

AUS DER KLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE

*Direktor: Prof. Dr. Bernhard M. Graf, MSc.*

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

SYSTEMATISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR MODULATION DER  
MYOTOXIZITÄT VON BUPIVACAIN IN-VITRO

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

*Sarah Luisa Lentner*

2018



*AUS DER KLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE*

*Direktor: Prof. Dr. Bernhard M. Graf, MSc.*

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN  
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

*SYSTEMATISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUR MODULATION DER  
MYOTOXIZITÄT VON BUPIVACAIN IN-VITRO*

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades

*der Medizin*

der  
Fakultät für Medizin  
der Universität Regensburg

vorgelegt von

*Sarah Luisa Lentner*

2018

**Dekan:**

**Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert**

1. Berichterstatter:

*PD Dr. Thomas Metterlein*

2. Berichterstatter:

*Prof. Dr. Jürgen Schlaier*

Tag der mündlichen Prüfung:

13.03.2018

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1. Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1. Mechanismen der Myotoxizität	7
1.2. Zelllinien	8
1.3. Getestete Substanzen	9
1.4. Zielsetzung	12
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1. Material	13
2.1.1. Zellkulturen	13
2.1.2. Chemikalien und Biochemikalien	13
2.2. Methoden	18
2.2.1. Sterilisation von Materialien und Lösungen	18
2.2.2. Isolation, Splitten und Kultivierung von primären Mausmuskelzellen	18
2.2.3. Splitten und Kultivierung von C2C12-Zellen	19
2.2.4. Splitten und Kultivierung von A-673-Zellen	20
2.2.5. Versuchsaufbau	20
2.2.6. Durchflusszytometrie	28
2.2.7. Auswertung	28
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>30</b>
3.1. Primäre Mausmuskelzellen	30
3.1.1. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und ACC	30
3.1.2. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und Atorvastatin	31
3.1.3. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und BAPTA/AM	34
3.1.4. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und Dantrolen	35

3.1.5. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und EPO	37
3.1.6. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und Fenoterol	41
3.1.7. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und Mannitol	43
3.2. C2C12-Zellen	45
3.2.1. C2C12-Zellen mit Bupivacain und ACC	45
3.2.2. C2C12-Zellen mit Bupivacain und Atorvastatin	45
3.2.3. C2C12-Zellen mit Bupivacain und BAPTA/AM	48
3.2.4. C2C12-Zellen mit Bupivacain und Dantrolen	50
3.2.5. C2C12-Zellen mit Bupivacain und EPO	51
3.2.6. C2C12-Zellen mit Bupivacain und Fenoterol	53
3.2.7. C2C12-Zellen mit Bupivacain und Mannitol	54
3.3. A673-Zellen	55
3.3.1. A673-Zellen mit Bupivacain und ACC	55
3.3.2. A673-Zellen mit Bupivacain und Atorvastatin	56
3.3.3. A673-Zellen mit Bupivacain und BAPTA/AM	59
3.3.4. A673-Zellen mit Bupivacain und Dantrolen	60
3.3.5. A673-Zellen mit Bupivacain und EPO	60
3.3.6. A673-Zellen mit Bupivacain und Fenoterol	62
3.3.7. A673-Zellen mit Bupivacain und Mannitol	63
<b>4. Diskussion</b>	<b>64</b>
4.1. Verwertbarkeit des Zellmodells	64
4.2. Reaktion der Zellen auf Bupivacain	67
4.3. Reaktion der Zellen auf ACC	68
4.4. Reaktion der Zellen auf Atorvastatin	69
4.5. Reaktion der Zellen auf BAPTA/AM	70
4.6. Reaktion der Zellen auf Dantrolen	71

4.7. Reaktion der Zellen auf Erythropoetin	72
4.8. Reaktion der Zellen auf Fenoterol	74
4.9. Reaktion der Zellen auf Mannitol	75
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>76</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>83</b>
7.1. Tabellenverzeichnis	83
7.2. Abbildungsverzeichnis	84
7.3. Abkürzungsverzeichnis	88
<b>8. Danksagung</b>	
<b>9. Lebenslauf</b>	

## 1. Einleitung

Nach der Beschreibung der Myotoxizität von Lokalanästhetika durch Brun im Jahre 1959 [5] gilt es nach weiteren Studien als gesichert, dass alle Lokalanästhetika mytoxisches Potential besitzen [4]. So kommt es bei Injektion von Lokalanästhetika in klinisch relevanten Dosen zu Schädigungen der Skelettmuskulatur in unterschiedlichem Ausmaß [43]. Von klinischer Relevanz scheint diese Nebenwirkung in erster Linie bei Retrobulbärblockaden zu sein, wonach es zu persistierenden Doppelbildern durch Schädigung der äußeren Augenmuskeln kommen kann [12]. Weitere klinisch relevante Komplikationen der Lokal- und Regionalanästhesie, welche auf die Myotoxizität des Anästhetikums zurückzuführen sind, werden wahrscheinlich in den meisten Fällen nicht als solche erkannt und bleiben daher weitestgehend undokumentiert. Außerdem erwiesen sich die Satellitenzellen als resistent gegenüber dem mytoxischen Einfluss von Lokalanästhetika und lassen somit eine Regeneration der Muskulatur zu [42].

Es zeigte sich, dass Bupivacain das Lokalanästhetikum mit dem größten mytoxischen Potential ist [10] und das Ausmaß der Schädigung mit steigender Konzentration des Lokalanästhetikums und steigender Expositionszeit zunimmt [13].

Die Aufklärung des Mechanismus, durch welchen Lokalanästhetika in Myozyten den Zelltod einleiten, war in jüngerer Zeit Gegenstand diverser experimenteller und tierexperimenteller Studien. Diese Studien zeigten, dass sowohl primäre Mausmuskelzellen, immortalisierte Mausmuskelzellen (C2C12-Zellen) als auch humane Rhabdomyosarkomzellen (A673-Zellen) in-vitro durch Lokalanästhetika, vor allem Bupivacain, in klinisch relevanten Dosierungen geschädigt werden können [23] [13]. In tierexperimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sich nach Injektion von Lokalanästhetika in die Muskulatur zunächst ein Ödem als Ausdruck der diffundierenden Lösung bildete. Wenige Minuten später waren bereits hyperkontrahierte Myozyten zu sehen und im Anschluss intrazelluläre Destruktionsvorgänge wie lytische Degeneration des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) und der Mitochondrien. Zudem sind pyknotisch veränderte Nuklei mit kondensiertem Chromatin, welche in das Zentrum der geschädigten Muskelfaser wandern zu beobachten. Das Sarkolemm bleibt dabei über einen langen Zeitraum morphologisch intakt [43].



## 1.1. Mechanismen der Myotoxizität

Bisher konnte der exakte Mechanismus, welcher für die Myotoxizität der Lokalanästhetika verantwortlich ist nicht festgestellt werden, vielmehr existieren mehrere gleichwertige Theorien.

Ein vermuteter Mechanismus ist die durch Lokalanästhetika induzierte Freisetzung von Kalzium-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über den spezifischen Ryanodin Rezeptor, eine unspezifische Permeabilitätserhöhung der Membran des SR für Kalzium-Ionen [19] und eine veränderte Wiederaufnahme von Kalzium-Ionen in das SR durch Blockade der sarkoplasmatischen Kalzium ATPase (SERCA). Diese erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration führt zum erhöhten Energieverbrauch der Zelle, wodurch ein Ungleichgewicht zwischen Energiebedarf und –angebot entsteht, was schließlich zum Untergang der Zelle führt. Außerdem kann eine dauerhaft moderate Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration die Apoptose über mitochondriale Signalwege einleiten [31] [41].

Eine weitere Theorie weshalb Lokalanästhetika eine myotoxische Wirkung aufweisen ist durch SR-Stress eingeleitete Apoptose über die vermehrte Bildung von reactive oxygene species (ROS). ROS verändern intrazelluläre Redoxreaktionen und interferieren mit Disulfidbindungen, wodurch es zu veränderten Proteinfaltungen kommt. Diese fehlgefalteten Proteine stören die Funktion des SR und akkumulieren im Lumen des SR, was zu SR-Stress und somit zur Apoptose führt. Wie Bupivacain jedoch die Produktion von ROS steigert ist weiterhin ungeklärt [11].

In anderen Studien wurde festgestellt, dass die Myotoxizität von Bupivacain mitbedingt ist durch die Inhibition des mitochondrialen Energiestoffwechsels [15, 39]. Viele in-vitro Studien zeigten den Effekt von Bupivacain und Lidocain auf die Aktivität der Atmungskette und auf die Kopplung der oxidativen Phosphorylation in isolierten Mitochondrien [17]. Es wird vermutet, dass Bupivacain mit der F1F0 ATP-Synthase und Atmungskettenkomplexen interagieren und so Ihre Aktivität vermindern kann.

Zudem kommt es zu einer strukturellen Veränderung des Mitochondriums bei Kontakt mit Bupivacain. Die typische mitochondriale Cristae-Formation geht verloren und es zeigt sich eine zwiebelschalenartige Konfiguration, welche mit einer abnormalen F1F0-Oligomerisation in Verbindung gebracht wird [29]. Ein weiteres Ergebnis dieser Studie war, dass sich bei Exposition der humanen Skelettmuskelmyoblasten mit Bupivacain das Membranpotential der Mitochondrien verminderte, bis hin zur vollständigen Depolarisation bei hohen Bupivacain-Dosen [26].

## **1.2. Zelllinien**

In dieser Arbeit wurden einerseits primäre Mausmuskelzellen untersucht, welche aus Wildtyp-Mäusen isoliert, kultiviert und zu Myofibrillen differenziert wurden. Diese Zellen verfügen über einen großen intrazellulären Kalziumspeicher in Form des sarkoplasmatischen Retikulums, Mitochondrien und nach Differenzierung über einen kontraktilen Apparat. Zudem besitzen die primären Mausmuskelzellen keine Mechanismen Apoptose zu umgehen.

Eine weitere getestete Zellreihe waren C2C12-Mausmuskelzellen. Hierbei handelt es sich um eine erworbene Zelllinie, welche sich prinzipiell verhält wie primäre Mausmuskelzellen, jedoch deutlich weniger empfindlich gegenüber apoptotischen Einflüssen ist und somit lange in Kultur gehalten werden kann. Auch diese Zellen können zu Myofibrillen mit kontraktilen Apparat und sarkoplasmatischen Retikulum differenziert werden.

Bei der dritten Zellreihe dieser Arbeit handelt es sich um humane A673-Rhabdomyosarkomzellen. Diese Zellen sind so weit entdifferenziert, dass sie über keine großen intrazellulären Kalziumspeicher verfügen. Es kann auch keine Differenzierung zu Myofibrillen mit kontraktilen Apparat erfolgen. Durch die schnelle Zellteilung haben diese Zellen einen erhöhten Energiebedarf, wodurch eine Veränderung der mitochondrialen Funktion schnell zu einem Ungleichgewicht von Energiebedarf und -angebot führen kann.

### 1.3. Getestete Substanzen

Bezogen auf die in der Literatur diskutierten Mechanismen der Myotoxizität von Bupivacain und anderen Lokalanästhetika wurden in dieser Studie mehrere Substanzen getestet, welche auf die Auswirkungen durch die oben genannten Mechanismen Einfluss nehmen können.

Auf die durch Kalzium-Ionen vermittelten Effekte können Dantrolen und BAPTA/AM theoretisch durch die verminderte zytosolische Kalzium-Konzentration einen Effekt haben.

Bereits in einigen Studien konnte ein zytoprotektiver Effekt von Dantrolen auf Muskelzellen, welche mit Bupivacain inkubiert wurden gezeigt werden. Dantrolen reduziert die Freisetzung von Kalzium-Ionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum der quergestreiften Muskelzellen [14]. Durch die so reduzierte intrazelluläre Kalzium-Konzentration ist ein protektiver Effekt von Dantrolen auf mit Bupivacain behandelte Muskelzellen denkbar.

Mit 1,2-Bis (2-aminophenoxy) ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethylester) (BAPTA/AM) existiert ein Kalziumchelator welcher zellgängig ist. [40] Durch die Komplexbindung der durch Bupivacain erhöhten Konzentration an Kalzium-Ionen könnte BAPTA/AM einen protektiven Einfluss auf mit Bupivacain behandelte Muskelzellen haben.

Eine weitere Stoffklasse, welche eine myotoxische Wirkung besitzt sind Statine. Die muskulären Nebenwirkungen der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer reichen von Myalgien bis hin zur Rhabdomyolyse [7]. Statine scheinen einerseits einen direkten Effekt auf die mitochondriale Atmungskette zu haben, wodurch es zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Kalzium-Ionen kommt. Auch ein direkter Effekt auf das sarkoplasmatische Retikulum (SR) konnte noch nicht ausgeschlossen werden, wodurch sich ebenfalls die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen kann. Diese beiden Effekte könnten für die Apoptose, oxidativen Stress und Untergang von Muskelzellen verantwortlich sein [37]. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob sich bei einer zeitgleichen Inkubation von drei Muskelzellreihen mit

Bupivacain und dem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Atorvastatin die myotoxischen Effekte der beiden Substanzen addieren.

Der diskutierte Mechanismus, bei welchem die Apoptose durch SR-Stress durch die vermehrte Bildung von ROS nach Exposition mit Bupivacain eingeleitet wird, kann möglicherweise durch ACC vermindert werden, da bereits gezeigt werden konnte, dass das antioxidative Medikament N-Acetylcystein (ACC) die durch ROS ausgelöste Expression von CHOP und aktivierten Caspasen in Myozyten, welche gleichzeitig mit Bupivacain inkubiert wurden, vermindert [11]. Zudem zeigte sich in einer anderen Studie, dass ACC den wachstumshemmenden Effekt von Bupivacain auf L6 Myoblasten (Ratten-Muskelzellen) aufhebt [18].

Die Störung der mitochondrialen Atmungskette durch Bupivacain ist potentiell durch den Erythropoese-Wachstumsfaktor Erythropoetin beeinflussbar. Auch Muskelzellen exprimieren einen funktionellen EPO-Rezeptor.

Im Zellmodell wurde bereits festgestellt, dass Erythropoetin (EPO) Myoblasten vor hypoxie-induzierte Apoptose schützen kann [16]. Weiterhin konnte bereits gezeigt werden, dass eine Behandlung mit Erythropoetin (EPO) das mitochondriale Membranpotential stabil hält und die Fragmentation des mitochondrialen Netzwerks und die Einleitung der Apoptose verzögern könnte. Somit kann EPO, in höheren Dosen als bei der Therapie der Anämie, einen protektiven Effekt auf die Myotoxizität von Bupivacain und anderen Lokalanästhetika haben [26].

Es konnte außerdem gezeigt werden, dass  $\beta$ 2-Adrenorezeptoragonisten einen anabolen Effekt auf Skelettmuskelzellen haben [8]. Der Beta2-Agonist Fenoterol beschleunigt nach experimenteller myotoxischer Verletzung eines Muskels mit Bupivacain in-vivo die Regeneration der Muskulatur. Die systemisch mit Fenoterol behandelten Versuchstiere zeigten nach Verletzung einen schnelleren Wiederanstieg der Muskelmasse und auch des Gesamtproteingehalts im verletzten Muskel. Zudem zeigte sich im sich in Regeneration befindenden Muskel eine erhöhte Dichte an  $\beta$ 2-Adrenorezeptoren [2]. Auch bei lokaler Injektion des  $\beta$ 2-Adrenorezeptoragonisten

Formoterol in durch Bupivacain myotoxisch geschädigte Muskulatur zeigte sich der gleiche beschleunigende Effekt auf die Muskelregeneration ohne begleitende kardiovaskuläre Effekte [35]. Dieser beschriebene Einfluss auf die Regeneration der Muskulatur scheint durch die Erhöhung des intrazellulären cAMP und damit einer vermehrten Proteinbiosynthese und verminderten Proteinabbau bedingt zu sein [24]. In-vivo sind wohl zusätzliche durch  $\beta$ 2-Agonisten vermittelte Faktoren, wie eine vermehrte Vaskularisation, vermehrte Satellitenzellenproliferation und -differenzierung, [33, 34] sowie die gesteigerte Expression lokaler Wachstumsfaktoren an der verbesserten Regeneration mitbeteiligt [1]. In dieser Arbeit soll gezeigt werden ob der  $\beta$ 2-Agonist Fenoterol in-vitro einen protektiven Effekt auf mit Bupivacain behandelte Muskelzellen hat.

## 1.4. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist den modulativen Einfluss verschiedener Substanzen auf die Myotoxizität von Bupivacain in-vitro an drei Zellreihen zu untersuchen. Als Parameter hierfür wird der Anteil der vitalen Zellen nach Inkubation mit Bupivacain und der jeweiligen Substanz in verschiedenen Konzentrationen verwendet.

Die Zellreihen, an denen die Untersuchungen stattfanden, sind primäre murine Myozyten, immortalisierte murine Myozyten (C2C12-Zellen) und humane Rhabdomyosarkomzellen (A673-Zellen). Es sollen somit auch die unterschiedlichen Voraussetzungen dieser drei Zellreihen berücksichtigt werden.

Für die Wahl der Versuchsmedikamente wurden die oben genannten Theorien zum Mechanismus der Myotoxizität von Lokalanästhetika berücksichtigt und Medikamente gewählt, die in diese Mechanismen eingreifen. Die gewählten Medikamente waren Dantrolen, ein Hemmer des Ryanodin-Rezeptors, wodurch die Freisetzung von Kalzium aus dem SR blockiert wird [20], BAPTA/AM, ein zellgängiger Kalziumkomplexbildner [40], Acetylcystein (ACC), ein antioxidatives Medikament, Erythropoetin (EPO), ein Wachstumsfaktor der Hämatopoese, welcher in vorangegangenen Studien einen protektiven Effekt auf durch verschiedene Weisen geschädigte Skelettmuskelzellen hatte [21] und Fenoterol, ein  $\beta$ 2-Adrenorezeptoragonist, für welchen in beschleunigender Effekt bei der Regeneration von mit Bupivacain geschädigten Zellen berichtet wurde [2, 35]. Des Weiteren wurde der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Atorvastatin untersucht, da auch hier eine Myotoxizität durch Kalziumfreisetzung und Schädigung des Mitochondriums wahrscheinlich ist [37]. Eine weitere getestete Substanz war Mannitol, da das verwendete Dantrolen in Mannitol gelöst ist.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Zellkulturen**

##### **Primäre Mausmuskelzellen**

Die primären Mausmuskelzellen wurden im Labor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin der Universitätsklinik Regensburg von Mäusen entnommen und kultiviert. Es handelt sich um quergestreifte Muskelzellen aus dem Musculus extensor digitorum longus, Musculus soleus oder Musculus tibialis anterior von Wildtyp-Mäusen.

##### **C2C12-Zellen**

Die C2C12-Myoblasten wurden von Cell Lines Service (Dr. Eckner-Str. 8, 69214 Eppelheim, Deutschland) bezogen. Diese Myoblasten sind ein subklon einer Myoblastenlinie, die aus normalen, adulten C3H Mausmuskeln etabliert wurde. Die Zellen differenzieren schnell und produzieren viele kontraktile Myotuben.

##### **A673-Zellen**

Die A-673-Zellen wurden über Cell Lines Service (s.o.) bezogen. Es handelt sich hierbei um humane Rhabdomyosarkomzellen.

#### **2.1.2. Chemikalien und Biochemikalien**

##### **Zellkulturchemikalien**

Chick Embryo Extract(CEE)

Biotrend Chemikalien GmbH Technol.,  
167670, Eupener Str. 157, 50933 Köln,  
Deutschland

DMEM-Medium

PAA Laboratories GmbH, E 15-009,  
Heidmannweg 9, 4061 Pasching,  
Österreich

Fetales Kälberserum (FKS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, F 7524, Eschenstr. 5, 82024 Taufkirchen, Deutschland
Horse Serum (HS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, H 0146, s.o.
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, G 7513, s.o.
Matrigel	Becton Dickinson, 356230, Tullastr. 8- 12, 69126 Heidelberg, Deutschland
Phosphate Buffered Saline (PBS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D 8537, s.o.
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH P 0781, s.o.
RPMI-Medium	PAN Biotech GmbH, P 04-16516, Am Gewerbepark 13, 94501 Aidenbach, Deutschland
Trypsin EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, 59418C, s.o.

### **Chemikalien für die Versuche**

ACC injekt	Hexal AG, BD 5526, Industriestr. 25, 83607 Holzkirchen, Deutschland
Atorvastatin calcium salt trihydrate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, PZ 0001- 5MG, s.o.
BAPTA/AM	Calbiochem, 196419, über Merck KGaA, Frankfurter Str. 250, 64293 Darmstadt, Deutschland
Bupivacaine hydrochloride.	Fluka Analytical, B5274-5G, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, s.o.
Dantrolen i.v	Procter & Gamble Pharmaceuticals Germany GmbH & Co. Operations oHG, NDC:0149-0734, Dr.-Otto-Röhm-Str. 2,



	64331 Weiterstadt – Riedbahn, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D 8418, s.o.
Fenoterol	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, 01643987, Binger Str. 173, 55216 Ingelheim a. Rhein
HCL	Fluka, 35328, über Sigma-Aldrich Chemie GmbH, s.o.
Mannitol	BioChemica UK Ltd, A1903, Unit 4 Daimler Drive, Cowpen Lane Industrial Estate, Billingham TS23 4JD, United Kingdom
Propidiumjodid	Serva Electrophoresis GmbH, 33671, Carl-Benz-Str. 7, 69115 Heidelberg, Deutschland
Retacrit (Erythropoetin)	Hospira Deutschland GmbH, EU/1/07/431/002, Linkstr. 10, 10785 Berlin, Deutschland

### **Geräte und Verbrauchsmaterialien**

Brutschrank	Heracell 150i, Incubator	CO2	Thermo Fisher Scientific, Frankfurter Straße 129B, 64293 Darmstadt, Deutschland
Durchflusszytometer	FACS Calibur™		Becton Dickinson, s.o.
Mikroskop	Leitz DMIRB		Leica Microsystems GmbH, Ernst-Leitz-Str. 17-37, 35578 Wetzlar, Deutschland
Kamera	EOS 500D		Canon Deutschland GmbH, Europark

Röhrchen für FACS	55.1578	Fichtenhain A10, 47807 Krefeld, Deutschland Sarstedt AG & Co. KG, Sarstedtstr. 1, 51588 Nümbrecht, Deutschland
pH-Meter	Digital pH-Meter	Knick Elektronische Messgeräte GmbH & Co. KG, Beuckestr. 22, 14163 Berlin, Deutschland
Pipetten	Pipetman	Gilson, Inc., P.O. Box 620027, Middleton WI 53562-0027, USA
	Accu-jet pro	Brand GmbH & Co. KH, Otto-Schott-Str. 25, 97877 Wertheim, Deutschland
	Research, Reference	Eppendorf AG, Barkhausenweg 1, 22339 Hamburg, Deutschland
Sterilbank	Herasafe KS	Heraeus Holding GmbH, Heraeusstraße 12-14, 63450 Hanau, Deutschland
	LaminAir HB 2448	
Sterilfiltration	Sterile syringe filter 0,2 µm, 514-0061	VWR International GmbH, Hilperstr. 20a, 64295 Darmstadt, Deutschland
Waage	BP 2215	Sartorius AG, Otto- Brenner-Str. 20, 37079 Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Thermostatic water bath	Fried Electric, Marconi st. 19, Haifa 31251, Israel
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm <sup>2</sup>	Assistent, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG,

		97647	Sondheim	v.d.
			Röhn, Deutschland	
Zellkultur	Falkon Zellkulturflaschen		Schubert & Weiss	
	75 cm <sup>2</sup> , 353108		OMNILAB-Laborzentrum	
			Verwaltungs GmbH,	
			Robert-Hooke-Str. 8,	
			28359 Bremen,	
			Deutschland	
	Multiwell-Platten	24,	Becton Dickinson, s.o.	
	353226			
Zentrifugen	Biofuge stratos		Thermo Fisher scientific,	
	Sepatech Megafuge 1.0R		Heraeus instruments, s.o.	

## Software

Citavi 5	Swiss Academic Software,
	Florhofstrasse 2, 8820 Wädenswil,
	Schweiz
Flow Jo	Becton Dickinson, s.o.
Microsoft Excel 2013	Microsoft Office, Microsoft Corporation,
	Walter-Gropius-Straße 5, 80807
	München, Deutschland
Microsoft Word 2013	Microsoft Office, s.o.
IBM SPSS Statistics 21	IBM, IBM Deutschland GmbH
	71137 Ehningen, Deutschland

## **2.2. Methoden**

### **2.2.1. Sterilisation von Materialien und Lösungen**

Einmalartikel für die Zellkultur und den Versuchsaufbau wurden steril verpackt gekauft. Hitzebeständige Glaspipettenspitzen wurden durch Autoklavieren bei 210°C für 180 Minuten sterilisiert. Zellkulturmedien, Puffer, Mediumzusätze und steril verfügbare Chemikalien wurden ebenso steril verpackt gekauft. Alle anderen Lösungen wurden mit Sterilfilter mit einer Porenweite von 0,2 µm steril filtriert.

### **2.2.2. Isolation, Splitten und Kultivierung von primären Mausmuskelzellen**

Die hier verwendeten Versuchstiere wurden bereits im Vorfeld für andere Studien getötet. Für diese Studien wurde der jeweilige Ethikantrag genehmigt, weshalb hier kein eigener Ethikantrag nötig war. Für die Isolation der primären Mausmuskelzellen wurde zuerst das Hinterbein einer Maus abgetrennt, das Fell abgezogen und dann das Bein auf einer Styroporunterlage fixiert. Es wurde bevorzugt der Musculus extensor digitorum longus entnommen, ersatzweise der Musculus soleus oder der Musculus tibialis anterior. Anschließend wurde der entnommene Muskel mit PBS gespült, in Kollagenase-Lösung (0,04% Kollagenase Typ I in DMEM + 1% Penicillin/Streptomycin + 1% 2mM L-Glutamin + 1% Gentamycin) gelegt und für 90 – 120 Minuten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Muskel in eine Petrischale mit Plating Medium (DMEM + 10% HS + 0,5% CEE + 0,5% 2mM L-Glutamin + 0,5% Penicillin/Streptomycin) überführt. Unter einem Mikroskop wurden die Muskelfasern mit zwei feinen Pinzetten vereinzelt, 20 – 30 Einzelfasern wurden pro Petrischale mit Plating Medium verteilt. Die intakten Einzelfasern wurden vorsichtig in zuvor mit Matrigel beschichtete Zellkulturflaschen pipettiert, die Flaschen wurden 30 Minuten ruhen gelassen und danach mit Plating Medium befüllt. Nach dreitägiger Inkubation wurde das Plating Medium durch Proliferationsmedium ersetzt.

Die primären Mausmuskelzellen wurden in mit Matrigel beschichteten 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in DMEM (Dulbeccos modified eagle medium, High Glucose 4,5 g/l, without L-Glutamine) mit 10% FKS, 10% HS, 1% CEE, 1% 2mM L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchte kultiviert. Das Kulturmedium wurde 3 Mal pro Woche erneuert. Bei einem konfluierendem Wachstum

von 90% wurden die Zellen gesplittet. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS pro Kulturfalsche gespült. Danach wurden pro Flasche 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung eingesetzt und für 3 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 6 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension in 50 ml Falkon-Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 Minuten mit 319 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, mit 10 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. In neue, mit Matrigel beschichtete, 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen wurden jeweils 1-2 Millionen Zellen eingesetzt und mit Medium auf 10 ml aufgefüllt.

Für den Versuchsaufbau wurden die primären Mausmuskelzellen nach dem Ablösen, Zentrifugieren und Zählen in 24-Wellplatten ohne Matrigel ausgesät. Pro Well wurden ca. 200 000 Zellen in 1 ml Medium eingesetzt.

### **2.2.3. Splitten und Kultivierung von C2C12-Zellen**

Die C2C12-Zellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in RPMI (RPMI-1640, Roswell Park Memorial Institute) mit 20% FKS, 1% 2mM L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Kulturmedium wurde 3 Mal pro Woche erneuert. Bei einem konfluieren Wachstum von 90% wurden die Zellen gesplittet. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS pro Kulturfalsche gespült. Danach wurden pro Flasche 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung eingesetzt und für 3 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 6 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension in 50 ml Falkon-Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 Minuten mit 319 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, mit 10 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. In neue 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen wurden jeweils 1-2 Millionen Zellen eingesetzt und mit Medium auf 10 ml aufgefüllt.

Für den Versuchsaufbau wurden die C2C12-Zellen nach dem Splittvorgang auf 24-Wellplatten verteilt. Dabei wurden pro Well 250 000 Zellen in 1 ml Medium eingesetzt.

#### **2.2.4. Splitten und Kultivierung von A-673-Zellen**

Die humanen A-673-Rhabdomyosarkomzellen wurden in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen in DMEM mit 10% FKS, 1% 2mM L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Das Kulturmedium wurde 3 Mal pro Woche erneuert. Bei einem konfluieren Wachstum von 90% wurden die Zellen gesplittet. Nach Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS pro Kulturfalsche gespült. Danach wurden pro Flasche 4 ml Trypsin/EDTA-Lösung eingesetzt und für 3 Minuten bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde mit je 6 ml Medium abgestoppt und die Zellsuspension in 50 ml Falkon-Zentrifugationsröhrchen überführt und 5 Minuten mit 319 g bei Raumtemperatur zentrifugiert, mit 10 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. In neue 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen wurden jeweils 1-2 Millionen Zellen eingesetzt und mit Medium auf 10 ml aufgefüllt.

Für den Versuchsaufbau wurden die A-673-Zellen nach dem Splitten und Zählen in 24-Wellplatten eingesetzt. Dafür wurden pro Well 300 000 Zellen in 1 ml Medium ausgesät.

#### **2.2.5. Versuchsaufbau**

##### **Genereller Versuchsablauf**

Die Versuche wurden jeweils in Doppelansätzen durchgeführt. Dafür wurden die Zellen zuerst wie oben beschrieben auf 24-Wellplatten ausgebracht und bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit bis zu einem konfluenten Wachstum von 90 % inkubiert. 24 Stunden vor Versuchsdurchführung wurde das Proliferationsmedium der jeweiligen Zellreihen durch ein Differenzierungsmedium ausgetauscht. Das Differenzierungsmedium für die primären Mausmuskelzellen bestand aus DMEM, 2% HS, 1% 2 mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 0,5% CEE. Das Differenzierungsmedium für die C2C12-Zellen bestand aus RPMI, 1640, 2% HS, 1% 2 mM L-Glutamin und 1% Penicillin/Streptomycin. Für die A-673-Rhabdomyosarkomzellen war kein Differenzierungsmedium notwendig.

Am Versuchstag wurde zuerst das Medium aus jedem Well mit einer Glaspipette abgesaugt. Im Anschluss wurde die Vergiftung mit jeweils 500 µl pro einzusetzenden

Stoff in doppelter Konzentration durchgeführt, so dass das Gesamtvolumen pro Well 1 ml betrug.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Lösungen aus den Wells mit automatischen Pipetten in FACS-Röhrchen überführt. Der Zellrasen wurde mit 300 µl Trypsin/EDTA pro Well und einer Inkubation bei 37° C von 2 Minuten abgelöst. Die Reaktion wurde mit 500 µl Medium pro Well abgestoppt. Die so entstandene Zellsuspension wurde mit einer automatischen Pipette in die zugehörigen FACS-Röhrchen überführt. Die FACS-Röhrchen wurden bei 319 g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde mit aus jedem Röhrchen mit einer Glaspipette abgesaugt und das Zellpellet mit je 500 µl PBS resuspendiert. Im Anschluss wurden die Zellen in jedem Röhrchen mit jeweils 5 µl Propidiumjodid auf Vitalität angefärbt.

### **Herstellung der Bupivacain-Lösungen**

Bupivacain wurde als Bupivacain-Hydrochlorid über Fluka Analytical (Adresse s. o.) bezogen. Die Einwaage des Feststoffes erfolgte in das jeweilige Zellkulturmedium. Es wurde zunächst immer eine Lösung mit einer Konzentration von 10 000 ppm Bupivacain hergestellt, steril filtriert und diese dann mit dem jeweiligen Medium verdünnt. Zuvor musste die 10 000 ppm Bupivacain-Stammlösung mit, je nach Temperatur und Medium unterschiedlichen Volumina, 1-molarer HCl versetzt werden um eine vollständige Lösung von Bupivacain zu erreichen. Es wurden für jeden Versuch Lösungen mit 0, 1000, 2000, 3500, 5000 und 10 000 ppm Bupivacain hergestellt und diese dann mit 1-Molarer Salzsäure auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

Die Bupivacainlösungen wurden jeweils in der doppelten Konzentration der einzusetzenden Konzentration hergestellt, da sie in den meisten Fällen zusammen mit einem zweiten Medikament auf die Zellen pipettiert wurden und somit die gewünschte Verdünnungsstufe erreicht wurde.

Für die Versuche mit einer Vorinkubation mit einem anderen Stoff und einer darauffolgenden alleinigen Inkubation mit Bupivacain wurden die Verdünnungen in den Zielkonzentrationen 0, 500, 1000, 1750, 2000 und 5000 ppm hergestellt und mit 1M HCl auf einen pH-Wert von 7 eingestellt.

## Inkubationsschemata

- **Bupivacain und ACC**

Acetylcistein wurde als fertige Injektionslösung über Hexal (Adresse s.o.) bezogen. Die Fertiglösung hatte eine Konzentration von 100 mg/ml, was 610 mM entspricht. Auch hier wurden die Lösungen in doppelter Konzentration der Zielkonzentration hergestellt, da gleichzeitig mit Bupivacainlösungen inkubiert wurde und die Lösungen sich so gegenseitig um 1:2 verdünnten.

Es wurden Ansätze mit 0, 2, 10 und 20 mM ACC hergestellt. Dafür wurde die fertige Injektionslösung mit dem jeweiligen Zellkulturmedium verdünnt.

Die Bupivacain- und ACC-Lösungen wurden zeitgleich nach folgendem Schema auf die Zellrasen in den Wellplatten pipettiert.

	Bupi 0	Bupi 500	Bupi 1000	Bupi 1750	Bupi 2500	Bupi 5000
ACC 0 mM						
ACC 1 mM						
ACC 5 mM						
ACC 10 mM						

Tabelle 1: Inkubationsschema Bupivacain und ACC

Die Wellplatten wurden dann für 120 Minuten bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Im Anschluss wurde mit oben genanntem Versuchsprotokoll fortgefahren.

- **Bupivacain und Atorvastatin**

Atorvastatin wurde als Atorvastatin Calcium-Salz Trihydrat über Sigma (Adresse s.o.) bezogen. Der Feststoff wurde in das jeweilige Zellkulturmedium eingewogen, um eine Stammlösungskonzentration von 4000 µM zu erreichen. Um Atorvastatin suffizient zu lösen musste in den Stammlösung 4% DMSO zugegeben werden. Die Stammlösung wurde mit dem jeweiligen Zellkulturmedium verdünnt, so dass Lösungen mit 0, 1, 2, 20, 100, 200 und 500 µM entstanden. Auch hier wurden wieder



Lösungen mit der doppelten Konzentration der Zielkonzentration hergestellt, da gleichzeitig mit Bupivacain nach folgendem Schema pipettiert wurde.

	Bupi 0	Bupi 500	Bupi 1000	Bupi 1750	Bupi 2500	Bupi 5000
Atorvastatin 0 µM						
Atorvastatin 0.5 µM						
Atorvastatin 1 µM						
Atorvastatin 10 µM						
Atorvastatin 50 µM						
Atorvastatin 100 µM						
Atorvastatin 250 µM						

Tabelle 2: Inkubationsschema Bupivacain und Atorvastatin

Die Wellplatten wurden nach dem Pipettiervorgang für 120 Minuten bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach schloss sich oben aufgeführtes Versuchsprotokoll an.

- **Bupivacain und BAPTA/AM**

Tetra(acetoxymethyl)Ester (BAPTA/AM) wurde als Feststoff über Calbiochem (Adresse s.o.) bezogen. Zuerst wurde mit DMSO eine Stammlösung mit einer Konzentration von 10000 µM hergestellt, welche dann mit dem jeweiligen Zellkulturmedium auf 0, 30, 50 und 100 µM verdünnt wurde. Durch den weiteren Zusatz von DMSO wurde in allen Lösungen ein Gehalt von 1% DMSO erreicht. In einer Versuchsreihe wurden diese Konzentrationen BAPTA/AM für 30 Minuten bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert, danach die Flüssigkeit aus den Wells mit Glaspipetten abgesaugt und mit Bupivacain in den verschiedenen Konzentrationen für 120 Minuten bei denselben Bedingungen inkubiert.

	Bupi 0	Bupi 500	Bupi 1000	Bupi 1750	Bupi 2500	Bup i 5000
BAPTA/AM 0 $\mu$ M						
BAPTA/AM 30 $\mu$ M						
BAPTA/AM 50 $\mu$ M						
BAPTA/AM 100 $\mu$ M						

Tabelle 3: Inkubationsschema Bupivacain und BAPTA/AM

Es folgte die Durchführung des oben erläuterten Versuchsprotokolls.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde BAPTA/AM nur in der Konzentration 100  $\mu$ M mit 1% DMSO und 0  $\mu$ M mit 1% DMSO verwendet. Die Inkubationszeit wurde dabei variiert. Vor der Inkubation mit Bupivacain in den üblichen Konzentrationen wurde für 30, 60 oder 120 Minuten mit BAPTA/AM 100  $\mu$ M bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert, die Lösungen dann mit Glaspipetten abgesaugt und die Bupivacainlösungen für weitere 120 Minuten zu den Zellen gegeben.

	Bupi 0	Bupi 500	Bupi 1000	Bupi 1750	Bupi 2500	Bupi 5000
BAPTA/AM 0 $\mu$ M 120 min						
BAPTA/AM 100 $\mu$ M 30 min						
BAPTA/AM 100 $\mu$ M 60 min						
BAPTA/AM 100 $\mu$ M 120 min						

Tabelle 4: Inkubationsschema Bupivacain und BAPTA/AM Zeitversuch

Auch bei diesem Versuchsaufbau schloss sich das oben genannte Versuchsprotokoll an.

- **Bupivacain und Dantrolen**

Dantrolen wurde über Procter & Gamble Pharmaceuticals (Adresse s.o.) als Feststoff zur Herstellung einer Infusionslösung bezogen. Der Inhalt der Infusionsflasche betrug 3020 mg, wobei 3000 mg Mannitol als Lösungsmittel enthalten waren. Das Feststoffgemisch wurde mit den mitgelieferten 60 ml Aqua ad injektabilia gelöst. So ergab sich eine Stoffmengenkonzentration von 833  $\mu\text{M}$  in der Ausgangslösung. Von dieser Konzentration ausgehend wurden Lösungen mit 0, 120, 240 und 360  $\mu\text{M}$  mit dem jeweiligen Zellkulturmedium hergestellt. Die Lösungen wurden dann wieder zusammen mit den jeweiligen Bupivacainlösungen auf die Zellrasen in den einzelnen Wells pipettiert, wobei sich eine Verdünnung von 1:2 ergab und somit die Zielkonzentration erreicht werden konnte.

	Bupi 0	Bupi 500	Bupi 1000	Bupi 1750	Bupi 2500	Bupi 5000
Dantrolen 0 $\mu\text{M}$						
Dantrolen 60 $\mu\text{M}$						
Dantrolen 120 $\mu\text{M}$						
Dantrolen 180 $\mu\text{M}$						

*Tabelle 5: Inkubationsschema Bupivacain und Dantrolen*

Nach Exposition der Zellen mit Bupivacain-Dantrolen-Lösungen, wurden sie für 120 Minuten bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit für 120 Minuten inkubiert. Anschließend wurde oben beschriebenes Versuchsprotokoll durchgeführt.

- **Bupivacain und EPO**

Erythropoetin wurde in 0,3 ml Fertigspritzen zur subcutanen Injektion über Hospira (Adresse s.o.) bezogen. Die Ausgangskonzentration der Lösung in der Fertigspritze betrug 3333 U/ml. Es wurden Verdünnungen mit dem jeweiligen Zellkulturmedium auf 1, 2,5, 5 und 10 U/ml hergestellt. Bei diesem Versuchsaufbau wurden die Zellen in den jeweiligen Wells zuerst nur mit der EPO-Lösung für 24 bzw 8 Stunden inkubiert (37° C, 5% CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit), die Lösung mit Glaspipetten abgesaugt und im Anschluss mit Bupivacain-Lösungen für 120 Minuten inkubiert (37° C, 5%CO<sub>2</sub>, 100% Luftfeuchtigkeit).

	Bupi 0	Bupi 500	Bupi 1000	Bupi 1750	Bupi 2500	Bupi 5000
EPO 0 U						
EPO 1 U						
EPO 2,5 U						
EPO 5 U						
EPO 10 U						

*Tabelle 6: Inkubationsschema Bupivacain und EPO*

Im Anschluss an die Inkubationszeiten wurde mit oben besprochenem Versuchsprotokoll fortgefahren.

- **Bupivacain und Fenoterol**

Fenoterol wurde als Injektionslösung mit einer Konzentration von 50 µg/ml über Boehringer Ingelheim (Adresse s.o.) bezogen. Es wurde zunächst eine Stammlösung mit einer Konzentration von 20 000 ng/ml mit dem jeweiligen Zellkulturmedium hergestellt und diese dann wiederum mit Medium verdünnt, so dass Lösungen mit 0, 2, 20, 200, 2000 und 20 000 ng/ml zur Verfügung standen. Auch hier fand bei gleichzeitiger Inkubation mit Bupivacain wieder eine 1:2 Verdünnung in den

einzelnen Wells statt, womit die Zielkonzentrationen von jeweils der Hälfte der Ausgangslösungen erreicht wurden.

	Bupi 0	Bupi 500	Bupi 1000	Bupi 1750	Bupi 2500	Bupi 5000
Fenoterol 0 ng/ml						
Fenoterol 1 ng/ml						
Fenoterol 10 ng/ml						
Fenoterol 100 ng/ml						
Fenoterol 1000 ng/ml						
Fenoterol 10000 ng/ml						

*Tabelle 7: Inkubationsschema Bupivacain und Fenoterol*

Nach dem zeitgleichen Einbringen von Fenoterol und Bupivacain in den verschiedenen Konzentrationskombinationen in den Wells mit der jeweiligen Zellreihe wurden die Platten für 120 Minuten bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Darauf folgte die Durchführung des oben erläuterten Versuchsprotokolls.

- **Bupivacain und Mannitol**

Mannitol wurde als Feststoff über BioChemica (Adresse s.o.) bezogen. Zuerst wurde durch Lösen von 5 g Mannitol in 100 ml destilliertem Wasser ein Mannitollösung mit einer Konzentration von 274 mM hergestellt, welche der Mannitol-Konzentration in der Dantrolen-Infusionslösung entspricht. Daraufhin wurde die Mannitol-Stammlösung nach demselben Schema wie die Dantrolen-Stammlösung mit dem jeweiligen Zellkulturmedium gelöst. So konnten reine Mannitollösungen hergestellt werden, welche der Konzentration des Mannitol in den Dantrolenlösungen

entsprachen. Durch das zeitgleiche Einbringen von Mannitol und Bupivacain fand die gewünschte Verdünnung auf die Zielkonzentrationen direkt in den einzelnen Wells statt.

	Bupi 0	Bupi 500	Bupi 1000	Bupi 1750	Bupi 2500	Bupi 5000
Mannitol 0 mM						
Mannitol 19,7 mM						
Mannitol 53,1 mM						
Mannitol 72,9 mM						

*Tabelle 8: Inkubationsschema Bupivacain und Mannitol*

Die Zellen in den Wellplatten wurden hier auch wieder gleichzeitig mit Mannitol und Bupivacain für 120 Minuten bei 37° C, 5% CO<sub>2</sub> und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert. Nach der Inkubationszeit schloss sich oben angeführtes Versuchsprotokoll an.

### **2.2.6. Durchflusszytometrie**

Nach Durchführung des Versuchsprotokolls folgte sofort im Anschluss an die Färbung mit Propidiumjodid die Messung der Proben am Durchflusszytometer mit für die Analyse der PI-Fluoreszenz geeigneten Einstellungen. Aus jeder Probe wurden 10000 Zellen registriert.

### **2.2.7. Auswertung**

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte zunächst mit dem FlowJo Computerprogramm, welches die Software des Durchflusszytomeres von Becton Dickinson (Adresse s.o.) ist. Der Anteil der vitalen Zellen wurde über Zellidentifikation durch Scattering (forward scatter/ side scatter) und Identifikation der PI-negativen

Zellen durch Detektion der emittierten Fluoreszenz ermittelt. Anschließend wurden die so gewonnenen Daten in Microsoft Excel Tabellen übertragen. Diese wurden in SPSS 21 eingespeist und dort statistisch analysiert. Analysiert wurde der Anteil der vitalen Zellen in den Gruppen der Bupivacainkonzentration bezogen auf die Konzentration des zugesetzten Medikaments. Zuerst erfolgte jeweils ein Test auf Homogenität der Varianzen, im Anschluss wurden die Daten mit Dunnett-t3 oder Bonferroni ausgewertet, je nach Aussage der Levene-Statistik.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Primäre Mausmuskelzellen

##### 3.1.1. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und ACC

Die Inkubation der primären Mausmuskelzellen mit Bupivacain und ACC erfolgte wie oben beschrieben gleichzeitig für 120 Minuten in steigender Konzentration.

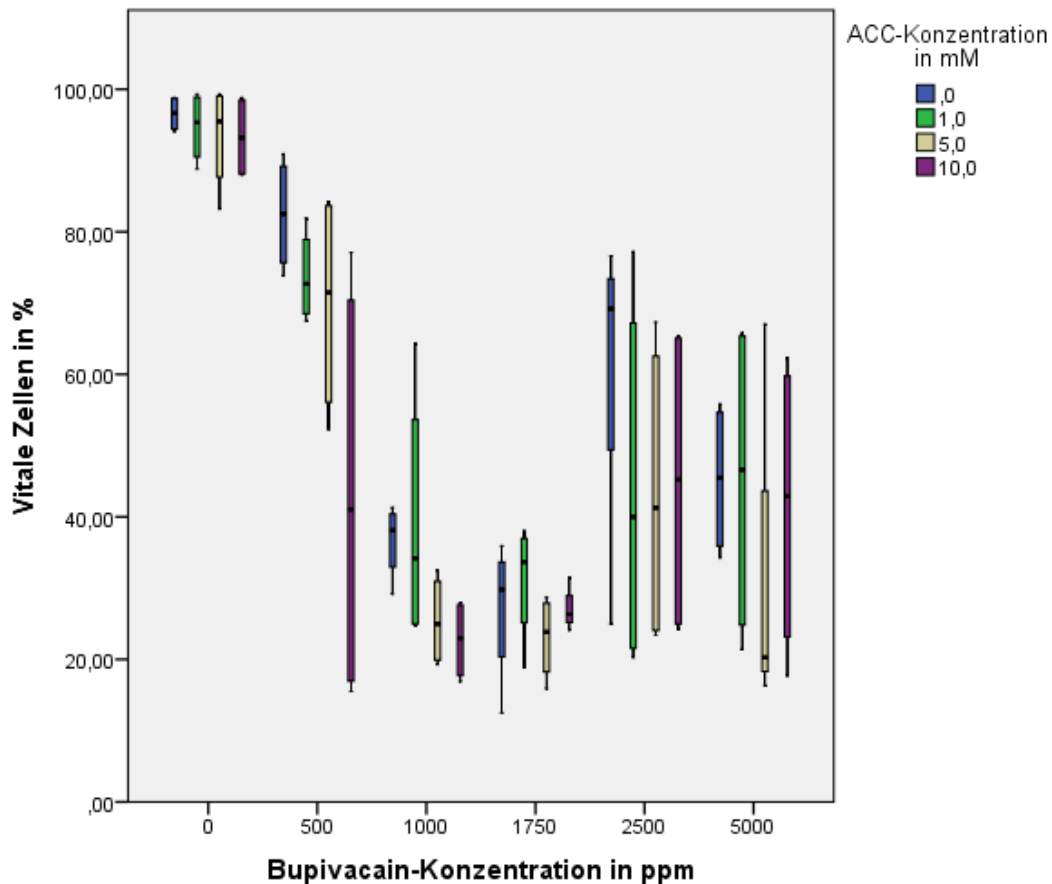


Abbildung 1: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und ACC-Konzentration (primäre Mausmuskelzellen, n=4)

In den Ergebnissen zeigt sich kein Anstieg des prozentualen Anteils der vitalen Zellen bei steigender ACC-Konzentration und Exposition zu Bupivacain. Auch der Abwärtstrend des Anteils der vitalen Zellen, welcher in Abbildung 1 in den Gruppen der Bupivacainkonzentration von 500 ppm und 1000 ppm sichtbar ist, bewegt sich im nicht statistisch signifikanten Rahmen.



### **3.1.2. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und Atorvastatin**

Die Versuchsreihe, bei der primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und Atorvastatin inkubiert wurden, erfolgte wie oben beschrieben.

Zunächst zeigt sich ein mit steigender Bupivacainkonzentration abnehmender Anteil der vitalen Zellen über alle Gruppen der Atorvastatin-Konzentrationen. Diese Abnahme ist statistisch signifikant für die Gruppen 0 ppm und 500 ppm Bupivacain gegenüber allen anderen Bupivacainkonzentration ( $p < 0,05$ ), für die Gruppe 1000 ppm Bupivacain gegenüber 0 ppm, 500 ppm und 1750 ppm Bupivacain, für die Gruppe 1750 ppm Bupivacain gegenüber 0 ppm, 500 ppm und 1000 ppm Bupivacain, für die Gruppe 2500 ppm Bupivacain gegenüber 0 ppm und 500 ppm Bupivacain und für die Gruppe 5000 ppm Bupivacain gegenüber 0 ppm und 500 ppm Bupivacain.

Bei einer Bupivacainkonzentration von 0 ppm zeigt sich eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Abnahme des Anteils der vitalen Zellen beim Vergleich von 1  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  Atorvastatin.

Bei einer Bupivacainkonzentration von 500 ppm zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme des prozentualen Anteils der vitalen Zellen beim Vergleich von 0  $\mu\text{M}$  Atorvastatin zu 10  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Atorvastatin. Ebenfalls zeigt sich eine Abnahme des Anteils der vitalen Zellen im Vergleich von 5  $\mu\text{M}$  Atorvastatin zu 10  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Atorvastatin. Auch beim Vergleich des Anteils der vitalen Zellen von 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin zu 0  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$  zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied. Bei einer Atorvastatin-Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zeigen sich statistisch signifikant mehr vitale Zellen als bei 10  $\mu\text{M}$  und auch mehr als bei 250  $\mu\text{M}$ . Bei einer Atorvastatin-Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  zeigt sich ein signifikant höherer Anteil der vitalen Zellen im Vergleich mit 10  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Atorvastatin. Bei der höchsten Atorvastatin-Konzentration (250  $\mu\text{M}$ ) ergibt sich ein signifikant höherer Anteil der vitalen Zellen bei Atorvastatin-Konzentrationen von 0  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 100  $\mu\text{M}$ .

### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: vitale zellen

Bonferroni

(I) Atorvastatin-Konzentration in $\mu\text{M}$	(J) Atorvastatin-Konzentration in $\mu\text{M}$	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
,0	,5	,00000	1,49772	1,000	-5,1719	5,1719
	1,0	2,80000	1,49772	1,000	-2,3719	7,9719
	10,0	6,45000*	1,49772	,007	1,2781	11,6219
	50,0	-,85000	1,49772	1,000	-6,0219	4,3219
	100,0	-1,70000	1,49772	1,000	-6,8719	3,4719
	250,0	5,20000*	1,49772	,048	,0281	10,3719
,5	,0	,00000	1,49772	1,000	-5,1719	5,1719
	1,0	2,80000	1,49772	1,000	-2,3719	7,9719
	10,0	6,45000*	1,49772	,007	1,2781	11,6219
	50,0	-,85000	1,49772	1,000	-6,0219	4,3219
	100,0	-1,70000	1,49772	1,000	-6,8719	3,4719
	250,0	5,20000*	1,49772	,048	,0281	10,3719
1,0	,0	-2,80000	1,49772	1,000	-7,9719	2,3719
	,5	-2,80000	1,49772	1,000	-7,9719	2,3719
	10,0	3,65000	1,49772	,500	-1,5219	8,8219
	50,0	-3,65000	1,49772	,500	-8,8219	1,5219
	100,0	-4,50000	1,49772	,142	-9,6719	,6719
	250,0	2,40000	1,49772	1,000	-2,7719	7,5719
10,0	,0	-6,45000*	1,49772	,007	-11,6219	-1,2781
	,5	-6,45000*	1,49772	,007	-11,6219	-1,2781
	1,0	-3,65000	1,49772	,500	-8,8219	1,5219
	50,0	-7,30000*	1,49772	,002	-12,4719	-2,1281
	100,0	-8,15000*	1,49772	,000	-13,3219	-2,9781
	250,0	-1,25000	1,49772	1,000	-6,4219	3,9219
50,0	,0	,85000	1,49772	1,000	-4,3219	6,0219
	,5	,85000	1,49772	1,000	-4,3219	6,0219
	1,0	3,65000	1,49772	,500	-1,5219	8,8219
	10,0	7,30000*	1,49772	,002	2,1281	12,4719
	100,0	-,85000	1,49772	1,000	-6,0219	4,3219
	250,0	6,05000*	1,49772	,012	,8781	11,2219
100,0	,0	1,70000	1,49772	1,000	-3,4719	6,8719
	,5	1,70000	1,49772	1,000	-3,4719	6,8719
	1,0	4,50000	1,49772	,142	-,6719	9,6719
	10,0	8,15000*	1,49772	,000	2,9781	13,3219
	50,0	,85000	1,49772	1,000	-4,3219	6,0219

	250,0	6,90000*	1,49772	,003	1,7281	12,0719
250,0	,0	-5,20000*	1,49772	,048	-10,3719	-,0281
	,5	-5,20000*	1,49772	,048	-10,3719	-,0281
	1,0	-2,40000	1,49772	1,000	-7,5719	2,7719
	10,0	1,25000	1,49772	1,000	-3,9219	6,4219
	50,0	-6,05000*	1,49772	,012	-11,2219	-,8781
	100,0	-6,90000*	1,49772	,003	-12,0719	-1,7281

\*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Abbildung 2: Bonferroni bei Bupivacainkonzentration 500 ppm

Bei einer Bupivacainkonzentration von 1000 ppm, 1750 ppm, 2500 ppm und 5000 ppm ergeben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede des Anteils der vitalen Zellen zwischen den Gruppen der verschiedenen Atorvastatin-Konzentrationen.

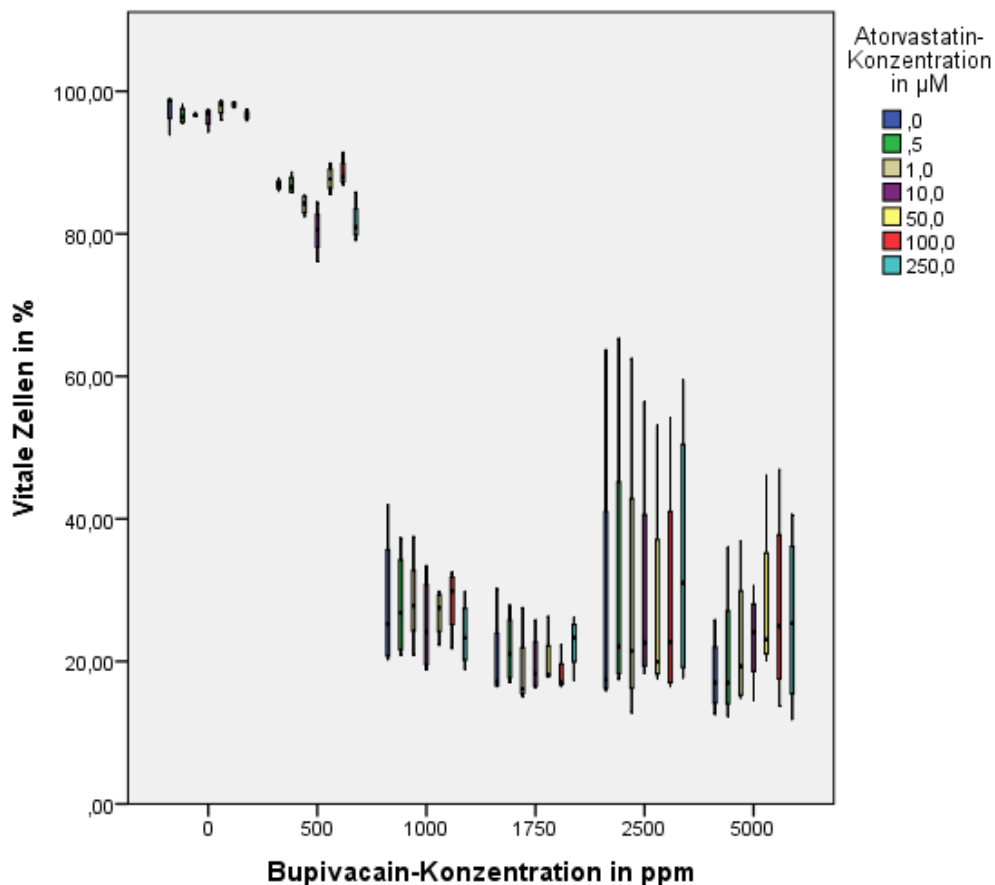


Abbildung 3: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und Atorvastatin-Konzentration (primäre Mausmuskelzellen, n=4)

### **3.1.3. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und BAPTA/AM**

Die Versuchsreihe mit BAPTA/AM wurde wie oben beschrieben in zwei unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt. In einem Ansatz wurden steigende Konzentrationen BAPTA/AM mit jeweils 30 Minuten Inkubationszeit getestet, im zweiten Ansatz eine einzelne Konzentration BAPTA/AM mit Inkubationszeiten von 30 bis 120 Minuten. Danach folgte jeweils die Inkubation mit Bupivacain in steigenden Konzentrationen für 120 Minuten.

Bei den Versuchen mit verschiedenen Konzentrationen an BAPTA/AM zeigt sich in der Gruppe mit 0 ppm Bupivacain eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen beim Vergleich der Konzentrationen 0  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM zu 100  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM und 30  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM zu 100  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM. In den Zellpopulationen, welche mit 500 ppm Bupivacain inkubiert wurden zeigt sich ebenfalls ein signifikanter Rückgang des Anteils der vitalen Zellen im Vergleich 0  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM zu 100  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM und 30  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM zu 100  $\mu\text{M}$  BAPTA/AM. Bei einer Inkubation mit 1000 ppm Bupivacain zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen über den vier BAPTA/AM-Konzentrationen. Ebenso verhält es sich bei Bupivacainkonzentrationen von 1750 ppm, 2500 ppm und 5000 ppm.

Im Versuchsansatz mit drei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten von BAPTA/AM zeigt sich über den verschiedenen Zeiten bei einer Bupivacainkonzentration von 0 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1750 ppm, 2500 ppm und 5000 ppm kein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen.

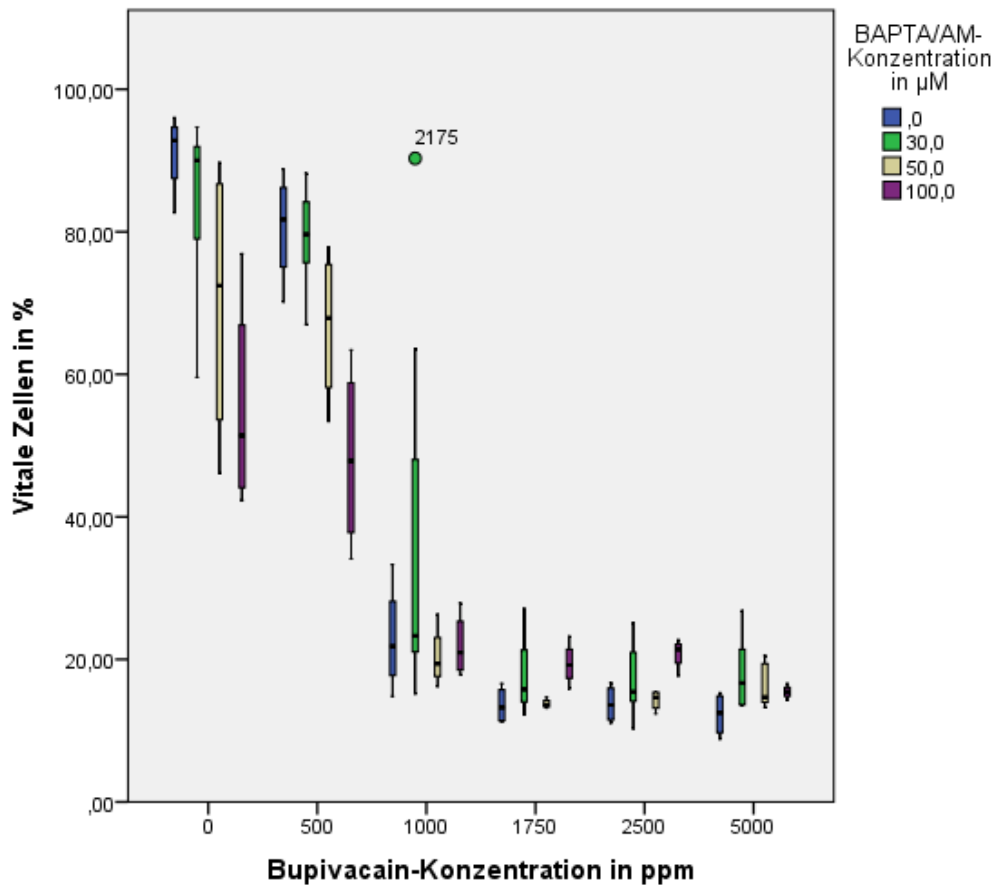


Abbildung 4: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und BAPTA/AM-Konzentration bei 30 Minuten Vorinkubation mit BAPTA/AM (primäre Mausmuskelzellen, n=4)

### 3.1.4. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und Dantrolen

Die Dantrolen-Versuchsreihe wurde mit den primären Mausmuskelzellen wie oben erläutert durchgeführt.

Bei einer Bupivacainkonzentration von 0 ppm zeigen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede des Anteils der vitalen Zellen zwischen den Gruppen der verschiedenen Dantrolen-Konzentrationen.

Beträgt die Bupivacainkonzentration 500 ppm zeigt sich eine statistisch signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen ab einer Dantrolen-Konzentration von 120 µM und mehr.

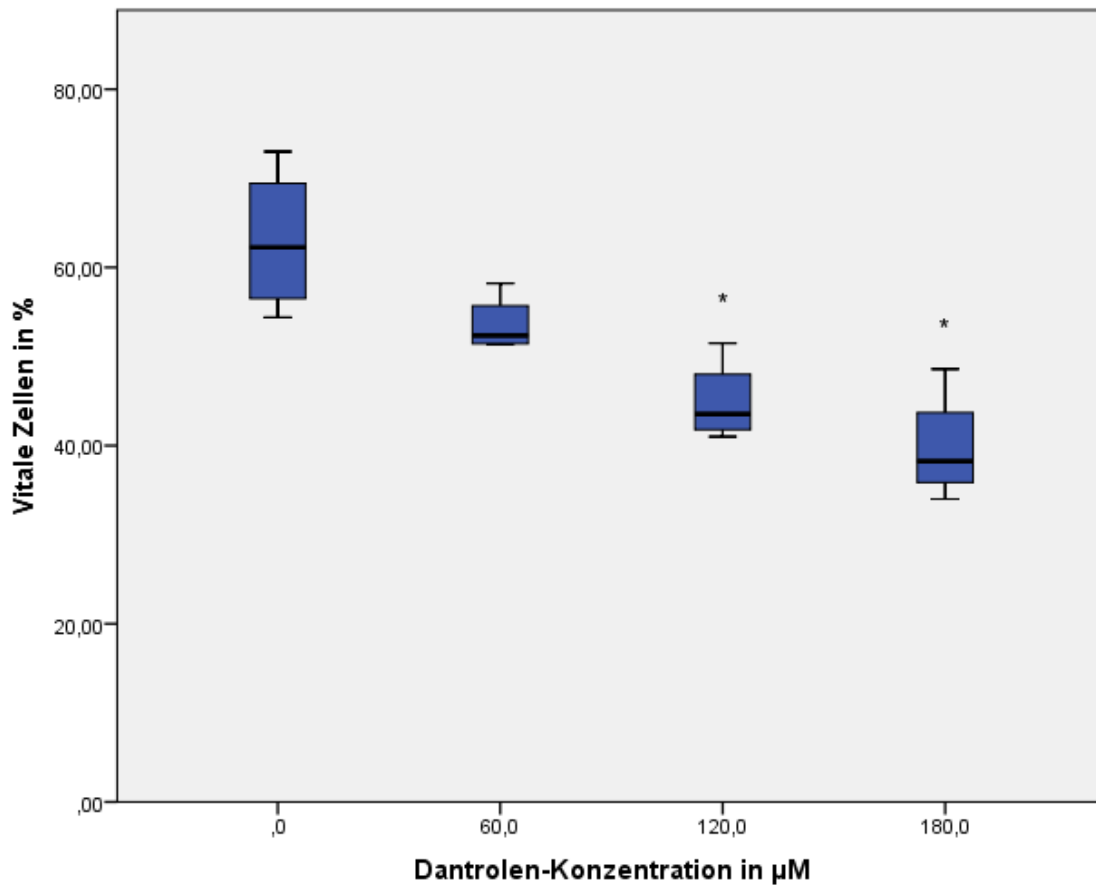


Abbildung 5: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen bei Bupivacainkonzentration = 500 ppm in Abhängigkeit von Dantrolen-Konzentration (primäre Mausmuskelzellen)

\* Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant gegenüber Dantrolen-Konzentration = 0 µM

Bei einer Bupivacainkonzentration von 1000 ppm und 1750 ppm zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen bei verschiedenen hohen Dantrolen-Konzentrationen.

In der Gruppe mit einer Bupivacainkonzentration von 2500 ppm zeigt sich eine signifikante Zunahme des Anteils der vitalen Zellen von 0 µM Dantrolen zu 180 µM Dantrolen.

#### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: vitale zellen

Bonferroni

(I) Dantrolen-Konzentration in µM	(J) Dantrolen-Konzentration in µM	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
,0	60,0	-4,44333	4,98632	1,000	-20,4400	11,5534

	120,0	-4,70333	4,98632	1,000	-20,7000	11,2934
	180,0	-17,45333*	4,98632	,030	-33,4500	-1,4566
60,0	,0	4,44333	4,98632	1,000	-11,5534	20,4400
	120,0	-,26000	4,61643	1,000	-15,0701	14,5501
	180,0	-13,01000	4,61643	,100	-27,8201	1,8001
120,0	,0	4,70333	4,98632	1,000	-11,2934	20,7000
	60,0	,26000	4,61643	1,000	-14,5501	15,0701
	180,0	-12,75000	4,61643	,111	-27,5601	2,0601
180,0	,0	17,45333*	4,98632	,030	1,4566	33,4500
	60,0	13,01000	4,61643	,100	-1,8001	27,8201
	120,0	12,75000	4,61643	,111	-2,0601	27,5601

\*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Abbildung 6: Bonferroni bei Bupivacainkonzentration = 2500 ppm

Für die Versuche mit einer Bupivacainkonzentration von 5000 ppm zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen beim Vergleich der drei verschiedenen Dantrolen-Konzentrationen.

### 3.1.5. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und EPO

Die Versuche mit EPO wurden in zwei Versuchsprotokollen durchgeführt. Es gab einen Versuchsansatz mit einer Vorinkubation mit EPO in steigenden Konzentrationen von 24 Stunden und einen Ansatz mit 8 Stunden. Danach wurden die Zellen jeweils 120 Minuten mit Bupivacain in steigenden Konzentrationen inkubiert.

In der Gruppe mit 24 Stunden Inkubation von EPO zeigt sich eine Zunahme des Anteils der vitalen Zellen bei EPO in hohen Konzentrationen bei Bupivacainkonzentrationen von 1000 ppm und größer.

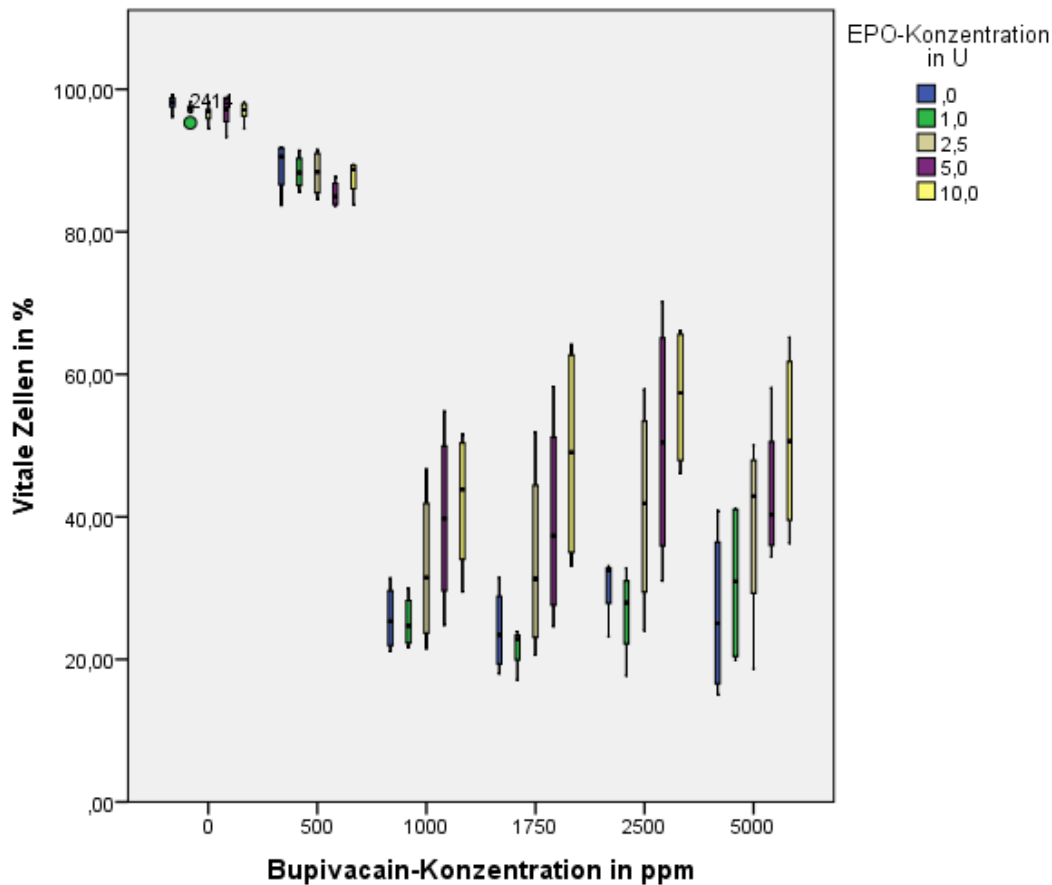


Abbildung 7: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 24 Stunden Vorinkubation mit EPO (primäre Mausmuskelzellen, n=8)

Hier zeigt sich in einer Post-Hoc-Analyse auch eine statistische Signifikanz ( $p \leq 0,05$ ) im Mittelwert der vitalen Zellen beim Vergleich der Gruppen, welche mit 0 U EPO zu denen, welche mit 5 oder 10 U EPO vorinkubiert wurden und anschließend mit Bupivacainkonzentrationen größer 500 ppm inkubiert wurden.

Die Mittelwerte des prozentualen Anteils der vitalen Zellen in der Gruppe der Zellen, welche mit Bupivacainkonzentrationen größer 500 ppm inkubiert wurden liegen bei einer Vorinkubation mit 0 U EPO für 24 Stunden bei 26,3%, bei 5 U EPO bei 43,2 % und bei 10 U EPO bei 49,6 %.

Vergleicht man die Mittelwerte der prozentualen Anteile der vitalen Zellen in den einzelnen Gruppen der verschiedenen Bupivacainkonzentrationen und verschiedenen EPO-Konzentrationen miteinander zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied der jeweiligen Mittelwerte von niedrigen zu hohen EPO-Konzentrationen.



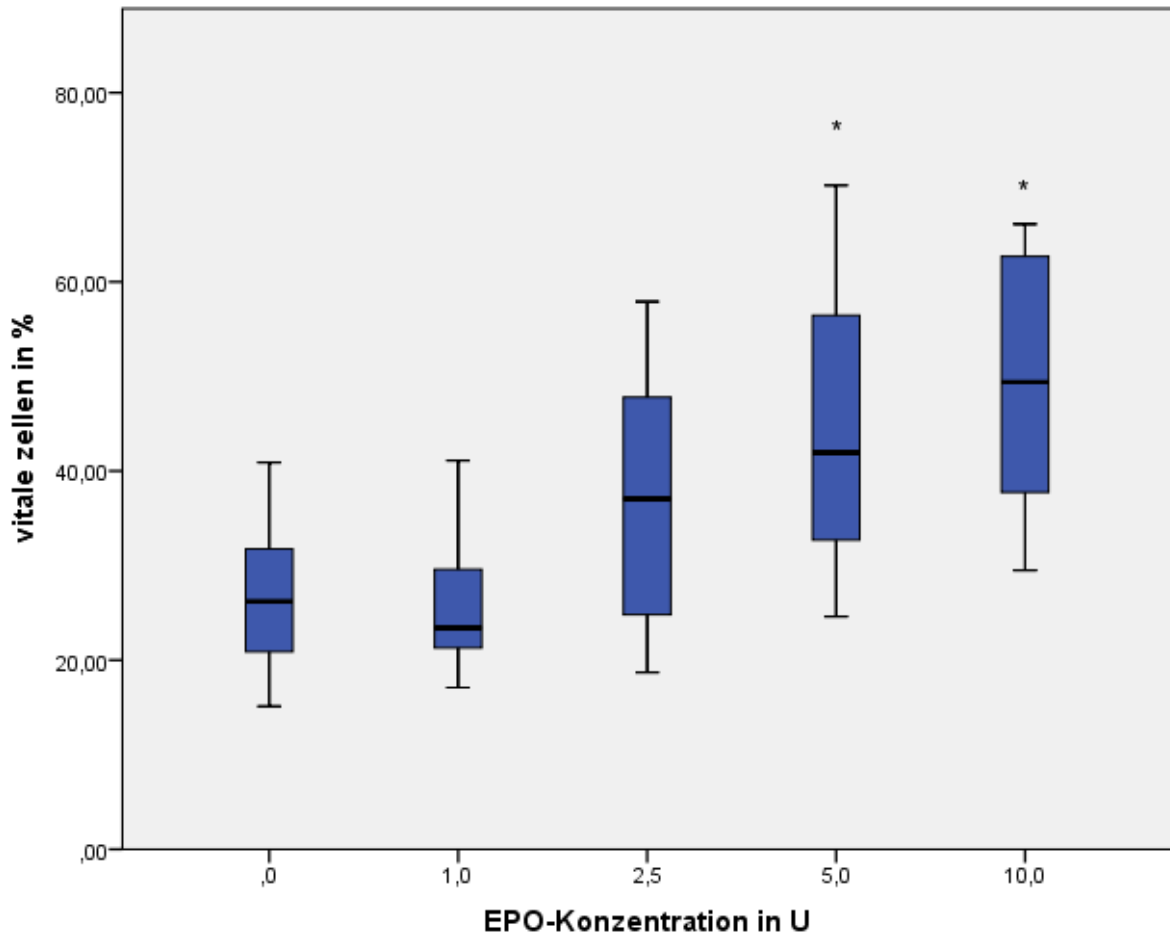


Abbildung 8: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von EPO-Konzentration bei einer Bupivacain-Konzentration > 500 ppm und einer EPO-Vorinkubation von 24 Stunden (primäre Mausmuskelzellen)

\* Differenz der Mittelwerte auf dem Niveau 0.05 signifikant gegenüber EPO-Konzentration = 0

### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: vitale zellen

Dunnett-T3

(I) EPO-Konzentration in U	(J) EPO-Konzentration in U	Mittlere Differenz (I-J)	Standard- fehler	Signifi- kanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
,0	1,0	,23125	2,59935	1,000	-7,6010	8,0635
	2,5	-10,35625	3,68086	,087	-21,6141	,9016
	5,0	-16,94375*	3,88139	,002	-28,8583	-5,0292
	10,0	-23,31875*	3,65773	,000	-34,5010	-12,1365
1,0	,0	-,23125	2,59935	1,000	-8,0635	7,6010
	2,5	-10,58750	3,65706	,073	-21,7805	,6055
	5,0	-17,17500*	3,85883	,002	-29,0306	-5,3194
	10,0	-23,55000*	3,63378	,000	-34,6667	-12,4333

2,5	,0	10,35625	3,68086	,087	-,9016	21,6141
	1,0	10,58750	3,65706	,073	-,6055	21,7805
	5,0	-6,58750	4,65646	,810	-20,5849	7,4099
	10,0	-12,96250	4,47174	,064	-26,4000	,4750
5,0	,0	16,94375 <sup>*</sup>	3,88139	,002	5,0292	28,8583
	1,0	17,17500 <sup>*</sup>	3,85883	,002	5,3194	29,0306
	2,5	6,58750	4,65646	,810	-7,4099	20,5849
	10,0	-6,37500	4,63820	,833	-20,3187	7,5687
10,0	,0	23,31875 <sup>*</sup>	3,65773	,000	12,1365	34,5010
	1,0	23,55000 <sup>*</sup>	3,63378	,000	12,4333	34,6667
	2,5	12,96250	4,47174	,064	-,4750	26,4000
	5,0	6,37500	4,63820	,833	-7,5687	20,3187

\*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Abbildung 9: Dunett-T3 bei Bupivacainkonzentration > 500 ppm

In der Versuchsreihe mit achtstündiger Vorinkubation mit EPO in steigenden Konzentrationen zeigt sich ebenfalls ein Aufwärtstrend der Mittelwerte des prozentualen Anteils der vitalen Zellen bei Bupivacainkonzentrationen größer 500 ppm und hohen EPO-Konzentrationen.

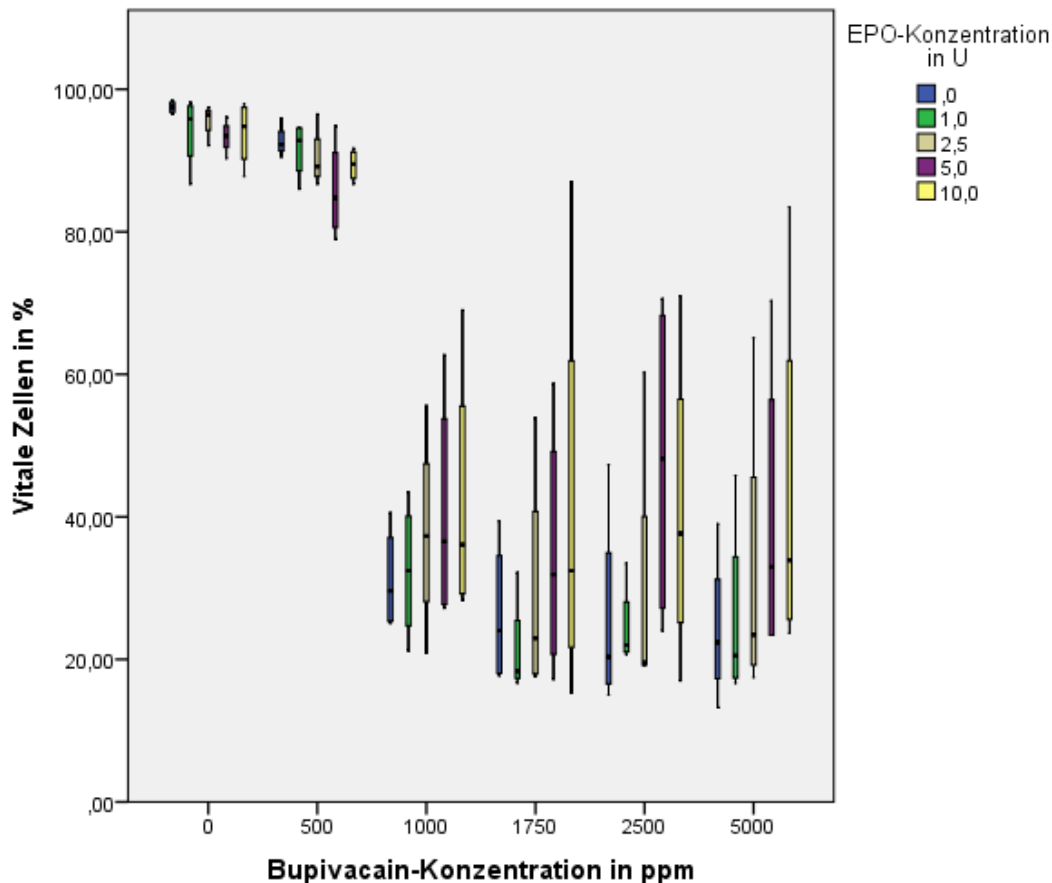


Abbildung 10: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 8 Stunden Vorinkubation mit EPO (primäre Mausmuskelzellen, n=4)

Bei 0 U EPO liegt der Mittelwert bei 26,9 % und bei 10 U EPO bei 42,2 %. Dieser Anstieg ist jedoch nicht statistisch signifikant. Auch in den einzelnen Gruppen der verschiedenen Bupivacainkonzentrationen zeigt sich kein statistisch signifikanter Anstieg der Mittelwerte der vitalen Zellen mit steigender EPO-Konzentration.

### 3.1.6. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und Fenoterol

Die Versuchsreihe mit Bupivacain und Fenoterol wurde, wie oben beschrieben, mit gleichzeitiger, 120 Minuten dauernder Inkubation von Bupivacain und Fenoterol in steigenden Konzentrationen durchgeführt.

Hier zeigt sich zunächst keine signifikante Abnahme des prozentualen Anteils der vitalen Zellen auch bei hohen Konzentrationen Fenoterol.

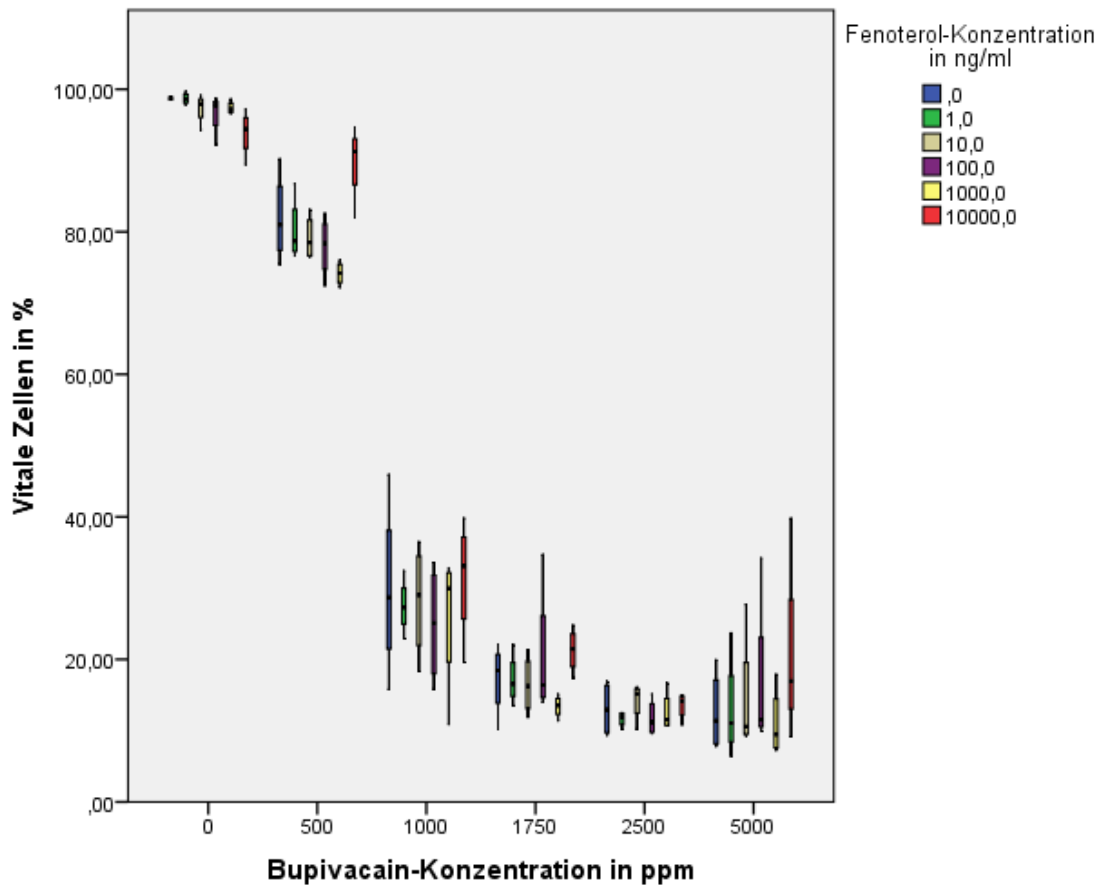


Abbildung 11: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und der Fenoterol-Konzentration (primäre Mausmuskelzellen, n=4)

In den einzelnen Gruppen der verschiedenen Bupivacainkonzentrationen findet sich kein statistisch signifikanter Unterschied des Anteils der vitalen Zellen im Vergleich der Fenoterolkonzentrationen 0 ng/ml und 10000 ng/ml.

In der Gruppe der Bupivacainkonzentration 500 ppm zeigt sich ein statistisch signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) des Anteils der vitalen Zellen im Vergleich der Fenoterolkonzentration 100 ng/ml zu 10000 ng/ml und von 1000 ng/ml zu 10000 ng/ml Fenoterol.

#### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: vitale zellen

Bonferroni

(I) Fenoterol-Konzentration in ng/ml	(J) Fenoterol-Konzentration in ng/ml	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
,0	1,0	1,70000	3,15953	1,000	-8,9804	12,3804

	10,0	2,75000	3,15953	1,000	-7,9304	13,4304
	100,0	3,97500	3,15953	1,000	-6,7054	14,6554
	1000,0	7,75000	3,15953	,369	-2,9304	18,4304
	10000,0	-7,92500	3,15953	,329	-18,6054	2,7554
1,0	,0	-1,70000	3,15953	1,000	-12,3804	8,9804
	10,0	1,05000	3,15953	1,000	-9,6304	11,7304
	100,0	2,27500	3,15953	1,000	-8,4054	12,9554
	1000,0	6,05000	3,15953	1,000	-4,6304	16,7304
	10000,0	-9,62500	3,15953	,104	-20,3054	1,0554
10,0	,0	-2,75000	3,15953	1,000	-13,4304	7,9304
	1,0	-1,05000	3,15953	1,000	-11,7304	9,6304
	100,0	1,22500	3,15953	1,000	-9,4554	11,9054
	1000,0	5,00000	3,15953	1,000	-5,6804	15,6804
	10000,0	-10,67500	3,15953	,050	-21,3554	,0054
100,0	,0	-3,97500	3,15953	1,000	-14,6554	6,7054
	1,0	-2,27500	3,15953	1,000	-12,9554	8,4054
	10,0	-1,22500	3,15953	1,000	-11,9054	9,4554
	1000,0	3,77500	3,15953	1,000	-6,9054	14,4554
	10000,0	-11,90000*	3,15953	,021	-22,5804	-1,2196
1000,0	,0	-7,75000	3,15953	,369	-18,4304	2,9304
	1,0	-6,05000	3,15953	1,000	-16,7304	4,6304
	10,0	-5,00000	3,15953	1,000	-15,6804	5,6804
	100,0	-3,77500	3,15953	1,000	-14,4554	6,9054
	10000,0	-15,67500*	3,15953	,002	-26,3554	-4,9946
10000,0	,0	7,92500	3,15953	,329	-2,7554	18,6054
	1,0	9,62500	3,15953	,104	-1,0554	20,3054
	10,0	10,67500	3,15953	,050	-,0054	21,3554
	100,0	11,90000*	3,15953	,021	1,2196	22,5804
	1000,0	15,67500*	3,15953	,002	4,9946	26,3554

\*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Abbildung 12: Bonferroni bei Bupivacainkonzentration = 500 ppm

### 3.1.7. Primäre Mausmuskelzellen mit Bupivacain und Mannitol

Die Versuchsreihe mit Mannitol und Bupivacain wurde durchgeführt, um einen Effekt von Mannitol auf die Myotoxizität von Bupivacain auf Muskelzellen auszuschließen. Mannitol ist in der klinisch verwendeten Dantrolen-Lösung in höheren Konzentrationen (50 mg/ml) vorhanden.

Hier zeigt sich in keiner der Untergruppen der unterschiedlichen Bupivacainkonzentrationen ein Unterschied des prozentualen Anteils der vitalen Zellen in den verschiedenen verglichenen Mannitolkonzentrationen. Es zeigt sich lediglich ein mit steigender Bupivacainkonzentration abnehmender Anteil vitaler Zellen.

## 3.2. C2C12-Zellen

### 3.2.1. C2C12-Zellen mit Bupivacain und ACC

Die Versuchsreihe mit C2C12-Zellen, Bupivacain und ACC wurde wie oben dargestellt durchgeführt.

In den Gruppen mit einer Inkubation mit 0 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1750 ppm, 2500 ppm und 5000 ppm Bupivacain zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Anteil der vitalen Zellen über die verschiedenen ACC-Konzentrationen.

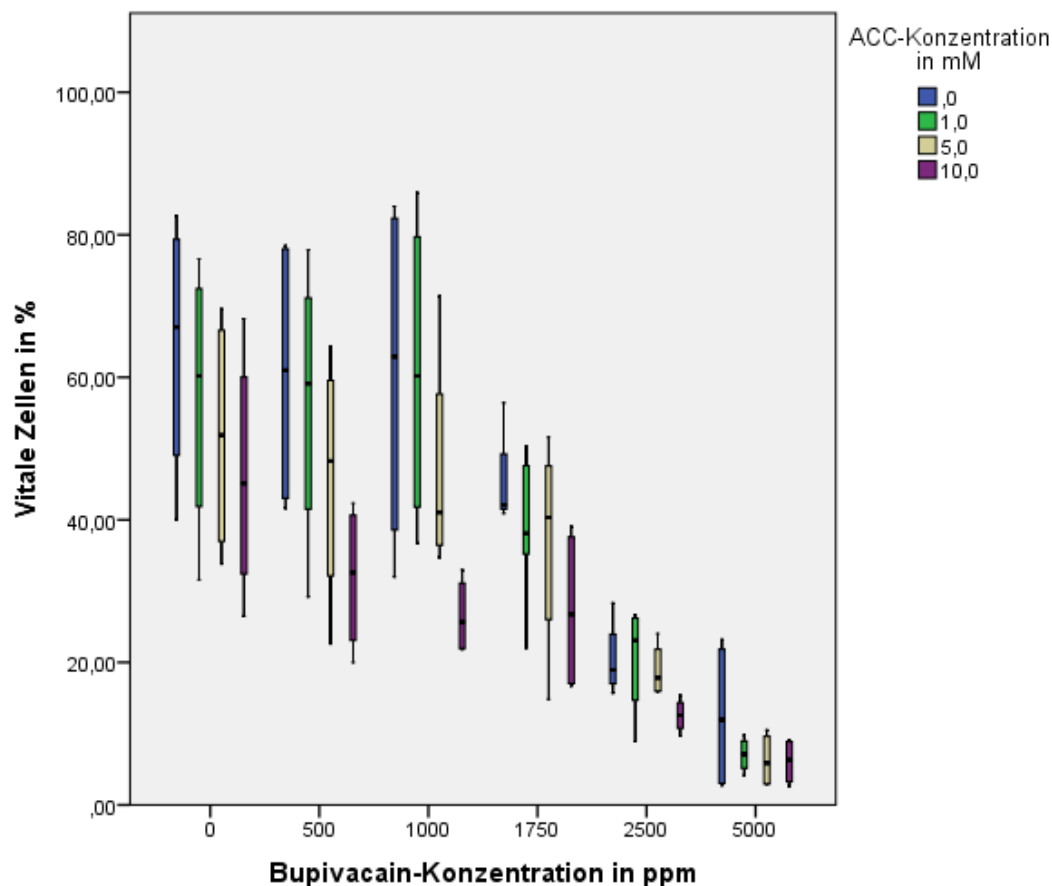


Abbildung 13: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und ACC-Konzentration (C2C12-Zellen, n=4)

### 3.2.2. C2C12-Zellen mit Bupivacain und Atorvastatin

Die Durchführung der Versuche mit der C2C12-Zellreihe, Bupivacain und Atorvastatin in aufsteigenden Konzentrationen erfolgte wie oben beschrieben.

Bei einer Konzentration von 0 ppm Bupivacain ergibt sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen über die verschiedenen Atorvastatin-Konzentrationen.

In der Gruppe mit einer Bupivacainkonzentration von 500 ppm zeigt sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen von 0  $\mu\text{M}$  Atorvastatin zu 250  $\mu\text{M}$  Atorvastatin.

### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: vitale zellen

Bonferroni

(I) Atorvastatin-Konzentration in $\mu\text{M}$	(J) Atorvastatin-Konzentration in $\mu\text{M}$	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
,0	,5	,73333	1,59739	1,000	-4,5240	5,9907
	1,0	1,07000	1,67536	1,000	-4,4440	6,5840
	10,0	4,76667	1,59739	,112	-,4907	10,0240
	50,0	2,48333	1,59739	1,000	-2,7740	7,7407
	100,0	2,08333	1,59739	1,000	-3,1740	7,3407
	250,0	6,23000*	1,67536	,016	,7160	11,7440
,5	,0	-,73333	1,59739	1,000	-5,9907	4,5240
	1,0	,33667	1,67536	1,000	-5,1773	5,8506
	10,0	4,03333	1,59739	,348	-1,2240	9,2907
	50,0	1,75000	1,59739	1,000	-3,5074	7,0074
	100,0	1,35000	1,59739	1,000	-3,9074	6,6074
	250,0	5,49667	1,67536	,051	-,0173	11,0106
1,0	,0	-1,07000	1,67536	1,000	-6,5840	4,4440
	,5	-,33667	1,67536	1,000	-5,8506	5,1773
	10,0	3,69667	1,67536	,723	-1,8173	9,2106
	50,0	1,41333	1,67536	1,000	-4,1006	6,9273
	100,0	1,01333	1,67536	1,000	-4,5006	6,5273
	250,0	5,16000	1,74985	,122	-,5992	10,9192
10,0	,0	-4,76667	1,59739	,112	-10,0240	,4907
	,5	-4,03333	1,59739	,348	-9,2907	1,2240
	1,0	-3,69667	1,67536	,723	-9,2106	1,8173
	50,0	-2,28333	1,59739	1,000	-7,5407	2,9740
	100,0	-2,68333	1,59739	1,000	-7,9407	2,5740
	250,0	1,46333	1,67536	1,000	-4,0506	6,9773
50,0	,0	-2,48333	1,59739	1,000	-7,7407	2,7740
	,5	-1,75000	1,59739	1,000	-7,0074	3,5074
	1,0	-1,41333	1,67536	1,000	-6,9273	4,1006
	10,0	2,28333	1,59739	1,000	-2,9740	7,5407
	100,0	-,40000	1,59739	1,000	-5,6574	4,8574



	250,0	3,74667	1,67536	,676	-1,7673	9,2606
100,0	,0	-2,08333	1,59739	1,000	-7,3407	3,1740
	,5	-1,35000	1,59739	1,000	-6,6074	3,9074
	1,0	-1,01333	1,67536	1,000	-6,5273	4,5006
	10,0	2,68333	1,59739	1,000	-2,5740	7,9407
	50,0	,40000	1,59739	1,000	-4,8574	5,6574
	250,0	4,14667	1,67536	,391	-1,3673	9,6606
	250,0	,0	-6,23000*	1,67536	,016	-11,7440
250,0	,5	-5,49667	1,67536	,051	-11,0106	,0173
	1,0	-5,16000	1,74985	,122	-10,9192	,5992
	10,0	-1,46333	1,67536	1,000	-6,9773	4,0506
	50,0	-3,74667	1,67536	,676	-9,2606	1,7673
	100,0	-4,14667	1,67536	,391	-9,6606	1,3673

\*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Abbildung 14: Bonferroni bei Bupivacainkonzentration 500 ppm

Bei Inkubation mit einer 1000 ppm Bupivacainlösung zeigt sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen bei einem Vergleich von 5 µM Atorvastatin zu 250 µM Atorvastatin.

Beträgt die Bupivacainkonzentration 1750 ppm, 2500 ppm oder 5000 ppm lässt sich kein signifikanter Unterschied des Anteils der vitalen Zellen zwischen den Gruppen der Atorvastatin-Konzentrationen feststellen.

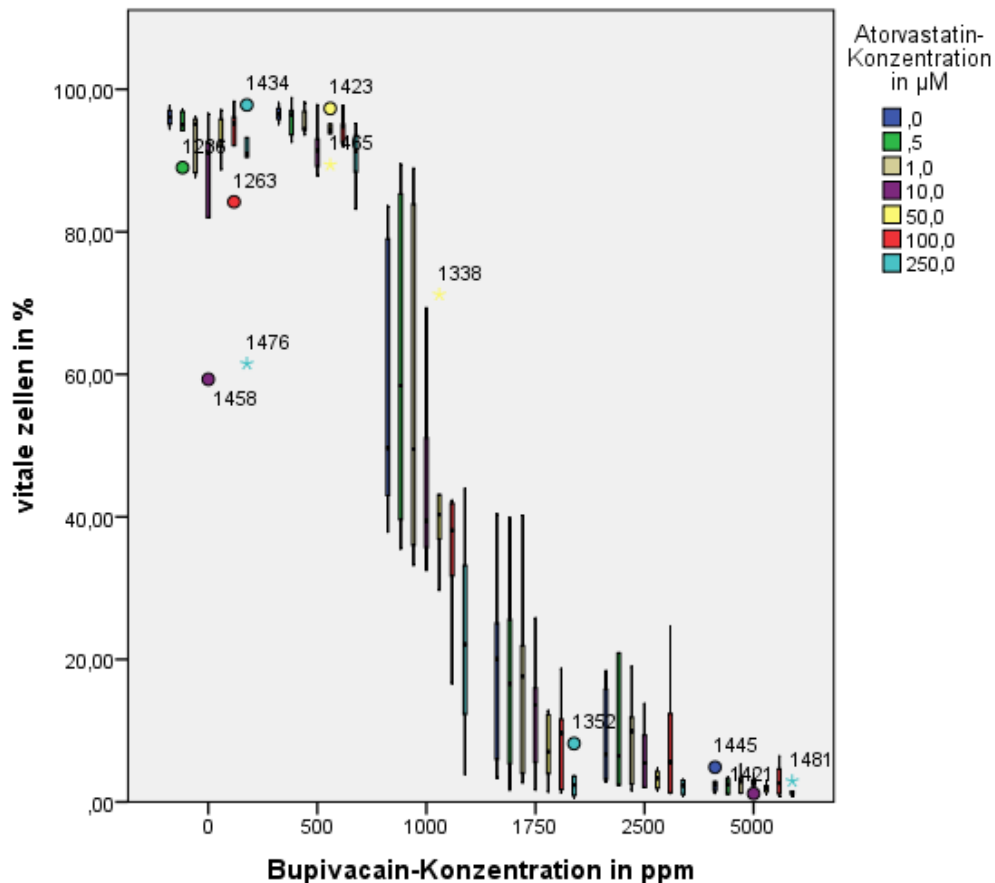


Abbildung 15: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und Atorvastatin-Konzentration (C2C12-Zellen, n=6)

### 3.2.3. C2C12-Zellen mit Bupivacain und BAPTA/AM

Die Versuchsreihen mit BAPTA/AM und Bupivacain an C2C12-Zellen wurden, wie oben beschrieben, in zwei Ansätzen durchgeführt. Ein Ansatz mit einer Konzentrationsreihe BAPTA/AM und ein Ansatz mit einer Zeitreihe der Vorinkubation mit BAPTA/AM.

Bei den Versuchen mit einer Konzentrationsreihe von BAPTA/AM zeigt sich bei einer Bupivacainkonzentration von 0 ppm keine Änderung des Anteils der vitalen Zellen. Bei einer Bupivacainkonzentration von 500 ppm lässt sich ein Rückgang des Anteils der vitalen Zellen beim Vergleich von 0 µM BAPTA/AM zu 100 µM BAPTA/AM, 30 µM BAPTA/AM zu 100 µM BAPTA/AM und 50 µM BAPTA/M zu 100 µM BAPTA/AM feststellen. Beträgt die Konzentration der Bupivacainlösung 1000 ppm, so zeigt sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen im Vergleich von 0 µM oder 30 µM BAPTA/AM zu 100 µM BAPT/AM. Bei den höheren

Bupivacainkonzentrationen von 1750 ppm, 2500 ppm und 5000 ppm ergibt sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen über den verschiedenen Konzentrationen von BAPTA/AM.

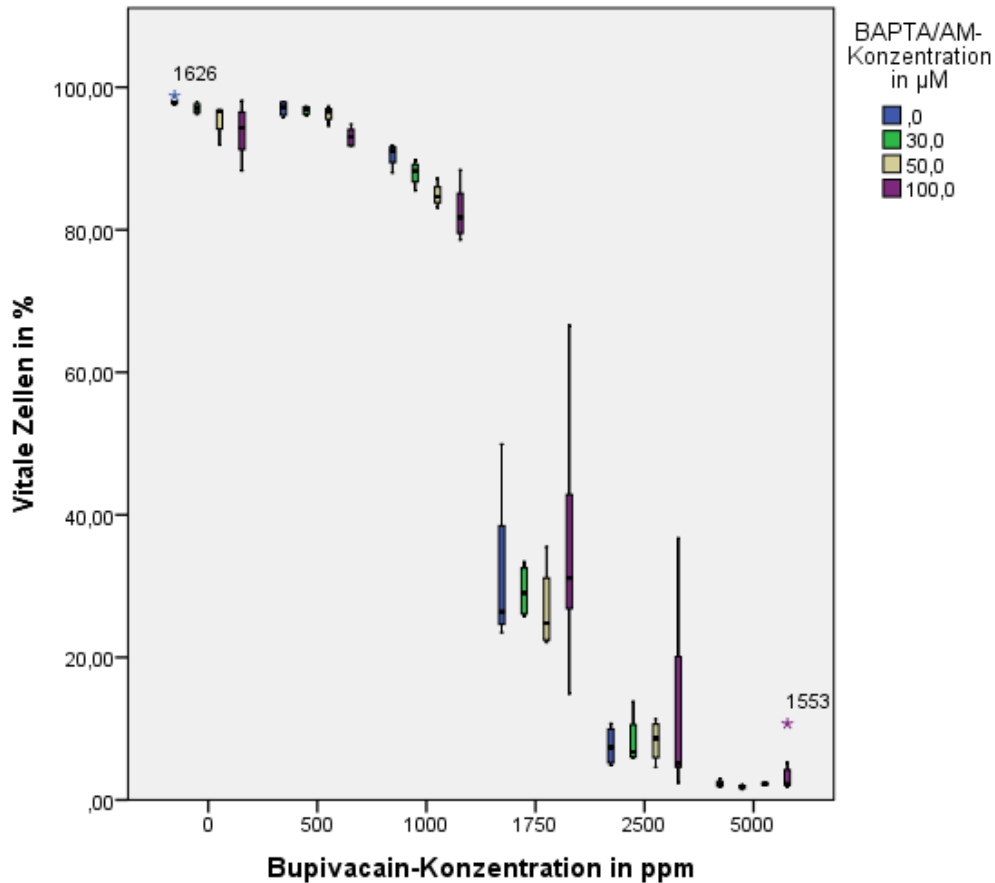


Abbildung 16: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und BAPTA/AM-Konzentration bei 30 Minuten Vorinkubation mit BAPTA/AM (C2C12-Zellen, n=4)

Bei den Versuchen mit einer Zeitreihe bei der Vorinkubation mit BAPTA/AM ist bei einer Bupivacainkonzentration von 0 ppm keine Änderung des Anteils der vitalen Zellen über den unterschiedlichen BAPTA/AM-Inkubationszeiten feststellbar. Ist die Konzentration der Bupivacainlösung bei 500 ppm, so zeigt sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen beim Vergleich von 30 Minuten Vorinkubationszeit mit BAPTA/AM zu 60 Minuten und eine signifikante Zunahme des Anteils der vitalen Zellen beim Vergleich von 60 Minuten Vorinkubationszeit mit BAPTA/AM zu 120 Minuten. Bei einer Bupivacainkonzentration von 1000 ppm ergibt sich ein signifikanter Rückgang des Anteils der vitalen Zellen beim Vergleich von 30 Minuten Vorinkubationszeit mit BAPTA/AM zu 60 Minuten Vorinkubationszeit. In den Gruppen der höheren Bupivacainkonzentrationen (1750 ppm, 2500 ppm, 5000 ppm)

zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen über den drei verschiedenen Vorinkubationszeiten mit BAPTA/AM.

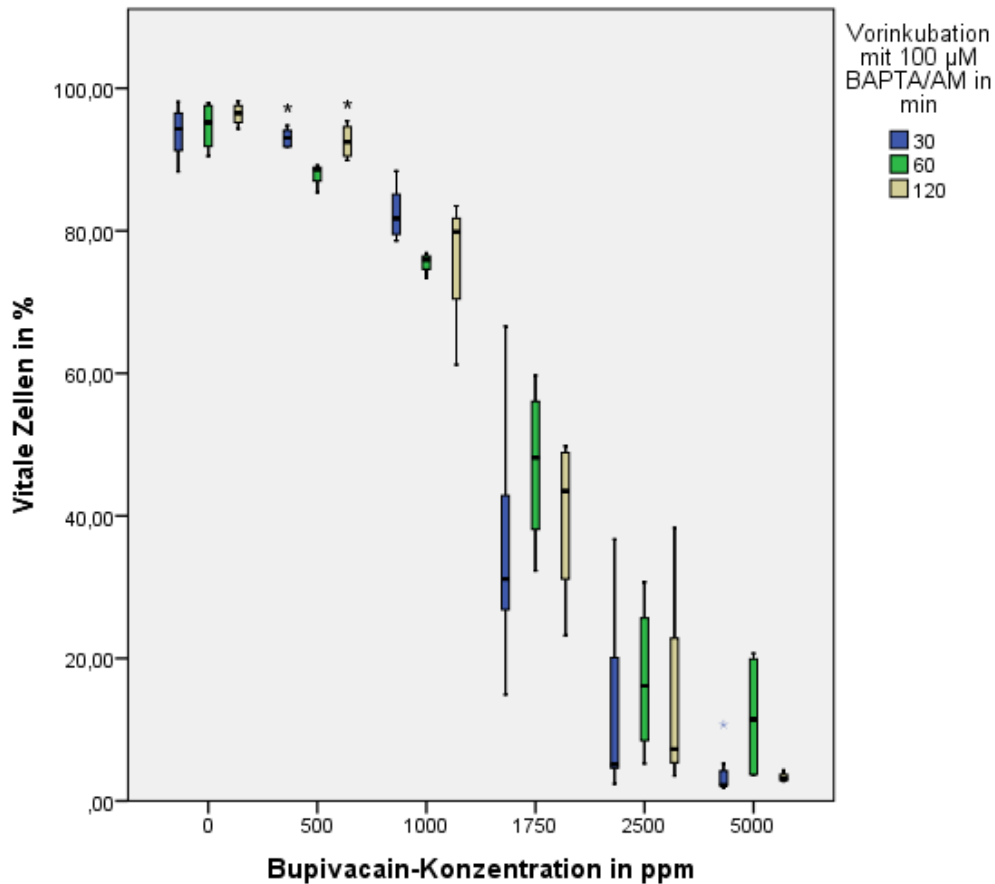


Abbildung 17: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain-Konzentration und der Vorinkubationszeit mit 100 µM BAPTA/AM (C2C12-Zellen, n=4)

\* Differenz der Mittelwerte auf dem Niveau 0.05 signifikant gegenüber Vorinkubation mit BAPTA/AM 100 µM = 60 min

### 3.2.4. C2C12-Zellen mit Bupivacain und Dantrolen

Die Versuche mit Bupivacain und Dantrolen an den C2C12-Zellen wurden wie in Teil 2 besprochen durchgeführt.

Bei den Bupivacainkonzentration 0 ppm und 500 ppm lassen sich keine signifikanten Unterschiede im Anteil der vitalen Zellen über den Gruppen der verschiedenen Dantrolen-Konzentrationen feststellen.

Bei einer Inkubation mit einer 1000 ppm Bupivacainlösung zeigt sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen im Vergleich 0 µM Dantrolen zu 180 µM Dantrolen.

In der Gruppe der Zellen, welche mit 1750 ppm, 2500 ppm oder 5000 ppm Bupivacain inkubiert wurden finden sich wiederum keine signifikanten Unterschiede im Anteil der vitalen Zellen bezogen auf die verschiedenen Dantrolen-Konzentrationen.

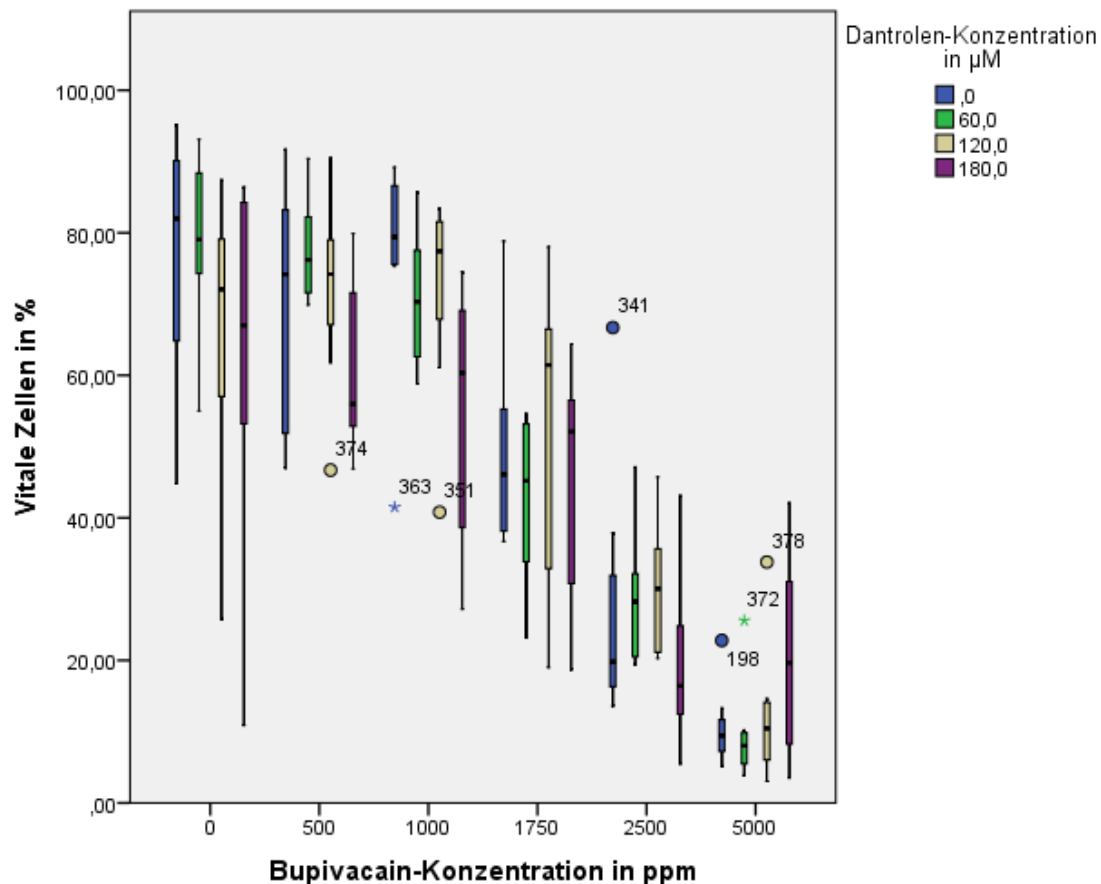


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und Dantrolen-Konzentration (C2C12-Zellen, n=8)

### 3.2.5. C2C12-Zellen mit Bupivacain und EPO

Die Versuchsreihe mit EPO und Bupivacain an den C2C12-Zellen wurde wie oben beschrieben in zwei Ansätzen mit einer 8-stündigen und einer 24-stündigen Vorinkubation mit EPO und anschließender 120-minütiger Inkubation mit Bupivacain durchgeführt.

In der Versuchsreihe mit vierundzwanzig Stunden Vorinkubation mit steigenden Konzentrationen EPO und anschließender Inkubation der Zellen mit steigenden Konzentrationen Bupivacain zeigt sich bei keiner der Bupivacainkonzentrationen ein

signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen bei den verschiedenen EPO-Konzentrationen von 0 U bis 10 U.

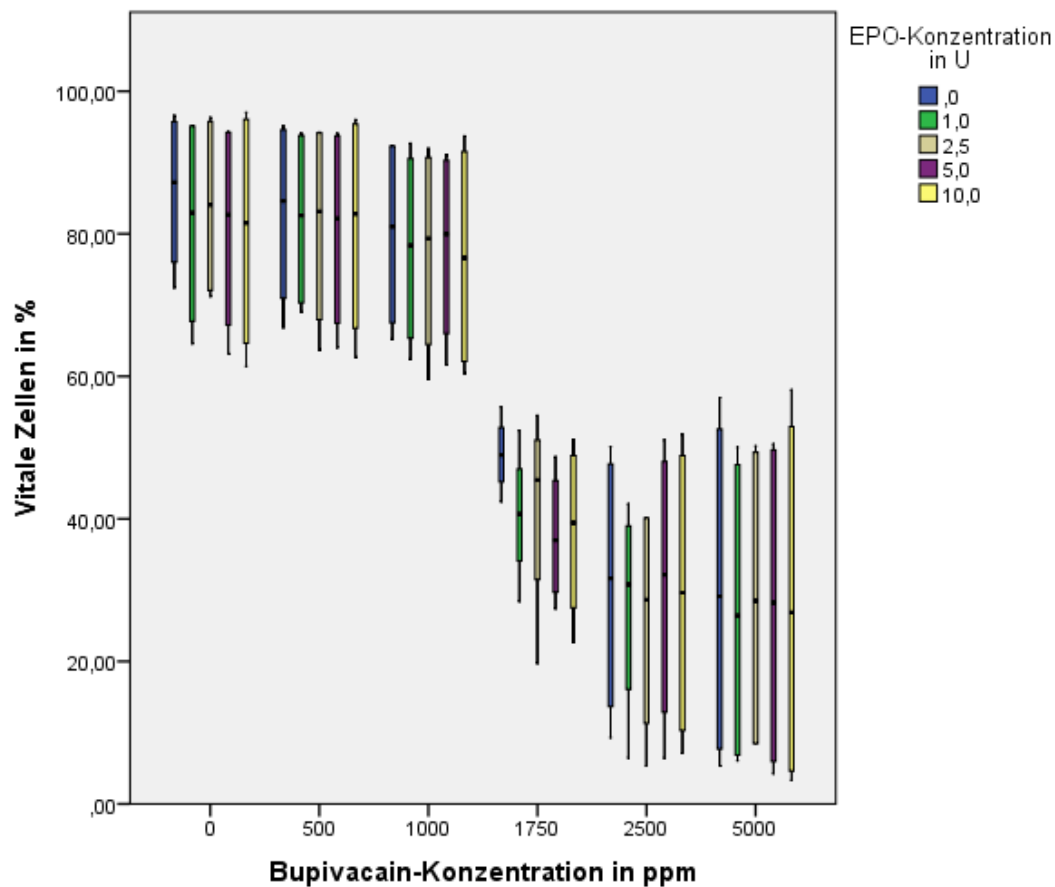


Abbildung 19: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 24 Stunden Vorinkubation mit EPO (C2C12-Zellen, n=4)

Auch bei einer Vorinkubation von acht Stunden mit EPO und darauffolgender Inkubation mit Bupivacain für 120 Minuten, jeweils in steigenden Konzentrationen, lässt sich in keiner der Gruppen unterschiedlicher Konzentrationen von Bupivacain ein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen in den verschiedenen EPO-Konzentrationen feststellen.

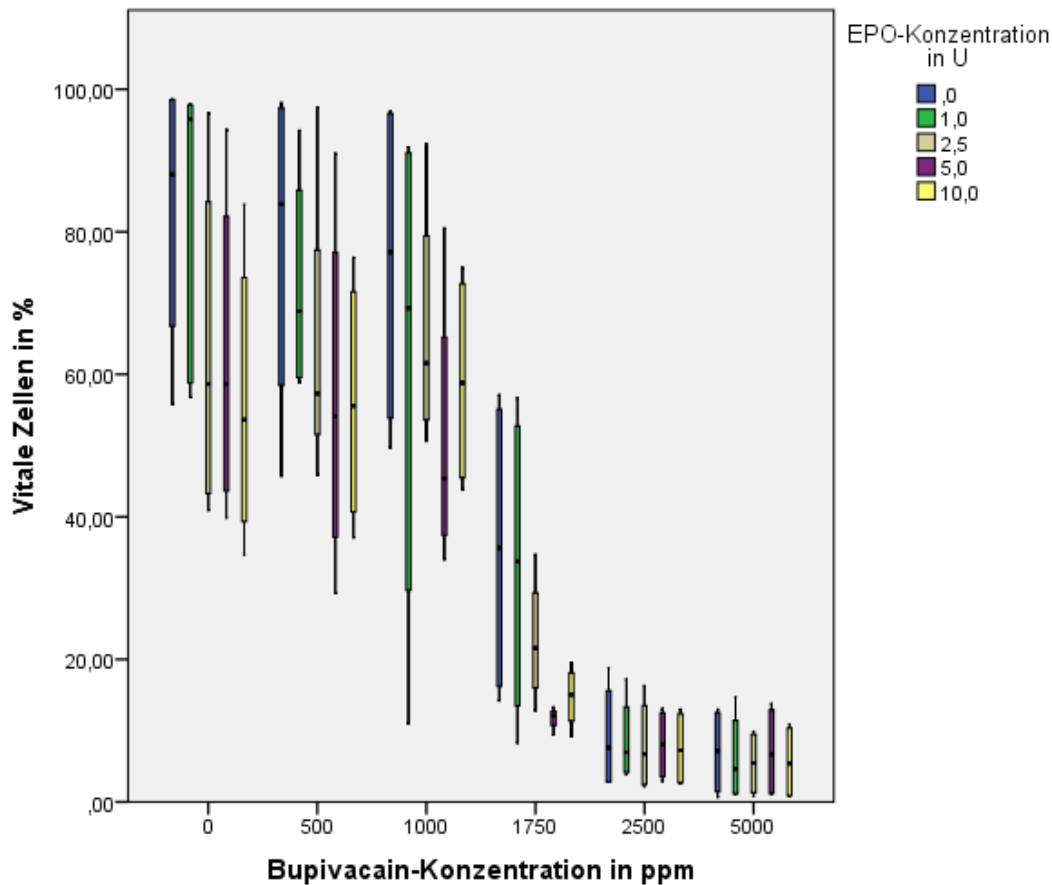


Abbildung 20: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 8 Stunden Vorinkubation mit EPO (C2C12-Zellen, n=4)

### 3.2.6. C2C12-Zellen mit Bupivacain und Fenoterol

Die Versuche an der C2C12-Zellreihe mit Bupivacain und Fenoterol in steigenden Konzentrationen wurden wie oben erläutert durchgeführt.

Bei einer Bupivacainkonzentration von 0 ppm ist kein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen über den verschiedenen Fenoterol-Konzentrationen festzustellen.

Beträgt die Bupivacainkonzentration 500 ppm, so findet sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen beim Vergleich der Fenoterol-Konzentration 10 ng/ml zu 10000 ng/ml.

Bei den Bupivacainkonzentrationen 1000 ppm und 1750 ppm lässt sich kein signifikanter Unterschied des Anteils der vitalen Zellen zwischen den Gruppen der verschiedenen Fenoterol-Konzentrationen feststellen.

Bei einer Inkubation mit 2500 ppm Bupivacain findet sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen im Vergleich 0 ng/ml Fenoterol zu 1000 ng/ml Fenoterol und ein signifikanter Anstieg des Anteils der vitalen Zellen im Vergleich 100 ng/ml Fenoterol zu 10000 ng/ml Fenoterol und 1000 ng/ml Fenoterol zu 10000 ng/ml Fenoterol.

#### Bericht

vitale zellen

Fenoterol-Konzentration in ng/ml	Mittelwert	N	Standardabweichung
,0	31,6000	4	9,81733
1,0	32,3667	3	8,37636
10,0	20,6400	5	7,95129
100,0	11,8800	4	5,07427
1000,0	9,7375	4	3,26923
10000,0	34,5500	4	15,33069
Insgesamt	22,9738	24	12,87977

Abbildung 21: Mittelwerte des prozentualen Anteils der vitalen Zellen in den verschiedenen Fenoterol-Konzentrationen bei Bupivacainkonzentration = 2500 ppm

Bei einer Bupivacainkonzentration von 5000 ppm zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen über die unterschiedlichen Fenoterol-Konzentrationen.

#### 3.2.7. C2C12-Zellen mit Bupivacain und Mannitol

Die Versuche mit Bupivacain und Mannitol an den C2C12-Zellen wurden wie oben beschrieben durchgeführt (n=2). Wie bereits unter 3.1.7. erläutert um einen Effekt von Mannitol auszuschließen.

Bei keiner der sechs getesteten Bupivacainkonzentrationen ergibt sich ein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen über die verschiedenen Mannitol-Konzentrationen.



### 3.3. A673-Zellen

#### 3.3.1. A673-Zellen mit Bupivacain und ACC

Die Versuchsreihe an den A673-Rhabdomyosarkomzellen mit Bupivacain und ACC wurde wie oben beschrieben ausgeführt.

Bei den Bupivacainkonzentrationen 0 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1750 ppm, 2500 ppm und 5000 ppm ergeben sich keine signifikanten Unterschiede im Anteil der vitalen Zellen über die verschiedenen ACC-Konzentrationen.

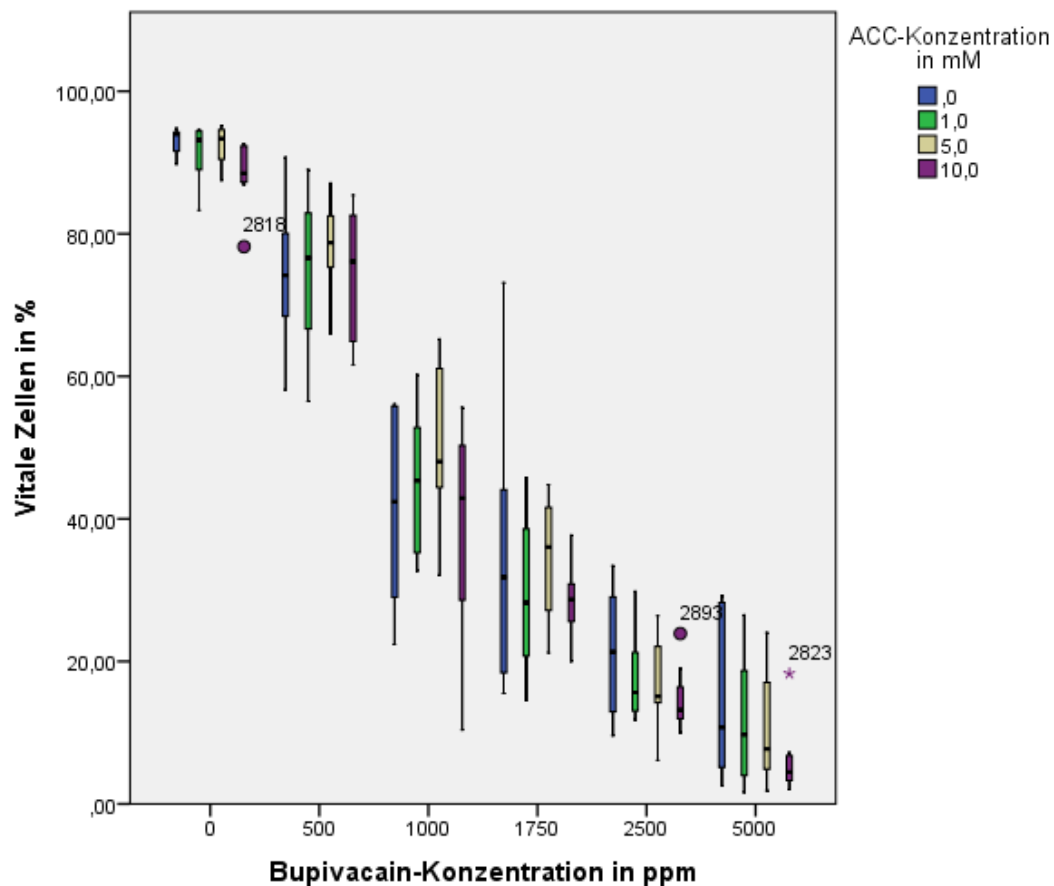


Abbildung 22: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen In Abhängigkeit von Bupivacain- und ACC-Konzentration (A673-Zellen, n=8)

### 3.3.2. A673-Zellen mit Bupivacain und Atorvastatin

Die Versuche mit A673-Zellen, Bupivacain und Atorvastatin wurde wie oben beschrieben mit gleichzeitiger Inkubation für 120 Minuten in jeweils steigenden Konzentrationen durchgeführt.

Erfolgte die Inkubation der A673-Zellen mit den verschiedenen Atorvastatinkonzentrationen und 0 ppm oder 500 ppm Bupivacain, so zeigt sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen über die Atorvastatinkonzentrationen.

Bei einer Bupivacainkonzentration von 1000 ppm findet sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen beim Vergleich von 0  $\mu\text{M}$  Atorvastatin gegen 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Atorvastatin. Ebenso verhält es sich beim Vergleich von 0,5  $\mu\text{M}$  Atorvastatin gegen 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  Atorvastatin gegen 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Atorvastatin und 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin gegen 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 250  $\mu\text{M}$  Atorvastatin. Auch von 50  $\mu\text{M}$  Atorvastatin zu 250  $\mu\text{M}$  Atorvastatin zeigt sich noch eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen.

#### Mehrfachvergleiche

Abhängige Variable: vitale zellen

Bonferroni

(I) Atorvastatin-Konzentration in $\mu\text{M}$	(J) Atorvastatin-Konzentration in $\mu\text{M}$	Mittlere Differenz (I-J)	Standardfehler	Signifikanz	95%-Konfidenzintervall	
					Untergrenze	Obergrenze
,0	,5	-7,77500	4,85732	1,000	-24,5483	8,9983
	1,0	4,17500	4,85732	1,000	-12,5983	20,9483
	10,0	12,32500	4,85732	,402	-4,4483	29,0983
	50,0	29,50000*	4,85732	,000	12,7267	46,2733
	100,0	35,87500*	4,85732	,000	19,1017	52,6483
	250,0	50,27500*	4,85732	,000	33,5017	67,0483
,5	,0	7,77500	4,85732	1,000	-8,9983	24,5483
	1,0	11,95000	4,85732	,475	-4,8233	28,7233
	10,0	20,10000*	4,85732	,010	3,3267	36,8733
	50,0	37,27500*	4,85732	,000	20,5017	54,0483
	100,0	43,65000*	4,85732	,000	26,8767	60,4233
	250,0	58,05000*	4,85732	,000	41,2767	74,8233
1,0	,0	-4,17500	4,85732	1,000	-20,9483	12,5983
	,5	-11,95000	4,85732	,475	-28,7233	4,8233
	10,0	8,15000	4,85732	1,000	-8,6233	24,9233

	50,0	25,32500*	4,85732	,001	8,5517	42,0983
	100,0	31,70000*	4,85732	,000	14,9267	48,4733
	250,0	46,10000*	4,85732	,000	29,3267	62,8733
10,0	,0	-12,32500*	4,85732	,402	-29,0983	4,4483
	,5	-20,10000*	4,85732	,010	-36,8733	-3,3267
	1,0	-8,15000	4,85732	1,000	-24,9233	8,6233
	50,0	17,17500*	4,85732	,041	,4017	33,9483
	100,0	23,55000*	4,85732	,002	6,7767	40,3233
	250,0	37,95000*	4,85732	,000	21,1767	54,7233
50,0	,0	-29,50000*	4,85732	,000	-46,2733	-12,7267
	,5	-37,27500*	4,85732	,000	-54,0483	-20,5017
	1,0	-25,32500*	4,85732	,001	-42,0983	-8,5517
	10,0	-17,17500*	4,85732	,041	-33,9483	-,4017
	100,0	6,37500	4,85732	1,000	-10,3983	23,1483
	250,0	20,77500*	4,85732	,007	4,0017	37,5483
100,0	,0	-35,87500*	4,85732	,000	-52,6483	-19,1017
	,5	-43,65000*	4,85732	,000	-60,4233	-26,8767
	1,0	-31,70000*	4,85732	,000	-48,4733	-14,9267
	10,0	-23,55000*	4,85732	,002	-40,3233	-6,7767
	50,0	-6,37500	4,85732	1,000	-23,1483	10,3983
	250,0	14,40000	4,85732	,155	-2,3733	31,1733
250,0	,0	-50,27500*	4,85732	,000	-67,0483	-33,5017
	,5	-58,05000*	4,85732	,000	-74,8233	-41,2767
	1,0	-46,10000*	4,85732	,000	-62,8733	-29,3267
	10,0	-37,95000*	4,85732	,000	-54,7233	-21,1767
	50,0	-20,77500*	4,85732	,007	-37,5483	-4,0017
	100,0	-14,40000	4,85732	,155	-31,1733	2,3733

\*. Die Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant.

Abbildung 23: Bonferroni bei Bupivacain 1000 ppm (A673, Atorvastatin); n=4

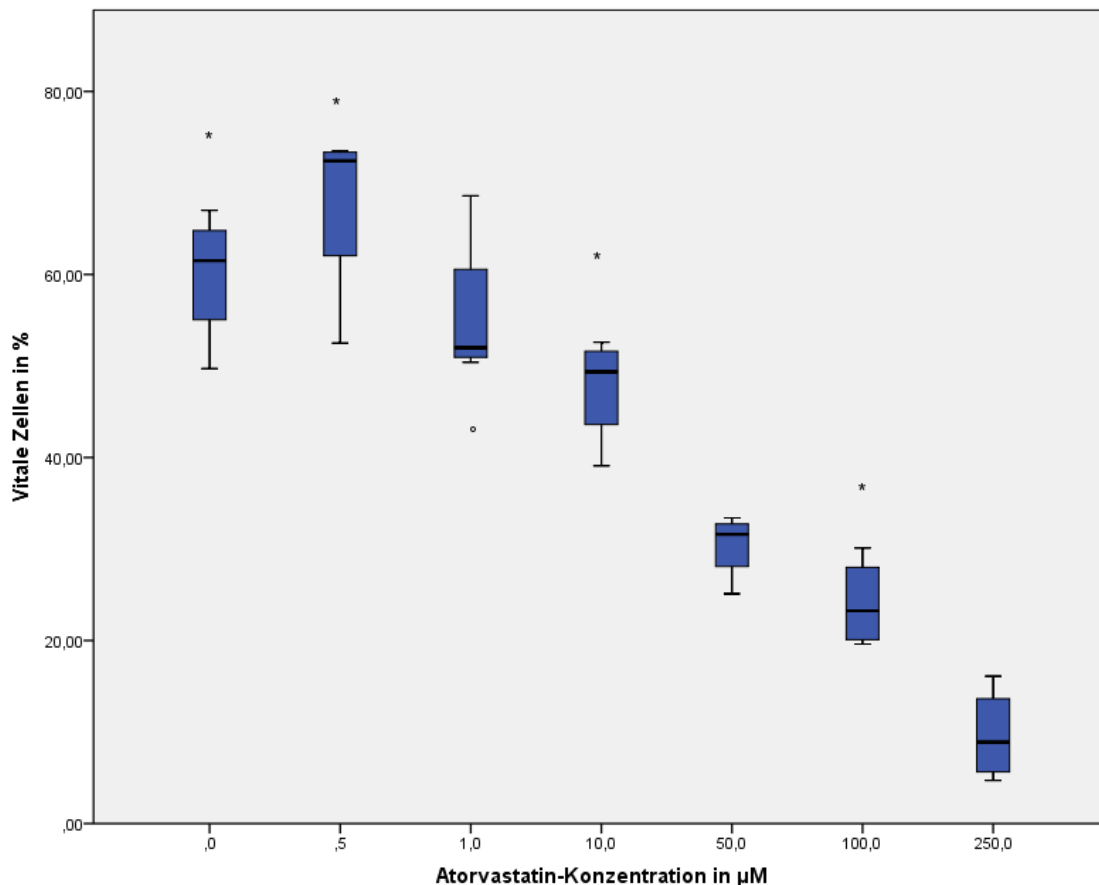


Abbildung 24: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Atorvastatinkonzentration bei 1000 ppm Bupivacain (A673-Zellen)

\* Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant gegenüber Atorvastatin-Konzentration = 250 µM  
 ° Differenz der Mittelwerte ist auf dem Niveau 0.05 signifikant gegenüber Atorvastatin-Konzentration = 50 µM

Bei einer Bupivacainkonzentration von 1750 ppm ist ebenfalls eine Abnahme des Anteils der vitalen Zellen im Vergleich 0 µM Atorvastatin zu 250 µM Atorvastatin, 0,5 µM Atorvastatin zu 250 µM Atorvastatin, 1 µM Atorvastatin zu 50 µM, 100 µM und 250 µM Atorvastatin und 10 µM Atorvastatin zu 250 µM Atorvastatin feststellbar.

Beträgt die Bupivacainkonzentration 2500 ppm, so zeigt sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen von 0 µM Atorvastatin gegenüber 50 µM, 100 µM und 250 µM Atorvastatin. Ebenfalls zeigt sich diese Abnahme in den Gruppen 0,5 µM Atorvastatin gegenüber 50 µM, 100 µM und 250 µM, 1 µM Atorvastatin gegenüber 100 µM und 250 µM Atorvastatin und 10 µM Atorvastatin gegenüber 100 µM und 250 µM Atorvastatin.

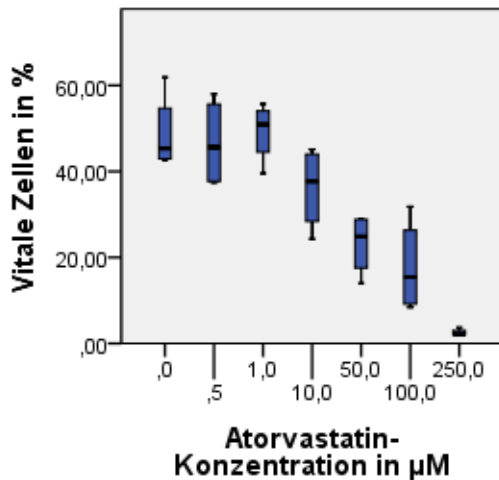


Abbildung 25: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Atorvastatinkonzentration bei 1750 ppm Bupivacain (A673-Zellen)

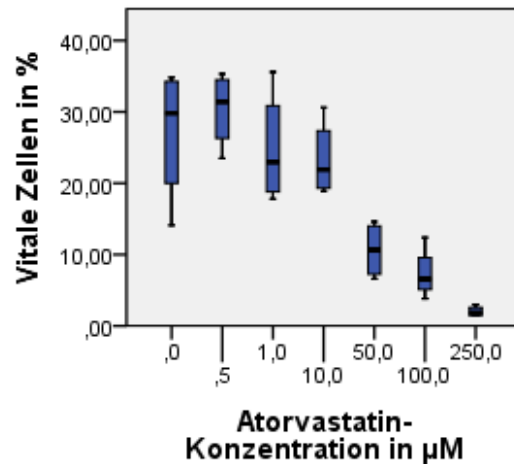


Abbildung 26: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Atorvastatinkonzentration bei 2500 ppm Bupivacain (A673-Zellen)

Bei einer Bupivacainkonzentration von 5000 ppm zeigt sich keine signifikante Änderung des Anteils der vitalen Zellen über die verschiedenen Atorvastatinkonzentrationen.

### 3.3.3. A673-Zellen mit Bupivacain und BAPTA/AM

Die Versuche mit BAPTA/AM und Bupivacain an A673-Zellen wurden, wie in Teil zwei beschrieben, in einem Ansatz mit einer Konzentrationsreihe BAPTA/AM durchgeführt und in einem anderen Ansatz mit einer Zeitreihe der Vorinkubation mit BAPTA/AM.

Bei den Versuchen mit der Konzentrationsreihe BAPTA/AM mit 30 Minuten Vorinkubation und anschließender Inkubation mit Bupivacainlösung in steigender Konzentration zeigt sich bei 0 ppm und 500 ppm Bupivacain keine Änderung des Anteils der vitalen Zellen über die vier BAPTA/AM-Konzentrationen. Bei einer Bupivacainkonzentration von 1000 ppm zeigt sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen im Vergleich 0 µM BAPTA/AM zu 50 µM BAPTA/AM. Bei den weiteren Bupivacainkonzentrationen (1750 ppm, 2500 ppm und 5000 ppm) findet sich kein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen über die BAPTA/AM-Konzentrationen.

In den Versuchen mit einer Zeitreihe für die Vorinkubation mit BAPTA/AM lässt sich in allen sechs verschiedenen Bupivacainkonzentrationen keine Änderung des Anteils der vitalen Zellen bei einer Vorinkubation mit BAPTA/AM für 30, 60 oder 120 Minuten feststellen.

#### **3.3.4. A673-Zellen mit Bupivacain und Dantrolen**

Die Versuchsreihe an den A673-Rhabdomyosarkomzellen mit Bupivacain und Dantrolen wurde wie oben erläutert mit gleichzeitiger Inkubation für 120 Minuten in steigenden Konzentrationen beider Substanzen durchgeführt.

Bei einer Bupivacainkonzentration von 0 ppm lässt sich eine signifikante Abnahme des Anteils der vitalen Zellen beim Vergleich von 0  $\mu$ M Dantrolen zu 180  $\mu$ M Dantrolen und beim Vergleich von 60  $\mu$ M Dantrolen zu 180  $\mu$ M Dantrolen feststellen.

Beträgt die Bupivacainkonzentration 500 ppm, 1000 ppm, 1750 ppm, 2500 ppm oder 5000 ppm so zeigen sich keine signifikanten Unterschiede im Anteil der vitalen Zellen über die Gruppen der verschiedenen Dantrolen-Konzentrationen.

#### **3.3.5. A673-Zellen mit Bupivacain und EPO**

Die Versuche mit EPO und Bupivacain an den A673-Zellen wurden, wie oben besprochen, in zwei Ansätzen mit einer Vorinkubation von EPO von acht Stunden oder 24 Stunden und anschließender Inkubation mit Bupivacain für 120 Minuten durchgeführt.

Wurde für 24 Stunden mit EPO behandelt und im Anschluss mit Bupivacain in steigender Konzentration für 120 Minuten, so zeigen sich keine signifikanten Änderungen im Anteil der vitalen Zellen über die verschiedenen EPO-Konzentrationen.

Auch bei einer Vorinkubation mit EPO in steigenden Konzentrationen für 8 Stunden und darauffolgender Inkubation mit Bupivacain in steigenden Konzentrationen für 120 Minuten ergeben sich keine signifikanten Änderungen im Anteil der vitalen Zellen in den Gruppen unterschiedlicher Bupivacainkonzentrationen über die Gruppen unterschiedlicher EPO-Konzentrationen.

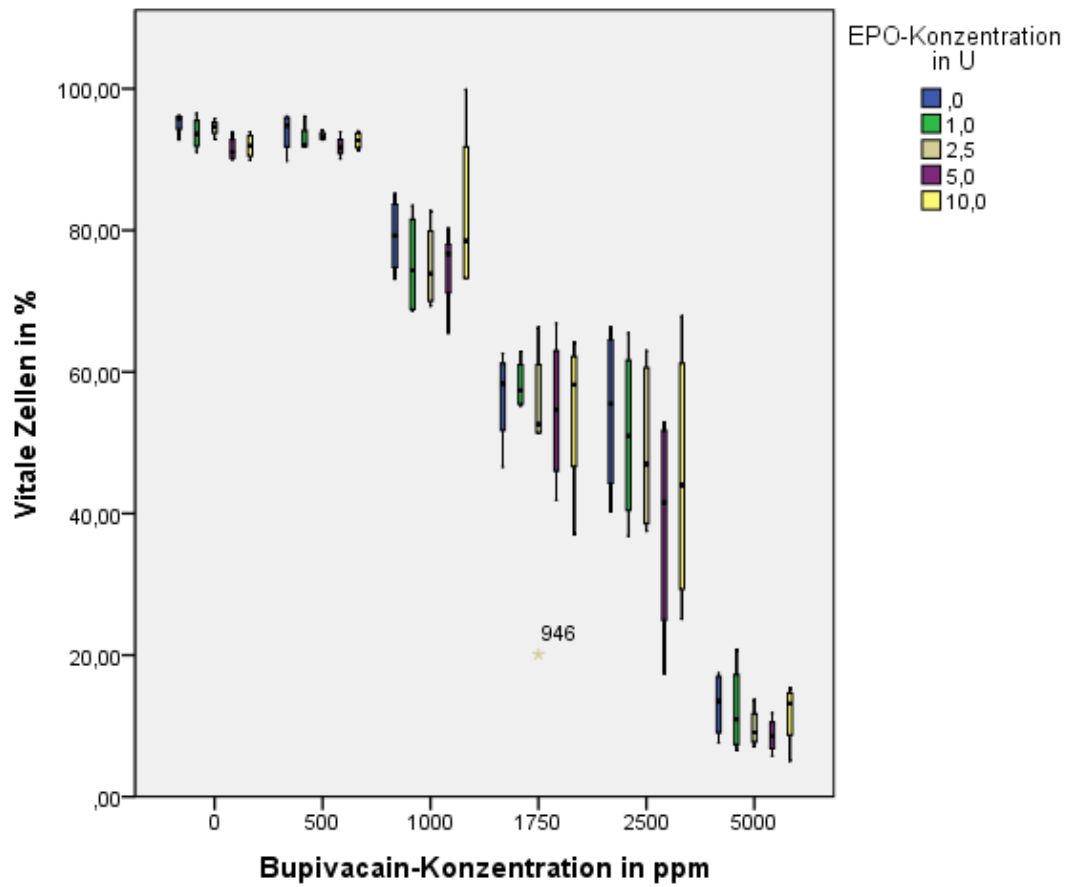


Abbildung 27: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 24 Stunden Vorinkubation mit EPO (A673-Zellen, n=4)

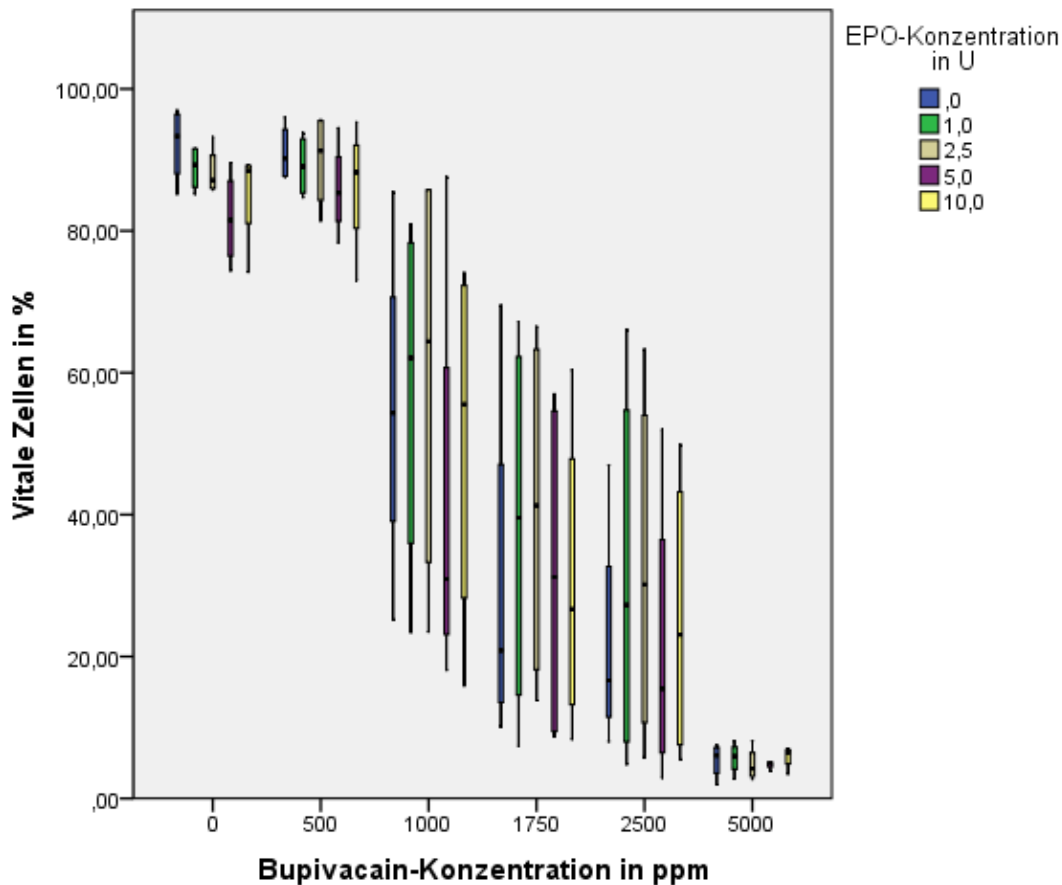


Abbildung 28: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 8 Stunden Vorinkubation mit EPO (A673-Zellen, n=4)

### 3.3.6. A673-Zellen mit Bupivacain und Fenoterol

Die Versuchsreihe an A673-Rhabdomyosarkomzellen mit Bupivacain und Fenoterol wurde wie oben beschrieben mit zeitgleicher Inkubation der Zellen mit beiden Medikamenten in steigender Konzentration durchgeführt.

Werden die A673-Zellen mit steigenden Konzentrationen Fenoterol und Bupivacainlösung der Konzentrationen 0 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1750 ppm oder 2500 ppm inkubiert, so sind keine signifikanten Unterschiede des Anteils der vitalen Zellen zwischen den Gruppen der verschiedenen Fenoterol-Konzentrationen innerhalb einer Bupivacainkonzentration feststellbar.

Bei einer Inkubation der A673-Zellen mit 5000 ppm Bupivacain und Fenoterol in steigenden Konzentrationen ergibt sich ein signifikanter Rückgang des Anteils der vitalen Zellen von 0 ng/ml Fenoterol zu 100 ng/ml Fenoterol.



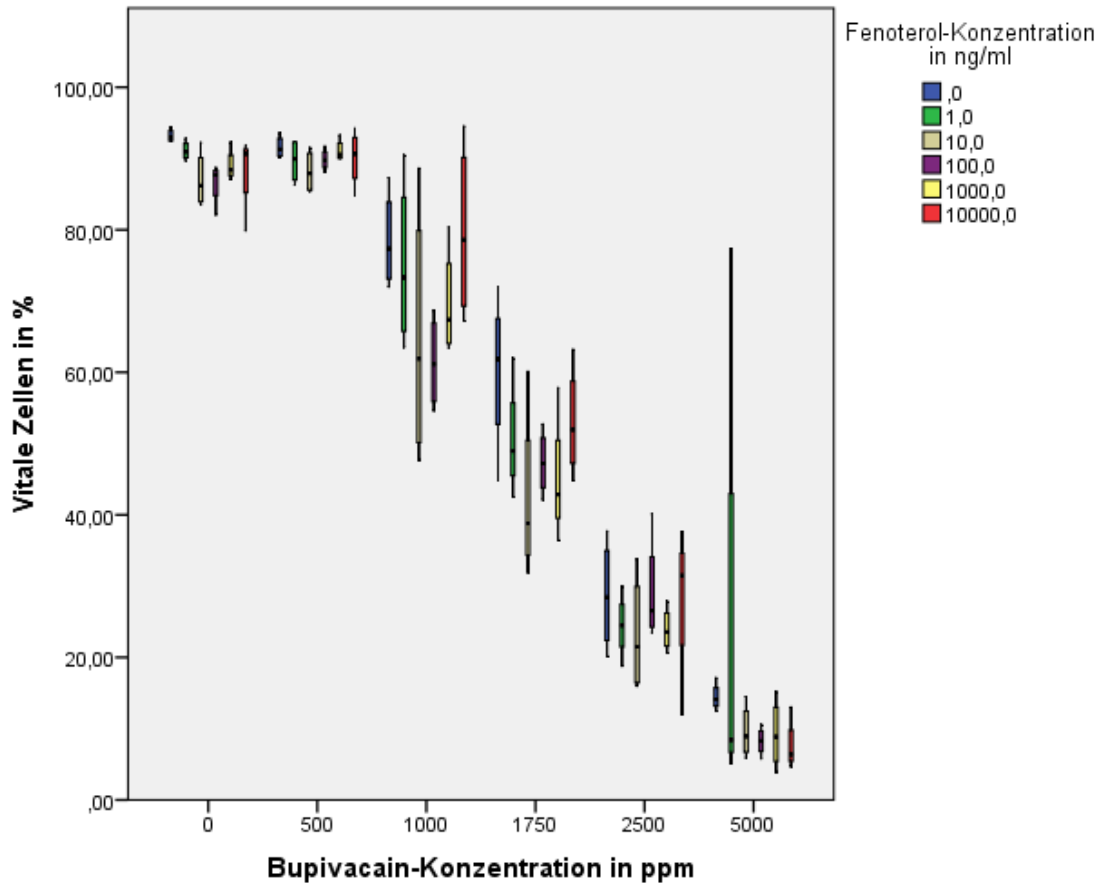


Abbildung 29: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und Fenoterol-Konzentration (A673-Zellen, n=4)

### 3.3.7. A673-Zellen mit Bupivacain und Mannitol

Auch bei den A673-Zellen wurde eine Versuchsreihe mit Bupivacain und Mannitol durchgeführt, um einen Effekt von Mannitol auszuschließen. Die Durchführung erfolgte wie oben beschrieben.

In keiner der Gruppen der sechs Bupivacainkonzentrationen (0 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, 1750 ppm, 2500 ppm und 5000 ppm) zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Anteil der vitalen Zellen zwischen den Gruppen der vier getesteten Mannitol-Konzentrationen.

## **4. Diskussion**

Den myo- und neurotoxischen Auswirkungen von Lokalanästhetika wird in den letzten Jahren mehr Beachtung geschenkt. Jedoch ist der Mechanismus über welchen Lokalanästhetika zum Zelltod führen noch nicht ausreichend geklärt. Auch klinisch erlangt dieses Problem mehr Aufmerksamkeit, da Lokalanästhetika einen weit verbreitenden Einsatz finden. Beschriebene Auswirkungen der direkten Gewebstoxizität von Lokalanästhetika sind persistierende Doppelbilder nach Retrobulbärblockaden und Schädigungen von Gelenkknorpel und Bandscheiben bei kontinuierlicher Lokalanästhetikaapplikation [12, 30, 22]. Das Lokalanästhetikum Bupivacain erwies sich in vielen Studien als das Lokalanästhetikum mit dem größten myotoxischen Potential, welches bereits in klinisch relevanten Dosierungen zu ausgeprägten Schäden an Muskelzellen führt [27, 13]. In dieser Arbeit soll gezeigt werden inwieweit sich die Myotoxizität von Bupivacain in-vitro auf drei verschiedene Muskelzelllinien durch Zusatz unterschiedlicher Medikamente modulieren lässt.

### **4.1. Verwertbarkeit des Zellmodells**

Bei den untersuchten Zellmodellen handelte es sich um primäre Mausmuskelzellen, welche in unserem Labor aus Wildtyp-Mäusen isoliert und kultiviert wurden, einer immortalisierten Mausmuskelzellreihe (C2C12-Zellen) und humane Rhabdomyosarkomzellen (A673-Zellen).

In der Durchführung der Untersuchungen zeigte sich bei allen drei untersuchten Zelllinien ein gutes Überleben über die Dauer des Versuches, wenn es zu keiner Exposition mit Bupivacain kam. Der Mittelwert der vitalen Zellen beträgt bei den primären Mausmuskelzellen 96,1 %, bei den A673-Zellen 93,5% und bei den C2C12-Zellen 86,2%. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass es sich um qualitativ hochwertige Zellmodelle mit guter Reproduzierbarkeit handelt.

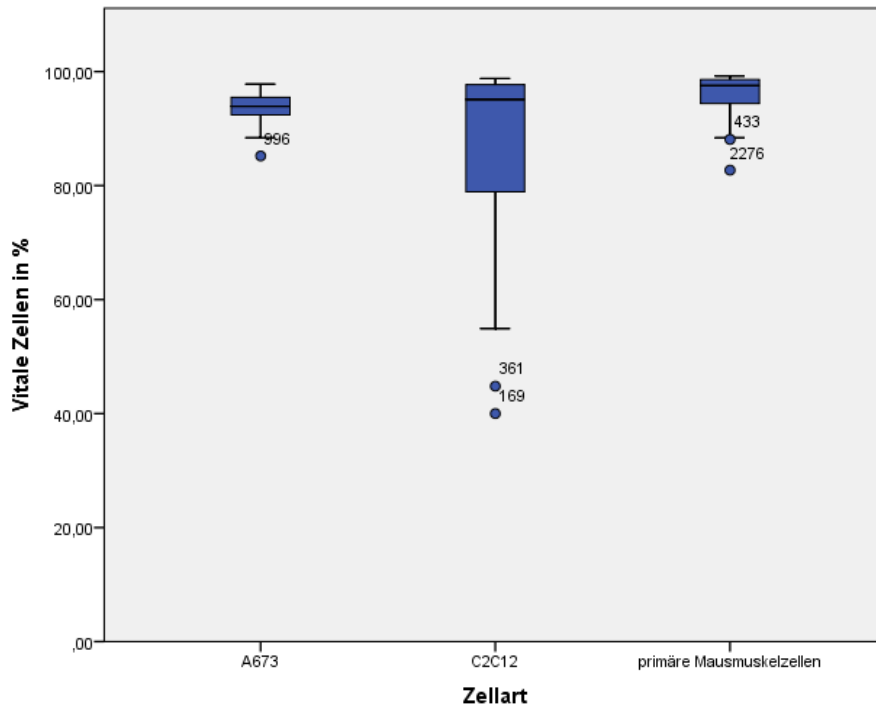
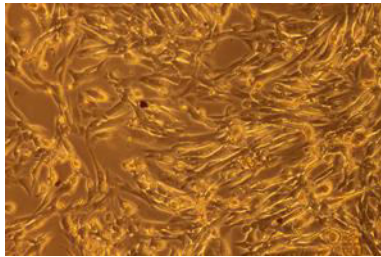
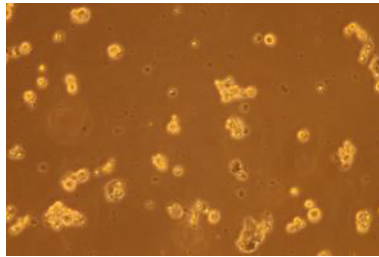


Abbildung 30: Anteil der vitalen Zellen in den verschiedenen Zellreihen zum Zeitpunkt der Durchflusszytometrie ohne Inkubation mit Bupivacain oder anderem Medikament

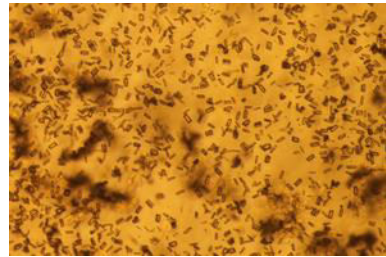
In der Durchführung dieser Untersuchungen ergab sich als einer der limitierenden Faktoren die Löslichkeit von Bupivacain in den Zellkulturmedien. Bei hohen Bupivacainkonzentrationen, vor allem bei 5000 ppm, kam es trotz pH-Wert-Einstellung mittels HCl im Lauf der Inkubationszeiten zur deutlichen Ausfällung von Bupivacain, wodurch die Endkonzentration in der Lösung, welche tatsächlich auf die Zellen wirkt, nicht klar zu definieren ist. (Siehe Abbildung 31)



Primäre Mausmuskelzellen mit 0 ppm Bupivacain nach 120 min



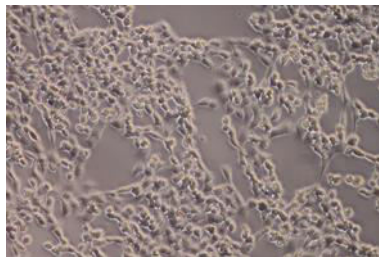
Primäre Mausmuskelzellen mit 1000 ppm Bupivacain nach 120 min



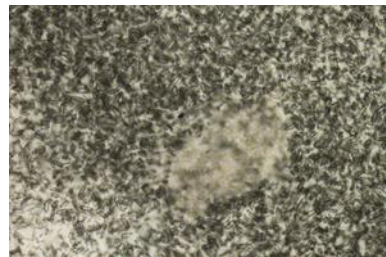
Primäre Mausmuskelzellen mit 5000 ppm Bupivacain nach 120 min



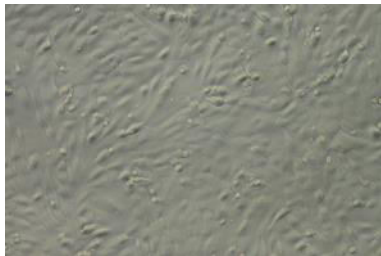
A673-Zellen mit 0 ppm Bupivacain nach 120 min



A673-Zellen mit 1000 ppm Bupivacain nach 120 min



A673-Zellen mit 5000 ppm Bupivacain nach 120 min



C2C12-Zellen mit 0 ppm Bupivacain nach 120 min



C2C12-Zellen mit 1000 ppm Bupivacain nach 120 min



C2C12-Zellen mit 5000 ppm Bupivacain nach 120 min

Abbildung 31: Fotos der verschiedenen Zellreihen nach 120 Minuten Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen Bupivacain.

## 4.2. Reaktion der Zellen auf Bupivacain

Wie bereits in vorausgegangenen Arbeiten gezeigt werden konnte, steigt der Anteil der apoptotischen Mausmuskelzellen mit zunehmender Bupivacainkonzentration. [23] Die primären Mausmuskelzellen zeigen sich bereits im mittleren Konzentrationsbereich sehr empfindlich gegenüber Bupivacain. Bei einer Bupivacainkonzentration von 1000 ppm zeigte sich hier ein Anteil der PI-negativen Zellen von <30%.

Für die immortalisierten C2C12-Zellen konnte bereits eine niedrigere Empfindlichkeit gegenüber den myotoxischen Effekten von Bupivacain und Ropivacain im Vergleich zu primären Mausmuskelzellen gezeigt werden [13]. Bei einer Bupivacainkonzentration von 1000 ppm zeigte sich hier ein Anteil der PI-negativen Zellen von 75,8%. Die Theorie hinter dieser Beobachtung ist, dass die immortalisierten Zellen eine Möglichkeit haben die Apoptose zu umgehen [13]. Bei höheren Bupivacainkonzentrationen zeigen sich allerdings auch die C2C12-Zellen empfindlich gegenüber den myotoxischen Einflüssen von Bupivacain. So zeigt sich bei einer Bupivacainkonzentration von 5000 ppm ein Anteil der PI-negativen Zellen von 10,4%.

Bei den A673-Rhandomyosarkomzellen zeigt sich im mittleren Konzentrationsbereich von Bupivacain (1000 ppm) eine im Vergleich zu den primären Mausmuskelzellen erniedrigte Empfindlichkeit auf Bupivacain. Der PI-negative Anteil der Zellen beträgt weniger als 60%. Auch hier liegt die Annahme, dass diese Zellen Möglichkeiten haben die bupivacaininduzierte Apoptose, zumindest im mittleren Konzentrationsbereich zu umgehen nahe. Bei höheren Bupivacainkonzentrationen zeigen sich allerdings auch Rhabdomyosarkomzellen empfindlich gegenüber dem myotoxischen Einfluss von Bupivacain. Dadurch, dass Rhabdomyosarkomzellen nicht zu adulten Muskelzellen differenzieren und keine umfangreichen intrazellulären Kalziumspeicher besitzen [41] ist hier der kalziumvermittelte Effekt unwahrscheinlicher. Aufgrund der schnellen Zellteilung der A673-Zellen haben diese Zellen einen erhöhten Energiebedarf [9].

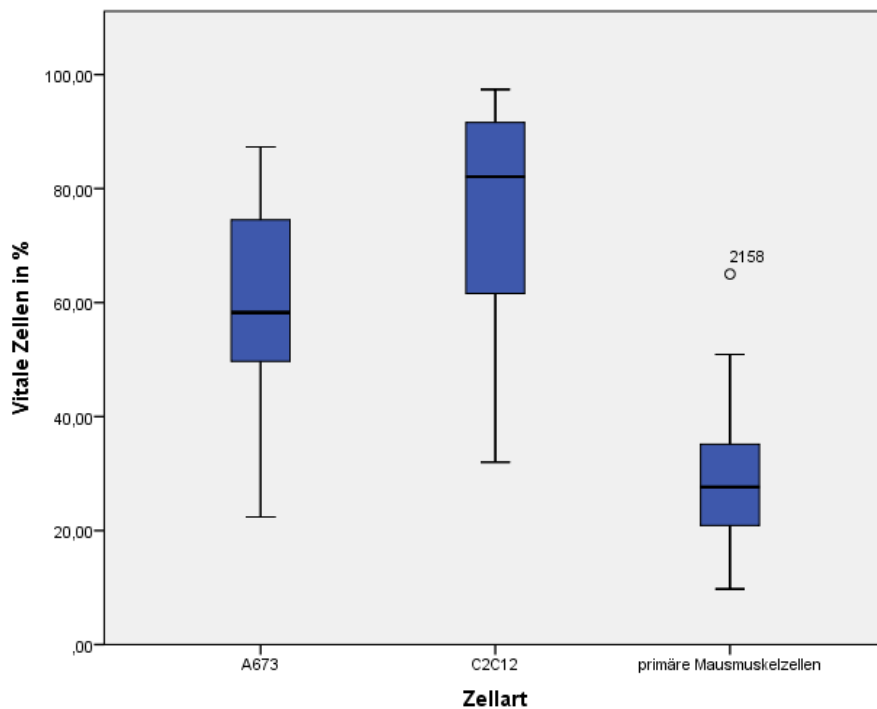


Abbildung 32: Anteil der vitalen Zellen in allen drei untersuchten Zellreihen bei einer Bupivacainkonzentration von 1000 ppm ohne zugesetzte Medikamente

### 4.3. Reaktion der Zellen auf ACC

Der in mehreren Studien vorbeschriebene protektive Effekt von Acetylcystein (ACC) auf mit Bupivacain behandelte Muskelzellen wird darauf zurückgeführt, dass die so induzierte Apoptose durch reactive oxygen species (ROS), welche wiederum SR-Stress verursachen, ausgelöst wird. Es wurde festgestellt, dass sich in humanen Muskelzellen bei Bupivacainexposition zeit- und konzentrationsabhängig mehr aktivierte Caspase 7 und 9 nachweisen lassen, wobei die aktivierte Caspase 7 in der ER/SR-Stress verursachten Apoptose eine Rolle spielt [11]. Zudem lies sich ein Wachstumsvorteil von mit ACC behandelten L6-Myoblasten feststellen, welche mit Bupivacain exponiert wurden. Auch diese Beobachtung wird auf die antioxidative Wirkung von ACC zurückgeführt [18]. In dieser Untersuchung lässt sich der vorbeschriebene protektive Effekt von ACC auf mit Bupivacain behandelte Muskelzellen nicht nachweisen. Bei allen drei Zellreihen ist keine statistisch signifikante Zunahme des Anteils der vitalen Zellen durch Inkubation mit ACC zusätzlich zu Bupivacain zu beobachten. Die in den vorangegangenen Studien

verwendeten Konzentrationen von ACC sind ähnlich zu den hier Untersuchten. Einen bedeutenden Unterschied stellen die untersuchten Zellreihen dar. Bei Galbes et al. wurden humane Myotuben untersucht und bei Kim et al. L6-Myoblasten, keine differenzierten Muskelzellen mit großen intrazellulären Kalziumspeichern. Möglicherweise verhalten sich die hier untersuchten primären Mausmuskelzellen, immortalisierten Mausmuskelzellen und humanen Rhabdomyosarkomzellen in Bezug auf oxidativen Stress und die damit verbundenen Angriffspunkte von ACC anders als die zuvor untersuchten Zelllinien. Außerdem erfolgte die Inkubation mit ACC und Bupivacain bei Galbes et al. für 18 Stunden, nicht für 120 Minuten wie in den hier durchgeführten Untersuchungen [11]. Auch hier könnte die Dauer der Exposition mit ACC eine entscheidende Rolle spielen. Um das mögliche protektive Potential von ACC auf mit Bupivacain behandelte Muskulatur zu klären und damit auch die Beteiligung von ROS an der Myotoxizität von Bupivacain oder anderen Lokalanästhetika zu untersuchen sind weitere Studien notwendig.

#### **4.4. Reaktion der Zellen auf Atorvastatin**

Es ist weitläufig bekannt, dass eine der Nebenwirkungen von Statinen Myalgien bis hin zur Rhabdomyolyse sind. Auch hierfür werden verschiedenen pathophysiologische Mechanismen diskutiert. Einerseits wird wahrscheinlich die Membranfluidität in Muskelzellen durch den verminderten Cholesterolspiegel verändert [25], wodurch sich die Eigenschaften verschiedener transmembranärer Ionenkanäle ändern. Dies wiederum beeinflusst die Erregbarkeit der Muskelzellmembran [37]. Andererseits werden direkte Einflüsse auf die mitochondriale Funktion durch Statine diskutiert, welche mit einer Affektion des Komplex I der Atmungskette in humanen Muskelbiopsien einhergehen [36]. Zudem wurde auch bei Statinen gezeigt, dass diese zu einer erhöhten intrazellulären Kalziumkonzentration führen, welche auch durch Kalziumausstrom aus dem SR über den Ryanodin-Rezeptor bedingt und abhängig von der applizierten Dosis des Statins ist [38]. Wobei davon ausgegangen wird, dass es erst nachdem die mitochondriale Funktion gestört ist zu einer erhöhten zytoplasmatischen Kalziumkonzentration kommt mit anschließender Kalziumüberladung des SR und dadurch Ausströme von Kalzium aus dem SR [36]. In dieser Arbeit soll gezeigt werden, ob sich die myotoxischen Effekte von Statinen,

in diesem Fall Atorvastatin und Bupivacain in-vitro addieren, da auch bei Bupivacain die erhöhte intrazelluläre Kalziumionenkonzentration für einen Grund der Mytoxizität angenommen wird. Zudem scheint Bupivacain auch einen Einfluss auf den mitochondrialen Stoffwechsel zu haben und die Zellatmung zu verändern [26], wodurch sich der myotoxische Effekt beider Substanzen addieren könnte.

In den Versuchen mit Atorvastatin und Bupivacain in aufsteigenden Konzentrationen zeigte sich vor Allem bei den A673-Rhabdomyosarkomzellen ein additiver myotoxischer Effekt im Bereich der mittleren Bupivacainkonzentrationen (1000 ppm – 2500 ppm). Die Mytoxizität von Atorvastatin ohne Co-Inkubation mit Bupivacain war in dieser Zellreihe nicht signifikant nachweisbar. In der C2C12-Zellreihe und auch bei den primären Mausmuskelzellen sind vereinzelt additive Effekte von Bupivacain und Atorvastatin zu finden, hier allerdings bei niedrigeren Bupivacainkonzentrationen (500 ppm - 1000 ppm). Lediglich bei den primären Mausmuskelzellen ist die Mytoxizität von Atorvastatin auch ohne die Anwesenheit von Bupivacain zu beobachten. Es ist denkbar, dass diese additiven myotoxischen Effekte am stärksten bei den Rhabdomyosarkomzellen ausgeprägt sind, da diese als maligne, stark proliferierende Zelle die Zellart mit dem höchsten Energiebedarf ist und eine Modulation der mitochondrialen Funktion durch zwei Stoffe dieses System aus dem Gleichgewicht bringt.

#### **4.5. Reaktion der Zellen auf BAPTA/AM**

Ein weiterer Versuch auf den intrazellulären Kalziumspiegel Einfluss zu nehmen und so eventuell die Einleitung des Zelltods zu verhindern war die Behandlung von mit Bupivacain geschädigten Zellen mit dem membrangängigen Kalziumkomplexbildner BAPTA/AM [1,2-Bis (2-aminophenoxy) ethane-N,N,N,N-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethylester)] [40]. In den oben dargestellten Ergebnissen zeigt sich bei den primären Mausmuskelzellen eine signifikante Toxizität von BAPTA/AM bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M BAPTA/AM und 0 ppm oder 500 ppm Bupivacain. Interessanterweise lässt sich diese Feststellung in der Zeitreihe, welche ebenfalls mit 100  $\mu$ M BAPTA/AM durchgeführt wurde, nicht darstellen. Betrachtet man die Ergebnisse dieser Versuche an den C2C12-Zellen so zeigt sich ebenfalls ein



toxischer Effekt von BAPTA/AM in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$ , jedoch nur bei Bupivacainkonzentrationen von 500 ppm oder 1000 ppm. In der Zeitreihe zeigt sich ebenfalls ein verminderter Anteil vitaler Zellen nach 60 Minuten Inkubationszeit mit 100 $\mu\text{M}$  BAPTA/AM bei Bupivacainkonzentrationen von 500 ppm oder 1000 ppm. Im identischen Versuchsaufbau zeigt sich bei den A673-Rhabdomyosarkomzellen ein toxischer Effekt von BAPTA/AM bei 1000 ppm Bupivacain. Der Feststoff BAPTA/AM muss in DMSO gelöst werden, welches eine Zellschädigung erklären könnte. Jedoch wurde auch zu der Lösung, welche kein BAPTA/AM enthielt DMSO in derselben Konzentration zugesetzt um eine Verfälschung der Ergebnisse durch DMSO auszuschließen. Da sich diese Ergebnisse auch innerhalb der einzelnen Versuche nicht als reproduzierbar zeigen ist denkbar, dass die Anzahl der Versuchsansätze nicht ausreichend ist um über die Toxizität oder den protektiven Effekt von BAPTA/AM auf Muskelzellen eine Aussage zu treffen.

#### **4.6. Reaktion der Zellen auf Dantrolen**

Eine der gängigsten Theorien zum Mechanismus der Myotoxizität von Lokalanästhetika besteht in der Freisetzung von Kalziumionen aus dem sarkoplasmatischen Retikulum über den Ryanodin-Rezeptor und der gestörten Wiederaufnahme dieser in das SR über die sarkoplasmatische Kalzium-ATPase (SERCA) mit damit verbundenem erhöhten Energiebedarf, wodurch es aufgrund des Ungleichgewichts zwischen Energiebedarf und –angebot zum Zusammenbruch der Zelle kommt. Es wurden auch bereits bei direkten Messungen der intrazellulären Kalziumkonzentration erhöhte Werte direkt nach der Exposition zu Lokalanästhetika gemessen [31]. Die Untersuchungen mit einer Substanz, welche die Freisetzung von Kalzium aus dem SR moduliert sind somit naheliegend. Eine solche Substanz ist Dantrolen. Dantrolen reduziert die Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodin-Rezeptors und somit die Freisetzung von Kalzium aus dem SR und wird unter anderem zur Behandlung der malignen Hyperthermie eingesetzt. In in-vitro-Studien konnten bereits positive Effekte von Dantrolen auf mit Bupivacain behandelte Muskelzellen erzielt werden. Hierdurch lässt sich darauf schließen, dass eine verminderte Kalziumfreisetzung aus dem SR einen protektiven Effekt auf die lokalanästhetikainduzierte Myotoxizität hat [31].

In dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse an keiner der drei untersuchten Zellreihen reproduziert werden. Eine Inkubation der Zellen mit Dantrolen und Bupivacain in jeweils steigenden Konzentrationen zeigte keinen positiven Einfluss auf den Anteil der vitalen Zellen. Es findet sich sogar ein Rückgang des Anteils der vitalen Zellen mit steigender Dantrolenkonzentration ohne Zusatz von Bupivacain in allen drei Zelllinien. Im Gegensatz zu dem Versuchsaufbau von Plank et al. wurden hier jedoch keine Erholungszeiten vor der durchflusszytometrischen Analyse eingehalten [31]. Es ist denkbar, dass die mit Dantrolen behandelten Zellen ein größeres Potential zur Regeneration durch Teilung von noch nicht differenzierten Satellitenzellen haben.

#### **4.7. Reaktion der Zellen auf Erythropoetin**

Es existieren Untersuchungen dazu, dass Bupivacain Einfluss auf den mitochondrialen Energiestoffwechsel nimmt [15]. Ein potentiell vor diesem Einfluss schützendes Medikament stellt Erythropoetin (EPO) dar. In einer vorangegangenen Studie wird beschrieben, dass EPO bei myotoxisch geschädigten Muskelzellen die Morphologie des Mitochondriums aufrechterhält, wohingegen sich ohne EPO eine zwiebelschalenartige Formation ausbildet, die mit einer abnormen F1F0-Oligomerisation in Verbindung gebracht wird. Zudem stabilisiert EPO das mitochondriale Membranpotential [26]. Aufgrund dieser Daten wurden auch in dieser Arbeit Versuche mit EPO und Bupivacain durchgeführt. Jedoch zeigte sich bei den A673-Rhabdomyosarkomzellen kein protektiver Effekt von EPO auf die mit Bupivacain behandelten Zellen. Auch bei den immortalisierten C2C12-Zellen ließ sich kein protektiver Effekt von EPO bei myotoxischer Schädigung durch Bupivacain feststellen. Möglicherweise zeigen immortalisierte, beziehungsweise undifferenzierte Muskelzellen eine veränderte Reaktion auf EPO im Vergleich zu den primären Mausmuskelzellen in diesem Versuchsaufbau oder den humanen Muskelzellen, beziehungsweise dem Tiermodell in der Studie von Nouette-Gaulain et al. [26].

Es wurde bereits nachgewiesen, dass humane Rhabdomyosarkomzellen einen funktionellen EPO-Rezeptor besitzen. In diesem Zusammenhang wurde jedoch auch die Vermutung aufgestellt, dass EPO bei Rhabdomyosarkomen, wie auch bei einigen anderen Tumorentitäten einen prometastatischen Faktor darstellt [32].

Betrachtet man hingegen diesen Versuchsaufbau an den primären Mausmuskelzellen, so zeigt sich, dass es bei einer 24-Stunden Vorinkubation der Zellen mit EPO (5 U und 10 U) und anschließender 120-minütiger Exposition mit Bupivacain (>500ppm) signifikant mehr vitalen Zellen durchflusszytometrisch detektiert werden also ohne EPO-Inkubation. Diese Feststellung deckt sich mit den Ergebnissen von Nouette-Gaulain et al. aus dem Jahre 2009, wo sowohl im Tiermodell als auch in einer Kultur aus primären humanen Muskelzellen Untersuchungen durchgeführt wurden [26]. Hier zeigten sich verschiedene Auswirkungen auf die mitochondriale Funktion durch Bupivacain, welche teilweise durch EPO reduziert oder aufgehoben wurden. So wurde eine Inhibition der Atmungskette durch Bupivacain beobachtet, welche durch EPO blockiert werden konnte, sowie der bereits erwähnte Verlust der Cristae-Formation der Mitochondrien durch Behandlung mit Bupivacain, welche ebenfalls durch EPO verhindert werden konnte und die Stabilisierung des mitochondrialen Membranpotentials. Diese Beobachtungen lassen auch die Vermutung zu, dass das allgemeine Überleben der Zellen, welche zusätzlich zu Bupivacain mit EPO behandelt wurden, verbessert ist. Betrachtet man hingegen die Ergebnisse der Versuche mit einer achtstündigen Vorinkubation der primären Mausmuskelzellen mit EPO und anschließender 120-minütiger Inkubation mit Bupivacain so zeigt sich keine statistisch signifikante Protektion durch EPO auf die myotoxischen Effekte von Bupivacain auf die primären Mausmuskelzellen. Es ist jedoch eine Tendenz zum besseren Überleben der Zellen, welche mit EPO vorbehandelt wurden sichtbar. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass EPO einen zeitabhängigen protektiven Effekt auf die Muskelzellen ausübt. Bereits durch Nouette-Gaulain et al. wurde gezeigt, dass Bupivacain in-vitro zur Veränderung der Zellatmung führt. Durch zeitgleiches Hinzufügen von EPO konnte dieser Effekt nicht vermindert werden, es zeigten sich jedoch signifikante Verbesserungen wenn EPO 24 Stunden zuvor zugesetzt wurde und auch das Ausmaß der Verbesserung der Zellatmung zeigte sich abhängig von der Dauer der Exposition der Zellen mit EPO [26]. Es wurden in der vorangegangenen Studie und in dieser Arbeit jedoch EPO-Konzentrationen verwendet, welche deutlich höher sind als die für die Therapie der Anämie eingesetzten Dosen. Hieraus könnten sich bei einer klinischen Verwendung Probleme wie z.B. thrombembolische Ereignisse ergeben [3].

Der EPO-Rezeptor, beziehungsweise das EPO-Rezeptor-Gen wurden in Satellitenzellen von primären Mausmuskelzellen und in C2C12-Zellen nachgewiesen [28]. Auch in humanen Muskelbiopsien konnte der EPO-Rezeptor nachgewiesen werden [6]. Es wird vermutet, dass EPO und der EPO-Rezeptor eine Rolle in der Proliferation und Regeneration von Muskelzellen spielen, da sich eine vermehrte Expression des EPO-Rezeptor-Gens in proliferierender Muskulatur zeigte und dass EPO Myoblasten vor hypoxieinduzierter Apoptose schützen kann [16]. Insgesamt finden sich zur Rolle des EPO-Rezeptors in Muskelzellen und seiner Funktion jedoch sehr unterschiedliche Studienergebnisse [21] und es besteht weiterhin die Notwendigkeit weiterführender Studien zu diesem Thema.

#### **4.8. Reaktion der Zellen auf Fenoterol**

Ein weiteres protektives bzw. regeneratives Agens im Hinblick auf myotoxische Muskelzellschädigung sind  $\beta$ 2-Adrenorezeptoragonisten, wie z.B. Fenoterol [2]. Durch die Verabreichung von  $\beta$ 2-Adrenorezeptoragonisten vermehrt sich die Muskelmasse durch Proteinzuwachs, einerseits aufgrund einer vermehrten Produktion, andererseits aufgrund eines verminderten Abbaus [24]. In der Studie von Beitzel et al. konnte gezeigt werden, dass die Administration von Fenoterol nach einer myotoxischen Schädigung der Muskelzellen durch Bupivacain in-vivo zu einer schnelleren funktionellen Regeneration der Muskulatur führt. Dieser positive Effekt wird auf die oben beschriebene Vermehrung des Proteinanteils in der mit Fenoterol behandelten Gruppe, auf eine vermehrte Vaskularisation des Gewebes durch Fenoterol-Exposition [34], auf eine gesteigerte Proliferation und Differenzierung von Satellitenzellen [33] und auf die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren wie IGF-I [1] zurückgeführt. Eine weitere in-vivo Studie konnte ähnliche Ergebnisse mit der Verwendung von Formoterol erzielen [35].

In dieser Arbeit wurde Fenoterol als  $\beta$ 2-Adrenorezeptoragonist gewählt und die drei untersuchten Zellreihen zeitgleich mit Fenoterol und Bupivacain in mehreren Konzentrationen inkubiert. In der Auswertung zeigte sich kein eindeutig positiver Effekt von Fenoterol auf den Anteil der vitalen Zellen in allen drei Zelllinien. In einzelnen Konzentrationsstufen ergaben sich signifikante Unterschiede im Anteil der

vitalen Zellen, jedoch nicht der Vergleich von Zellen welche nicht mit Fenoterol inkubiert wurden zu denen mit Inkubation von Fenoterol. Im Gegensatz zu den oben genannten Studien erfolgten die Untersuchungen hier in-vitro. Der positive Einfluss, den  $\beta$ 2-Adrenorezeptoragonisten auf die Vaskularisation haben, kann bei einer in-vitro Studie an Zellkulturen aus Muskelzellen nicht bewiesen oder verworfen werden. Bei den primären Mausmuskelzellen und C2C12-Zellen sollte sich auch kein Effekt auf Satellitenzellen nachweisen lassen, da diese Zellen 24 Stunden vor der Versuchsdurchführung in einem Differenzierungsmedium kultiviert wurden, um zu adulten Muskelzellen mit kontraktilem Apparat zu differenzieren. Auch wenn sich während des Versuchsablaufs noch Myoblasten unter den untersuchten Zellen befanden ist hier wahrscheinlich kein proliferativer Effekt sichtbar, da keine Erholungszeiten nach Inkubation mit Fenoterol und Bupivacain und vor der durchflusszytometrischen Analyse angesetzt waren. Es ist denkbar, dass sich der proliferative und anabolische Effekt von  $\beta$ 2-Adrenorezeptoragonisten auch in-vitro nach einer gewissen Erholungszeit der Zellen zeigt. Hierfür sind weitere Untersuchungen notwendig.

#### **4.9. Reaktion der Zellen auf Mannitol**

Die Versuche mit zeitgleicher Inkubation von Mannitol und Bupivacain in den drei Zelllinien wurden durchgeführt um einen Effekt von Mannitol auf die Myotoxizität von Bupivacain auszuschließen, da Dantrolen als gebrauchsfertige Injektionslösung aus Gründen der besseren Löslichkeit mit Mannitol versetzt ist. Bei allen drei Zellreihen konnte ein signifikanter Effekt von Mannitol auf den prozentualen Anteil der vitalen Zellen bei Inkubation mit Bupivacain ausgeschlossen werden. Die Interpretation der Ergebnisse der Versuche mit Dantrolen ist also ohne weitere Berücksichtigung des Mannitolanteils möglich.

## 5. Zusammenfassung

Neben den gut untersuchten systemischen Nebenwirkungen von Lokalanästhetika bei versehentlicher i.v.-Applikation sind seit vielen Jahren auch lokal toxische Effekte auf verschiedene Gewebearten bekannt. Es sind toxische Effekte auf periphere Nerven [42], Gelenkknorpel [30], Bandscheibengewebe [22] und nicht zuletzt Muskulatur [43] beschrieben. In dieser Arbeit wurde untersucht, inwieweit sich die Myotoxizität von Lokalanästhetika durch den Zusatz verschiedener Stoffe modulieren lässt, welche an Punkten vermuteter Mechanismen über welche Lokalanästhetika ihre myotoxische Wirkung entfalten, angreifen. Zudem wurde untersucht, ob Atorvastatin, ein selbst myotoxisches Medikament, die Myotoxizität von Lokalanästhetika verstärkt.

Die Versuche wurden in-vitro an drei Zellreihen durchgeführt. Die hier untersuchten Zellreihen waren primäre Mausmuskelzellen, immortalisierte C2C12-Zellen und humane Rhabdomyosarkomzellen (A673-Zellen). Als Lokalanästhetikum wurde Bupivacain in klinisch relevanten Dosierungen verwendet. Bupivacain ist das Lokalanästhetikum mit dem größten myotoxischen Potential bereits in klinisch relevanten Dosen und wurde aus diesem Grund ausgewählt [43, 13]. Bei den zugesetzten Stoffen handelte es sich einerseits um Verbindungen welche den intrazellulären Kalziumhaushalt beeinflussen, wie Dantrolen, welches den Ausstrom von Kalzium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum vermindert [20] und BAPTA/AM, einen zellmembrangängigen Kalziumkomplexbildner [40]. Da die Dantrolen-Injektionslösung einen hohen Anteil Mannitol enthält wurde auch Mannitol zum Ausschluss einer Verfälschung der Ergebnisse getestet. Andererseits wurden Medikamente getestet, welche in vorangegangenen Studien protektive Effekte auf durch Lokalanästhetika toxisch geschädigte Muskelzellen in-vivo oder in-vitro zeigten. Hierzu zählen das antioxidative Acetylcystein (ACC) [11], Erythropoetin (EPO), was primär auf die Mitochondrien wirkt [26] und Fenoterol, ein  $\beta$ 2-Adrenorezeptoragonist, welcher sich in in-vivo Studien als protektiv, bzw. regenerativ erwies [2].

In den Ergebnissen dieser Studie zeigte sich, dass in diesem Versuchsaufbau ACC und Fenoterol keinen positiven Effekt auf die Myotoxizität von Bupivacain in den drei

untersuchten Zellreihen haben. Diese Beobachtungen, können wie oben erläutert, mehrere Ursachen haben.

Mit BAPTA/AM und Dantrolen wurde versucht auf den intrazellulären Kalziumspiegel Einfluss zu nehmen. Hierbei zeigte sich bei den Versuchen mit BAPTA/AM, dass dieses auf keine der drei untersuchten Zellreihen einen protektiven Effekt zu haben scheint, sondern eher einen toxischen Effekt, vor Allem in der Kombination mit Bupivacain. Diese Beobachtungen zeigten sich jedoch nicht konsistent durch alle Versuche, weshalb hier weitere Untersuchungen von Nöten sind. Im Gegensatz zu vorangegangenen Studien zeigte sich auch bei Koinkubation der Zelllinien mit Dantrolen und Bupivacain kein eindeutig protektiver Effekt von Dantrolen auf die mytoxische Wirkung von Bupivacain. Vielmehr findet sich sogar ein Rückgang des Anteils der vitalen Zellen mit steigender Dantrolenkonzentration in den drei untersuchten Zellreihen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist die fehlende Erholungszeit vor der durchflusszytometrischen Analyse, welche bei Plank et al. eingehalten wurde [31].

In den Versuchen mit EPO ließ sich ein protektiver Effekt auf die primären Mausmuskelzellen bei 24-stündiger Vorinkubation mit EPO feststellen. Es zeigte sich eine deutliche Zunahme des Anteils der vitalen Zellen bei Vorinkubation mit 5 U oder 10 U EPO und anschließender Exposition zu Bupivacain. Diese Feststellung ist mit Ergebnissen aus einer früheren Studie gut vereinbar, bei der die Wirkung von EPO auf die Mitochondrien von Muskelzellen unter Einfluss von Bupivacain getestet wurde. Dort zeigte sich eine zeitabhängige Stabilisierung der Mitochondrien durch EPO [26]. Diese Beobachtung lässt sich allerdings nicht in den anderen beiden Zellreihen machen. Möglicherweise reagieren die A673-Zellen und die C2C12-Zellen anders auf einen veränderten Energiestoffwechsel als primäre Muskelzellen.

Die Versuche mit Atorvastatin, einem HMG-CoA-Reduktase-Hemmer und Bupivacain an den drei Zellreihen zeigen einen additiven toxischen Effekt von Atorvastatin und Bupivacain bei mittleren Konzentrationen von Bupivacain, welche am stärksten bei den A673-Zellen ausgeprägt sind. Hierfür ist möglicherweise eine schädigende Wirkung auf die Mitochondrien durch beide Stoffe verantwortlich, welche in den Zellen mit hohem Energiebedarf zur Störung des Gleichgewichts von Energiebedarf und –angebot führt und somit zum Zelltod. Bei den primären Mausmuskelzellen ist zudem ein toxischer Effekt von Atorvastatin alleine zu beobachten.

Zusammenfassend findet sich nur bei einer Vorinkubation der primären Mausmuskelzellen mit EPO für 24 Stunden ein signifikant protektiver Effekt gegenüber der myotoxischen Wirkung von Bupivacain. Bezüglich des Mechanismus über welchen EPO diese protektive Wirkung entfaltet ist bislang wenig bekannt. Am ehesten scheint es sich um eine Stabilisierung des mitochondrialen Stoffwechsels, der mitochondrialen Struktur und des mitochondrialen Membranpotentials zu handeln [26]. Für die weitere Aufklärung der genauen Angriffspunkte sind weitere Studien notwendig. Für die weiteren untersuchten Stoffe ergeben sich, teils im Gegensatz zu früheren Studien, keine signifikanten protektiven Effekte auf die getesteten Zellen bezüglich der Myotoxizität von Bupivacain. Auch hier sind weitere Untersuchungen notwendig um die exakte Wirkung von Bupivacain auf die Muskelzelle und die damit verbundene toxische Schädigung aufzuklären.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Awede BL, Thissen J, Lebacqz J (2002) Role of IGF-I and IGFBPs in the changes of mass and phenotype induced in rat soleus muscle by clenbuterol. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*(282): E31-E37
2. Beitzel F, Gregorevic P, Ryall JG et al (2004) Beta2-adrenoceptor agonist fenoterol enhances functional repair of regenerating rat skeletal muscle after injury. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 96(4): 1385–1392.
3. Bennett CL, Silver SM, Djulbegovic B et al (2008) Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. *JAMA* 299(8): 914–924.
4. Benoit PW, Belt WD (1970) Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with local anaesthetic, bupivacaine. *Journal of Anatomy* 107: 547–556
5. Brun A (1959) EFFECT OF PROCAINE, CARBOCAIN AND XYLOCAINE ON CUTANEOUS MUSCLE IN RABBITS AND MICE. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica* 3(2): 59–73.
6. Christensen B, Lundby C, Jessen N et al (2012) Evaluation of functional erythropoietin receptor status in skeletal muscle in vivo: acute and prolonged studies in healthy human subjects. *PloS one* 7(2): e31857.
7. Christopher-Stine L (2006) Statin myopathy: an update. *Current opinion in rheumatology* 18(6): 647–653.
8. Emery PW, Rothwell NJ, Stock MJ et al (1984) Chronic effects of beta2-adrenergic agonists on body composition and protein synthesis in the rat. *Biosci Rep* 4(1): 83–91.
9. Fan TWM, Kucia M, Jankowski K et al (2008) Rhabdomyosarcoma cells show an energy producing anabolic metabolic phenotype compared with primary myocytes. *Molecular cancer* 7: 79.
10. Foster AH, Carlson BM (1980) Myotoxicity of Local Anesthetics and Regeneration of the Damaged Muscle Fibers. *Anesthesia & Analgesia* 59(10): 727–736.

11. Galbes O, Bourret A, Nouette-Gaulain K et al (2010) N-acetylcysteine protects against bupivacaine-induced myotoxicity caused by oxidative and sarcoplasmic reticulum stress in human skeletal myotubes. *Anesthesiology* 113(3): 560–569.
12. Han SK, Kim JH, Hwang J (2004) Persistent diplopia after retrobulbar anesthesia. *Journal of cataract and refractive surgery* 30(6): 1248–1253.
13. Hofmann P, Metterlein T, Bollwein G et al (2013) The myotoxic effect of bupivacaine and ropivacaine on myotubes in primary mouse cell culture and an immortalized cell line. *Anesthesia and analgesia* 117(3): 634–640.
14. Inan S, Wei H (2010) The cytoprotective effects of dantrolene: a ryanodine receptor antagonist. *Anesthesia and analgesia* 111(6): 1400–1410.
15. Irwin W, Fontaine E, Agnolucci L et al (2002) Bupivacaine myotoxicity is mediated by mitochondria. *The Journal of biological chemistry* 277(14): 12221–12227.
16. Jia Y, Warin R, Yu X et al (2009) Erythropoietin signaling promotes transplanted progenitor cell survival. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23(9): 3089–3099.
17. KAMIYA Y, OHTA K, KANEKO Y (2005) Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomed. Res.* 26(6): 231–239.
18. Kim G, Song D, Cho C et al (2006) Muscular cell proliferative and protective effects of N-acetylcysteine by modulating activity of extracellular signal-regulated protein kinase. *Life sciences* 79(7): 622–628.
19. Komai H, Lokuta AJ (1999) Interaction of Bupivacaine and Tetracaine with the Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup>Release Channel of Skeletal and Cardiac Muscles. *Anesthesiology* 90(3): 835–843
20. Krause T, Gerbershagen MU, Fiege M et al (2004) Dantrolene--a review of its pharmacology, therapeutic use and new developments. *Anaesthesia* 59(4): 364–373.
21. Lamon S, Russell AP (2013) The role and regulation of erythropoietin (EPO) and its receptor in skeletal muscle: how much do we really know? *Frontiers in physiology* 4: 176.
22. Lee H, Sowa G, Vo N et al (2010) Effect of bupivacaine on intervertebral disc cell viability. *The spine journal : official journal of the North American Spine Society* 10(2): 159–166.

23. Metterlein T, Hoffmann P, Späth R et al (2015) In vitro myotoxic effects of bupivacaine on rhabdomyosarcoma cells, immortalized and primary muscle cells. *Cancer Cell Int* 15(1): 68.
24. Navegantes LCC, Migliorini RH, do Carmo Kettelhut I (2002) Adrenergic control of protein metabolism in skeletal muscle. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 5(3): 281–286.
25. Nishimoto T, Tozawa R, Amano Y et al (2003) Comparing myotoxic effects of squalene synthase inhibitor, T-91485, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in human myocytes. *Biochemical Pharmacology* 66(11): 2133–2139.
26. Nouette-Gaulain K, Bellance N, Prévost B et al (2009) Erythropoietin protects against local anesthetic myotoxicity during continuous regional analgesia. *Anesthesiology* 110(3): 648–659.
27. Nouette-Gaulain K, Dadure C, Morau D et al (2009) Age-dependent bupivacaine-induced muscle toxicity during continuous peripheral nerve block in rats. *Anesthesiology* 111(5): 1120–1127.
28. Ogilvie M, Yu X, Nicolas-Metral V et al (2000) Erythropoietin stimulates proliferation and interferes with differentiation of myoblasts. *The Journal of biological chemistry* 275(50): 39754–39761.
29. Paumard P, Vaillier J, Couly B et al (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *The EMBO journal* 21(3): 221–230.
30. Piper SL, Kramer JD, Kim HT et al (2011) Effects of local anesthetics on articular cartilage. *The American journal of sports medicine* 39(10): 2245–2253.
31. Plank C, Hofmann P, Gruber M et al (2016) Modification of Bupivacaine-Induced Myotoxicity with Dantrolene and Caffeine In Vitro. *Anesthesia and analgesia* 122(2): 418–423.
32. Poniewierska-Baran A, Suszynska M, Sun W et al (2015) Human rhabdomyosarcoma cells express functional erythropoietin receptor: Potential therapeutic implications. *International journal of oncology* 47(5): 1989–1997.
33. Roberts P, McGeachie J (1992) The effects of clenbuterol on satellite cell activation and the regeneration of skeletal muscle: an autoradiographic and morphometric study of whole muscle transplants in mice. *Journal of Anatomy* 180: 57–65

34. Roberts P, McGeachie J (1994) The enhancement of revascularisation of skeletal muscle transplants using the beta 2-agonist isoprenaline. *Journal of Anatomy* 184: 309–318
35. Ryall JG, Schertzer JD, Alabakis TM et al (2008) Intramuscular beta2-agonist administration enhances early regeneration and functional repair in rat skeletal muscle after myotoxic injury. *Journal of applied physiology* (Bethesda, Md. : 1985) 105(1): 165–172.
36. Sirvent P, Bordenave S, Vermaelen M et al (2005) Simvastatin induces impairment in skeletal muscle while heart is protected. *Biochemical and biophysical research communications* 338(3): 1426–1434.
37. Sirvent P, Mercier J, Lacampagne A (2008) New insights into mechanisms of statin-associated myotoxicity. *Current opinion in pharmacology* 8(3): 333–338.
38. Sirvent P, Mercier J, Vassort G et al (2005) Simvastatin triggers mitochondria-induced Ca<sup>2+</sup> signaling alteration in skeletal muscle. *Biochemical and biophysical research communications* 329(3): 1067–1075.
39. Sztark F, Nouette-Gaulain K, Malgat M et al (2000) Absence of Stereospecific Effects of Bupivacaine Isomers on Heart Mitochondrial Bioenergetics. *Anesthesiology* 93(2): 456–462.
40. Torkkeli PH, Meisner S, Pfeiffer K et al (2012) GABA and glutamate receptors have different effects on excitability and are differentially regulated by calcium in spider mechanosensory neurons. *The European journal of neuroscience* 36(12): 3602–3614.
41. Zink W, Graf B (2002) Differential Effects of Bupivacaine on Intracellular Ca<sup>2+</sup>RegulationPotential Mechanisms of Its Myotoxicity. *Anesthesiology* 97: 710–716
42. Zink W, Graf BM (2003) Toxikologie der Lokalanästhetika. Pathomechanismen-Klinik-Therapie (Toxicology of local anesthetics. Clinical, therapeutic and pathological mechanisms). *Der Anaesthesist* 52(12): 1102–1123.
43. Zink W, Sinner B, Zausig Y et al (2007) Myotoxizität von Lokalanästhetika. Experimenteller Mythos oder klinische Wahrheit? (Myotoxicity of local anaesthetics: experimental myth or clinical truth?). *Der Anaesthesist* 56(2): 118–127.

## **7. Anhang**

### **7.1. Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Inkubationsschema Bupivacain und ACC	22
Tabelle 2: Inkubationsschema Bupivacain und Atorvastatin	23
Tabelle 3: Inkubationsschema Bupivacain und BAPTA/AM	24
Tabelle 4: Inkubationsschema Bupivacain und BAPTA/AM Zeitversuch	24
Tabelle 5: Inkubationsschema Bupivacain und Dantrolen	25
Tabelle 6: Inkubationsschema Bupivacain und EPO	26
Tabelle 7: Inkubationsschema Bupivacain und Fenoterol	27
Tabelle 8: Inkubationsschema Bupivacain und Mannitol	28

## 7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und ACC-Konzentration (primäre Mausmuskelzellen, n=4)	30
Abbildung 2: Bonferroni bei Bupivacainkonzentration 500 ppm	33
Abbildung 3: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und Atorvastatin-Konzentration (primäre Mausmuskelzellen, n=4)	33
Abbildung 4: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und BAPTA/AM-Konzentration bei 30 Minuten Vorinkubation mit BAPTA/AM (primäre Mausmuskelzellen, n=4)	35
Abbildung 5: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen bei Bupivacainkonzentration = 500 ppm in Abhängigkeit von Dantrolen-Konzentration (primäre Mausmuskelzellen)	36
Abbildung 6: Bonferroni bei Bupivacainkonzentration = 2500 ppm	37
Abbildung 7: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 24 Stunden Vorinkubation mit EPO (primäre Mausmuskelzellen, n=8))	38
Abbildung 8: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von EPO-Konzentration bei einer Bupivacain-Konzentration > 500 ppm und einer EPO-Vorinkubation von 24 Stunden (primäre Mausmuskelzellen)	39
Abbildung 9: Dunett-T3 bei Bupivacainkonzentration > 500 ppm	40

Abbildung 10: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 8 Stunden Vorinkubation mit EPO (primäre Mausmuskelzellen, n=4)	41
Abbildung 11: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und der Fenoterol-Konzentration (primäre Mausmuskelzellen, n=4)	42
Abbildung 12: Bonferroni bei Bupivacainkonzentration = 500 ppm	43
Abbildung 13: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und ACC-Konzentration (C2C12-Zellen, n=4)	45
Abbildung 14: Bonferroni bei Bupivacainkonzentration 500 ppm	47
Abbildung 15: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und Atorvastatin-Konzentration (C2C12-Zellen, n=6)	48
Abbildung 16: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und BAPTA/AM-Konzentration bei 30 Minuten Vorinkubation mit BAPTA/AM (C2C12-Zellen, n=4)	49
Abbildung 17: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain-Konzentration und der Vorinkubationszeit mit 100 $\mu$ M BAPTA/AM (C2C12-Zellen, n=4)	50
Abbildung 18: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und Dantrolen-Konzentration (C2C12-Zellen, n=8)	51

Abbildung 19: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 24 Stunden Vorinkubation mit EPO (C2C12-Zellen, n=4)

52

Abbildung 20: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 8 Stunden Vorinkubation mit EPO (C2C12-Zellen, n=4)

53

Abbildung 21: Mittelwerte des prozentualen Anteils der vitalen Zellen in den verschiedenen Fenoterol-Konzentrationen bei Bupivacainkonzentration = 2500 ppm

54

Abbildung 22: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen In Abhängigkeit von Bupivacain- und ACC-Konzentration (A673-Zellen, n=8)

55

Abbildung 23: Bonferroni bei Bupivacain 1000 ppm (A673, Atorvastatin); n=4

57

Abbildung 24: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Atorvastatinkonzentration bei 1000 ppm Bupivacain (A673-Zellen)

58

Abbildung 25: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Atorvastatinkonzentration bei 1750 ppm Bupivacain (A673-Zellen)

59

Abbildung 26: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Atorvastatinkonzentration bei 2500 ppm Bupivacain (A673-Zellen)

59

Abbildung 27: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 24 Stunden Vorinkubation mit EPO (A673-Zellen, n=4)

61



Abbildung 28: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und EPO-Konzentration bei 8 Stunden Vorinkubation mit EPO (A673-Zellen, n=4) 62

Abbildung 29: Prozentualer Anteil der vitalen Zellen in Abhängigkeit von Bupivacain- und Fenoterol-Konzentration (A673-Zellen, n=4) 63

Abbildung 30: Anteil der vitalen Zellen in den verschiedenen Zellreihen zum Zeitpunkt der Durchflusszytometrie ohne Inkubation mit Bupivacain oder anderem Medikament 65

Abbildung 31: Fotos der verschiedenen Zellreihen nach 120 Minuten Inkubation mit aufsteigenden Konzentrationen Bupivacain. 66

Abbildung 32: Anteil der vitalen Zellen in allen drei untersuchten Zellreihen bei einer Bupivacainkonzentration von 1000 ppm ohne zugesetzte Medikamente 68

### 7.3. Abkürzungsverzeichnis

ACC	Acetylcystein
BAPTA/AM	1,2-Bis (2-aminophenoxy) ethane- N,N,N,N-tetraacetic acid tetrakis (acetoxymethylester)
Bupi	Bupivacain
CEE	Chick Embryo Extract
DMEM	Dulbecco Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EPO	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FKS	Fetales Kälber Serum
HCl	Salzsäure
HS	Horse Serum
PI	Propidiumjodid
ROS	Reaktive oxygene species
RPMI	Roswell Park Memorium Institute Medium
SERCA	Sarkoplasmatische Kalzium-ATPase
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum

## **8. Danksagung**

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. Thomas Metterlein und Herrn Dr. Christoph Plank für die freundliche Überlassung des Themas und die jederzeit hervorragende Betreuung.

Ein sehr herzlicher Dank geht an das komplette Forschungs-Team der Klinik für Anästhesiologie unter der Leitung von Dr. Michael Gruber. Die kompetente und immer ausgesprochen freundliche Hilfe ermöglichte die reibungslose Durchführung dieser Arbeit.

Herrn Dr. Gruber gilt mein besonderer Dank für die Unterstützung bei der statistischen Analyse der erhobenen Daten.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie und meinen Freunden für die dauerhafte Unterstützung danken.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Sarah Luisa Lentner  
Geburtsdatum: 20.04.1988  
Geburtsort: Passau

### Berufserfahrung

Seit 01/2016 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für  
Neurochirurgie, Universitätsklinikum Regensburg

### Akademische und schulische Ausbildung

11/2015 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung 1,0  
10/2014 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, 2,0  
09/2011 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, 2,5  
04/2010 -12/2015 Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg  
10/2008 - 04/2010 Studium der Zahnmedizin an der Universität Regensburg  
09/2000 - 07/2008 Adalbert-Stifter-Gymnasium Passau  
Allgemeine Hochschulreife, 1,7  
08/2003 - 11/2003 Cochrane High School, Cochrane, AB, Canada  
09/1998 - 08/2000 Gymnasium Leopoldinum Passau  
09/1994 - 08/1998 Grundschule Tiefenbach