthesia: does size matter? *Br J Anaesth*. 2010;104(2):245-253.
91. Swindle MM, Makin A, Herron AJ, et al. Swine as models in biomedical research and toxicology testing. *Veterinary Pathology* 2012;49(4):344-356.

92. Swindle MM, Smith AC, Hepburn BJ. Swine as models in experimental surgery. *J Invest Surgery*. 1988;1(1):65-79.
93. Tamsen A, Gordh T. Epidural clonidine produces analgesia. *Lancet*. 1984;2(8396):231-232.
94. Werdehausen R, Fazeli S, Braun S, et al. Apoptosis induction by different local anaesthetics in a neuroblastoma cell line. *Br J Anaesth*. 2009;103(5):711-718.
95. Werdehausen R., Braun S., Hermanns H., et al. The Influence of Adjuvants Used in Regional Anesthesia on Lidocaine-Induced Neurotoxicity In Vitro. *Regional Anesthesia & Pain Medicine*. 2011;36(5):436-443.
96. Wiesmann T, Steinfeldt T, Exner M, et al. Intraneural injection of a test dose of local anesthetic in peripheral nerves – does it induce histological changes in nerve tissues? *Acta Anaesthesiol Scand*. 2017;61(1):91-98.
97. Williams BA, Hough KA, Tsui BY, et al. Neurotoxicity of adjuvants used in perineural anesthesia and analgesia in comparison with ropivacaine. *Reg Anesth Pain Med*. 2011;36(3):225-230.
98. Wolfe JW, Butterworth JF. Local anesthetic systemic toxicity: update on mechanisms and treatment. *Curr Opin Anaesthesiol*. 2011;24(5):561-566.
99. Yaksh TL, Pogrel JW, Lee YW, et al. Reversal of nerve ligation-induced allodynia by spinal alpha-2 adrenoceptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995;272(1):207-214.
100. Yang S, Abrahams MS, Hurn PD, et al. Local anesthetic Schwann cell toxicity is time and concentration dependent. *Reg Anesth Pain Med*. 2011;36(5):444-451.
101. Zaric D, Pace NL. Transient neurologic symptoms (TNS) following spinal anaesthesia with lidocaine versus other local anaesthetics. *Cochrane Database of systematic review*. 2009;15(2):CD003006.

## 7. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

### 7.1 Tabellenverzeichnis

TABELLE 1	FASCICULI UND DIE DAZUGEHÖRIGEN NERVEN DER OBEREN EXTREMITÄT AUS <sup>87</sup> .....	9
TABELLE 2	EINTEILUNG DER NERVENFASERN NACH ERLANGER/GASSER UND LOYD/HUNT, MODIFIZIERT NACH <sup>7</sup> .....	11
TABELLE 3	EINTEILUNG DER NERVEN NACH ERLANGER/GASSER UND DEREN EMPFINDLICHKEIT GEGENÜBER LOKALANÄSTHETIKA (LA), MODIFIZIERT NACH <sup>7, 34, 45</sup> .....	16
TABELLE 4	HAUPTGRUPPEN DER LOKALANÄSTHETIKA UND DEREN VERTRETER, MODIFIZIERT NACH <sup>34</sup> .....	18
TABELLE 5	INTERVENTIONSGRUPPEN.....	34
TABELLE 6	KONTROLLGRUPPEN .....	34
TABELLE 7	HE-FÄRBESCHEMA DES INSTITUTES FÜR PATHOLOGIE DER PHILIPPS UNIVERSITÄT MARBURG.....	36
TABELLE 8	KLÜVER-BARRERA-FÄRBESCHEMA DES INSTITUTES FÜR NEUROPATHOLOGIE DER PHILIPPS UNIVERSITÄT MARBURG .....	38
TABELLE 9	IMMUNHISTOCHEMIE-FÄRBESCHEMA DES INSTITUTES FÜR PATHOLOGIE DER PHILIPPS UNIVERSITÄT MARBURG .....	40
TABELLE 10	HISTOLOGISCHER TRAUMA-SCORE AUS <sup>90</sup> .....	41
TABELLE 11	ANZAHL DER NERVEN BEZOGEN AUF DIE JEWEILIGEN GRUPPEN .....	44
TABELLE 12	LEUKOZYTEN- UND HÄMATOMVERTEILUNG, AUFGETEILT NACH DEN JEWEILIGEN GRUPPEN .....	46
TABELLE 13	MYELINSCHÄDEN IN DEN JEWEILIGEN GRUPPEN .....	49
TABELLE 14	PROZENTUALER ANTEIL CD68-POSITIVER ZELLEN ZUR GESAMTLEUKOZYTENZAHLE, AUFGETEILT NACH GRUPPEN .....	52
TABELLE 15	MEDIANE SCORE-WERTE DER EINZELNEN GRUPPEN.....	56
TABELLE 16	DESKRIPTIVE STATISTIK.....	57
TABELLE 17	ÜBERBLICK ÜBER DIE DURCHGEFÜHRTE VERGLEICHE .....	59



## 7.2 Abbildungsverzeichnis:

ABBILDUNG 1	PLEXUS BRACHIALIS DES MENSCHEN AUS <sup>31</sup> .....	9
ABBILDUNG 2	EINTEILUNG DER NERVENFASERN NACH ERLANGER/GASSER BZW. LOYD/HUNT AUS <sup>7</sup> .....	11
ABBILDUNG 3	AUFBAU EINES PERIPHEREN NERVENS, HE-FÄRBUNG, 100-FACHE VERGRÖßERUNG.....	13
ABBILDUNG 4	PLEXUS BRACHIALIS EINES HAUSSCHWEINES MODIFIZIERT NACH <sup>66</sup> ...	15
ABBILDUNG 5	HAUPTGRUPPEN DER LOKALANÄSTHETIKA AUS <sup>45</sup> .....	17
ABBILDUNG 6	OP-SITUS, PLEXUS BRACHIALIS EINES VERUSCHSCHWEINES .....	33
ABBILDUNG 7	HE-FÄRBUNG; PERIPHERER NERV (GRUPPE: BUPIVACAIN + CLONIDIN INTRANEURAL), 100-FACHE VERGRÖßERUNG .....	47
ABBILDUNG 8	HE-FÄRBUNG; N. TIBIALIS MIT LEUKOZYTENAKKUMULATION UND EINBLUTUNG (GRUPPE: LIGATUR), 40-FACHE VERGRÖßERUNG .....	48
ABBILDUNG 9	KLÜVER-BARRERA-FÄRBUNG; N. TIBIALIS MIT MYELINSCHADEN, LEUKOZYTENAKKUMULATION UND EINBLUTUNG (GRUPPE: LIGATUR), 100-FACHE VERGRÖßERUNG .....	50
ABBILDUNG 10	KLÜVER-BARRERA-FÄRBUNG; N. TIBIALIS MIT MYELINSCHADEN, LEUKOZYTENAKKUMULATION UND EINBLUTUNG (GRUPPE: LIGATUR), 200-FACHE VERGRÖßERUNG .....	51
ABBILDUNG 11	CD68-IMMUNHISTOCHEMISCHE-FÄRBUNG, N. TIBIALIS MIT MAKROPHAGENANSAMMLUNG (GRUPPE: LIGATUR), 100-FACHE VERGRÖßERUNG .....	53
ABBILDUNG 12	CD68-IMMUNHISTOCHEMISCHE-FÄRBUNG; N. TIBIALIS MIT MAKROPHAGENANSAMMLUNG (GRUPPE LIGATUR), 400-FACHE VERGRÖßERUNG .....	54
ABBILDUNG 13	MEDIANE SCORE-WERTE DER EINZELNEN GRUPPEN .....	56

Die Abbildungen 1,2 und 4 wurden mit offizieller Genehmigung der jeweiligen Verlage verwendet

## 8. Abkürzungsverzeichnis

ABC	Avidin Biotin Complex
AP	Aktionspotential
C	cervikal
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
d	Tag
Fa.	Firma
Fc	crystallisable fragment
FiO <sub>2</sub>	inspiratorische Sauerstofffraktion
h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	horseradish peroxidase
I:E	Inspiration : Expiration
IF	Interferon
IL	Interleukin
i. m.	intramuskulär
IQR	interquartile range - Interquartilabstand
i. v.	intravenös
K <sup>+</sup>	Kalium
KB	Klüver-Barrera
kD	Kilodalton
kgKG	Kilogramm Körpergewicht
LA	Lokalanästhetika / Lokalanästhetikum
M.	Musculus
mbar	Millibar
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
Min	Minute
ml	Milliliter
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
ms	Millisekunden
mV	Millivolt

µg	Mikrogramm
N.	Nervus
n	Anzahl der Merkmalsausprägungen
NaCl	Natriumchlorid-Lösung 0,9%ig
Na <sup>+</sup>	Natrium
NET	neutrophil extracellular traps
NGF	Nerve Growth Factor
P.	Plexus
PDA	Periduralanästhesie
PBS	Phosphate-Buffered-Saline
PEEP	Positive end-expiratory pressure
pH	pondus hydrogeni
PNS	Peripheres Nervensystem
psi	pound-force per square inch
PSNL	partial sciatic nerve ligation
s	Sekunde
SD	standard deviation / Standardabweichung
Sek	Sekunde
Std	Stunde
t	Zeit
TBS	Tris-Puffer
Th	thorakal
TIVA	total intravenöse Anästhesie
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor Alpha
TNS	transiente neurologische Symptome
TRIS	Trishydroxymethylaminoethan
ZNS	Zentrales Nervensystem

## **9. Verzeichnis akademischer Lehrer**

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren:

Barth, Bartsch, Bauer, Baum, Becker, Bein, Bien, Buerke, Daut, Dodel, Donner-Banzhoff, Eberhart, Engelhart-Cabilic, Fendrich, Fuchs-Winkelmann, Gress, Grosse, Hertl, Höffken, Hofmann, Hoyer, Jerrentrup, Kamp-Becker, Kann, Kinscherf, Kircher, Klose, Koolmann, Kruse, Lill, Lohoff, Mahnken, Maier, Maisch, Moll, Moosdorf, Mutters, Mueller, Oertel, Oliver, Neubauer, Nimphius, Nimsky, Pagenstecher, Renz, Röhm, Ruchholtz, Schäfer, Schiefer, Schmeck, Schratt, Sekundo, Steinfeldt, Teymoortash, Thieme, Vogelmeier, Vogt, Wagner, Weihe, Werner, Wulf, Zemlin

## 10. Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Steinfeldt und Herrn PD Dr. med. Thomas Wiesmann für die Entwicklung und Organisation des Versuchsaufbaus, sowie für die Bereitstellung der notwendigen Infrastruktur. Ohne diese Voraussetzungen vorliegende Arbeit nicht möglich gewesen wären. Einen zusätzlichen und besonderen Dank möchte ich nochmals Herrn Herrn PD Dr. med. Thomas Wiesmann aussprechen, für seine geduldige, unerschütterliche Hilfe und zielführende Kritik sowohl während der Versuchsdurchführung, als auch während der langen Phasen der schriftlichen Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin gebührt ein großer Dank Herrn Andreas Gockel für seine fachlich-praktische Expertise und aufmunternde Art während der praktischen Versuchsdurchführung.

Ein weiterer Dank geht an meinen geschätzten Freund und Kollegen Herrn Christian Hackbarth für seine ordentliche, vorbildliche und verlässliche Arbeitsweise und sowie seiner angenehmen zwischenmenschlichen Art.

Zu guter Letzt möchte ich noch meinen Eltern, meinem Bruder, meinem Freund Daniel, seiner Freundin Nina und meiner Freundin Alexandra danken auf deren volle Unterstützung ich mich jederzeit verlassen konnte und deren hilfsbereite, unterstützende Art die Verfassung dieser Dissertation beflügelt haben.