

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ANÄSTHESIOLOGIE
PROF. DR. MED. BERNHARD M. GRAF, MSC
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

MODIFIKATION DER BUPIVACAIN-INDUZIERTEN MYOTOXIZITÄT DURCH
SELEKTIVE BLOCKADE MITOCHONDRIALER IONENKANÄLE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ann-Sophie Unterschemmann

2017

AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR ANÄSTHESIOLOGIE
PROF. DR. MED. BERNHARD M. GRAF, MSC
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

MODIFIKATION DER BUPIVACAIN-INDUZIERTEN MYOTOXIZITÄT DURCH
SELEKTIVE BLOCKADE MITOCHONDRIALER IONENKANÄLE

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ann-Sophie Unterschemmann

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Thomas Metterlein

2. Berichterstatter: PD Dr. med. Christina Wendl

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Allgemeine Grundlagen von Lokalanästhetika	1
1.1.1	Historische Entwicklung	1
1.1.2	Pharmakologie der Lokalanästhetika.....	2
1.1.3	Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika	4
1.1.4	Toxizität von Lokalanästhetika	5
1.2	Das Lokalanästhetikum Bupivacain	5
1.2.1	Myotoxizität von Bupivacain	6
1.2.2	Histopathologische Veränderungen der Zellstruktur durch Bupivacain	7
1.3	Pathomechanismen der direkten Toxizität	7
1.3.1	Nekrotische Effekte der Lokalanästhetika.....	8
1.3.2	Apoptotische Effekte der Lokalanästhetika.....	8
1.3.2.1	Grundlagen der mitochondrialen Apoptose-Kaskade.....	8
1.3.2.2	Einfluss der Lokalanästhetika auf apoptotische Signalkaskaden	11
1.3.3	Einfluss der Lokalanästhetika auf den mitochondrialen Energie-Metabolismus	
	11	
1.3.4	Der Einfluss von Lokalanästhetika auf die Ca ²⁺ -Homöostase	12
1.3.4.1	Grundlagen des Mitochondriums und seines Ca ²⁺ -Stoffwechsels	12
1.3.4.2	Der Ca ²⁺ -Influx.....	13
1.3.4.3	Der Ca ²⁺ -Efflux	13
1.3.4.4	Die mitochondriale Membranenpermeabilisation (mOMP) im Rahmen des Ca ²⁺ -Stoffwechsels	14
1.3.4.5	Der „BAX-Channel“.....	15
1.3.4.6	Der “mitochondrial apoptosis-induced channel” (MAC).....	15
1.3.4.7	Die „mitochondriale permeability transition pore“ (mPTP).....	15

1.3.4.8	Die Rolle des Ca ²⁺ -Stoffwechsels des ER/SR und seine Veränderung durch Lokalanästhetika.....	17
1.3.5	Oxidativer Stress durch Lokalanästhetika	18
2	Zielsetzung.....	19
3	Material	20
3.1	Geräte.....	20
3.2	Verbrauchsmaterialien.....	20
3.3	Chemikalien und Reagenzien	20
3.3.1	Medikamente	20
3.3.2	Kits	20
3.3.3	Sonstiges.....	21
3.4	Verwendete Zellen.....	21
3.5	Datenbank und Software	21
4	Methoden.....	22
4.1	Verwendete Zellen.....	22
4.1.1	C2C12-Zellen und ihre Gewinnung	22
4.1.2	Primäre Mausmuskelzellen und ihre Gewinnung.....	22
4.2	Zellkultur	24
4.2.1	Vorbereitungen	24
4.2.2	Auftauen	24
4.2.3	Passagieren	25
4.2.4	Zellzahlbestimmung	25
4.2.5	Einfrieren	25
4.3	Protokolle zur Intoxikation mit Bupivacain	26
4.3.1	Auswahl des verwendeten Bupivacain und seiner Konzentrationen.....	26
4.3.2	Auswahl der verwendeten Blocker-Konzentrationen.....	28
4.4	Versuchsdurchführung.....	28

4.4.1	Einflussfaktoren und Fehlerquellen in der Versuchsanordnung	29
4.4.1.1	Der Einfluss des Lösungsmittels DMSO.....	29
4.4.1.2	Der Einfluss der mitochondrialen Blockerlösungen.....	30
4.4.2	Herstellung der Medien	30
4.4.2.1	Bupivacain-Lösungen im Hauptversuch	30
4.4.2.2	Cyclosporin A-Lösungen.....	31
4.4.2.3	iMAC-Lösungen.....	31
4.4.2.4	Ru360-Lösungen	32
4.4.3	Vorbereitung der Zellen.....	33
4.4.4	Exposition der C2C12- und pM-Zellen mit den Bupivacain-Lösungen und den mitochondrialen Blocker-Lösungen.....	33
4.4.5	Durchflusszytometrie.....	34
4.4.5.1	Vorbereitungen	34
4.4.5.2	Färbung apoptotischer/nekrotischer Zellen	34
4.4.5.3	Methode Durchflusszytometrie	34
4.4.5.4	Auswertung der Durchflusszytometrie.....	35
4.5	Statistische Methoden.....	36
5	Ergebnisse	37
5.1	Nachweis der Mytoxizität von Bupivacain und Festsetzung der Bupivacain-Konzentration	37
5.1.1	Morphologische Zellveränderungen nach Bupivacain-Intoxikation.....	37
5.1.2	Nachweis der Mytoxizität mithilfe der Durchflusszytometrie	38
5.1.2.1	Mytoxizität von Bupivacain bei C2C12-Zellen in der Durchflusszytometrie.....	38
5.1.2.2	Mytoxizität von Bupivacain bei pM-Zellen in der Durchflusszytometrie	40
5.1.3	Der Einfluss der Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO).....	41
5.2	Einfluss selektiver mitochondriale Ionenkanal-Blockade	42

5.2.1	Einfluss von CsA auf die Bupivacain-induzierte Apoptose	42
5.2.2	Einfluss von iMAC auf die Bupivacain-induzierte Apoptose	47
5.3	Einfluss von Ru360 auf die Bupivacain-induzierte Apoptose.....	50
6	Diskussion.....	54
6.1	Nachweis der Mytoxizität und Auswahl der Bupivacain- Konzentrationen	54
6.2	Blockade der mPTP durch CsA.....	56
6.3	Blockade des MAC durch iMAC	56
6.4	Blockade des MCU durch Ru360.....	57
6.5	Schlussfolgerung	58
7	Zusammenfassung	62
8	Literaturverzeichnis	64
9	Abkürzungsverzeichnis	81
10	Abbildungsverzeichnis	83
11	Tabellenverzeichnis	85
12	Anhang.....	86

1 Einleitung

Die lokale und regionale selektive Blockade neuronaler Strukturen ist neben der sog. Allgemeinanästhesie ein wesentlicher Bestandteil klinisch angewandter Anästhesiologie. Die in diesem Kontext verwendeten Medikamente, allen voran die Lokalanästhetika, sind in der Mehrzahl lange Zeit evaluiert und gelten im Allgemeinen als sehr gut verträglich. Es sind jedoch auch Nebenwirkungen assoziiert, die ihre Anwendung im klinischen Routinebetrieb limitieren. Seit Beginn der Anwendung sind toxische Auswirkungen in Bezug auf das Zentralnervensystem sowie kardiotoxische Nebeneffekte beschrieben und von klinischer Relevanz. In der aktuelleren wissenschaftlichen Forschung rückt die direkte Toxizität der Lokalanästhetika am Applikationsort vermehrt in den Fokus der Aufmerksamkeit. Diese zeigt sich nicht nur im Rahmen neuronaler Zielstrukturen, sondern auch im Bereich umliegenden Gewebes wie zum Beispiel der Muskulatur oder Knorpelgewebe. Im Bereich der klinischen Anwendung sind mehrere Berichte über relevante Myonekrosen nach Anwendung von Lokalanästhetika, insbesondere bei Applikation von Bupivacain, veröffentlicht worden. Die hintergründigen Pathomechanismen dieser direkten Toxizität sind sehr komplex und zu großen Teilen bislang ungeklärt. Neben direkten Einflüssen auf die zelluläre Integrität scheinen Apoptose-induzierende Faktoren einen entscheidenden Beitrag zu den relevanten Mechanismen zu leisten. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Identifizierung der apoptotischen Signalwege leisten.

1.1 Allgemeine Grundlagen von Lokalanästhetika

1.1.1 Historische Entwicklung

Mit ihren Selbstversuchen entdeckten der Psychoanalytiker Sigmund Freud und sein Freund Carl Koller, ein Augenarzt aus Wien, zufällig die betäubende Wirkung von Kokain und legten damit den Grundstein für die Entwicklung der Lokalanästhesie in der Medizin. 1884 berichtete Carl Koller erstmals von der Möglichkeit mit Hilfe einer Kokainlösung die Augenoberfläche für operative Zwecke ausreichend zu betäuben [1]. Somit begann fast 42 Jahre nach der ersten erfolgreichen Allgemeinnarkose mit Äther, nun auch die Entwicklung der Lokal- und Regionalanästhesie. Schon 1885 wurde Kokain als Lokalanästhetikum in der Zahnheilkunde verwendet. 1888 gelang die erfolgreiche Leitungsanästhesie des Fingers und 1892 beschrieb Carl Ludwig Schleich erstmalig die Technik der Infiltrationsanästhesie, mit der es nun möglich war oberflächliche Hautareale suffizient zu betäuben [2]. Die Grundlagen

zur Spinalkanalanästhesie legte 1899 August Bier mit der Veröffentlichung seiner „Versuche über die Cocainisierung des Rückenmarks“ [3]. Neun Jahre später folgten die Grundlagen zur intravenösen Lokalanästhesie [4]. Bereits mit Beginn der Anwendungen wurden jedoch auch unerwünschte Nebenwirkungen deutlich. Aufgrund toxischer Eigenschaften und eines relevanten Suchtpotentials konnte sich Kokain als Lokalanästhetikum im klinischen Alltag daher beispielsweise nicht durchsetzen, ermöglichte jedoch nach Analyse der chemischen Struktur zu Beginn des 20. Jahrhunderts u.a. die Entwicklung der auch heutzutage gebräuchlichen synthetischen Lokalanästhetika. Mit klinischer Relevanz wurden 1905 von Alfred Einhorn zunächst das erste Ester-Lokalanästhetikum Procain eingeführt, wenig später folgten die Lokalanästhetika vom Aminoamid-Typ [5].

1.1.2 Pharmakologie der Lokalanästhetika

Lokalanästhetika setzen sich aus einer aromatischen lipophilen Ringstruktur und einer hydrophilen Aminogruppe zusammen, die über eine Zwischenkette miteinander verbunden sind (s. Abbildung 1-1). Sie sind chemisch betrachtet schwache Säuren. Entsprechend der chemischen Bindung innerhalb der Zwischenkette kann man grundsätzlich eine Einteilung der Lokalanästhetika in Aminoamide oder Aminoester vornehmen [6]. Im klinischen Kontext, insbesondere der Anästhesiologie, sind überwiegend Lokalanästhetika des Aminoamid-Typs in Verwendung [7].

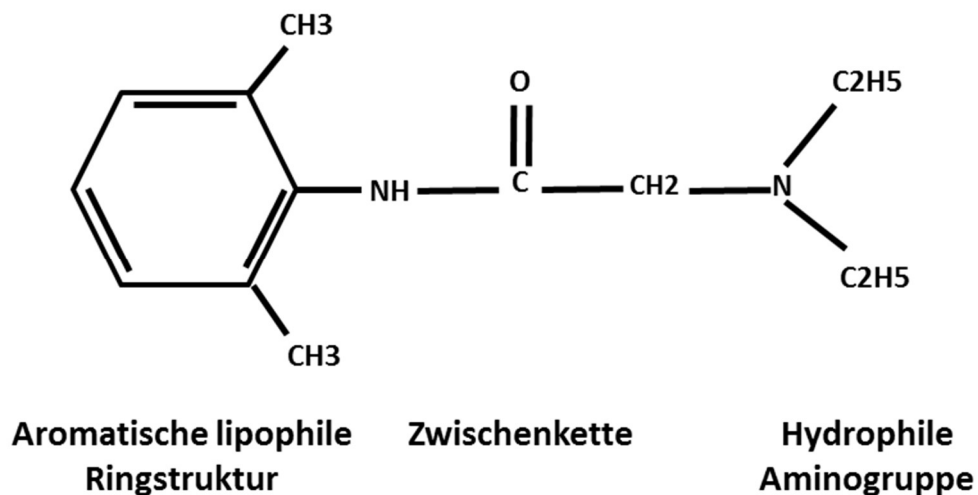


Abbildung 1-1. Strukturchemischer Aufbau der Lokalanästhetika am Beispiel des Lokalanästhetikums Lidocain.

Pharmakokinetische Eigenschaften und pharmakodynamische Effekte werden von substanzspezifischen physio-chemischen Eigenschaften bestimmt, sodass eine breite Palette von Substanzen zur individuellen Steuerung zur Verfügung steht. Wichtige Merkmale sind u.a. Proteinbindung und pKa-Wert. Tabelle 1-1 zeigt einen Auszug gebräuchlicher

Lokalanästhetika mit ihren Eigenschaften und der daraus resultierenden Anwendungsgebiete. Zudem werden im klinischen Gebrauch häufig weitere Pharmaka (z.B. Vasokonstriktoren) in Kombination additiv appliziert um entsprechende Modifikationen des pharmakologischen Verhaltens zu erzeugen.

Tabelle 1-1. Tabelle wichtiger Eigenschaften gebräuchlicher Lokalanästhetika (abgeändert nach Stüber und Dullendorf [7])

Wirkstoff	pKa-Wert	Proteinbindung	Wirkungseintritt	Wirkdauer (in min)	Anwendungsspektrum
Lidocain	7,9	65 %	Schnell	60-120	Infiltrationsanästhesie, periphere und zentrale Nervenblockade, topische Lokalanästhesie
Mepivacain	7,6	75 %	Schnell	90-180	Infiltrationsanästhesie, periphere Nervenblockade, Epiduralanästhesie, Spinalanästhesie
Prilocain	7,7	55 %	Schnell	60-120	Infiltrationsanästhesie, periphere Nervenblockade, Epiduralanästhesie
Bupivacain	8,1	95 %	langsam	240-480	Peripher Nervenblockade, Infiltrationsanästhesie, Epiduralanästhesie, Spinalanästhesie
Ropivacain	8,1	94 %	langsam	240-360	Periphere Nervenblockade, Infiltrationsanästhesie, Epiduralanästhesie

1.1.3 Wirkungsmechanismus der Lokalanästhetika

Lokalanästhetika entfalten ihre beabsichtigte Wirkung, indem sie die neuronale Erregungsweiterleitung blockieren. Hierbei binden sie nach Diffusion im Zellinneren an spannungsabhängige Natrium (Na^+)-Kanäle (s.u.) und führen zu einer reversiblen Inhibition des Na^+ -Einstroms in der Depolarisationsphase des Aktionspotentials, der bis zu einem Membranpotential von bis zu +30 mV gegenüber dem Extrazellularraum führen kann, sodass das ankommende Aktionspotential gestoppt wird [8]. Dabei binden Lokalanästhetika über die Zytosolseite im Innern des Na^+ -Kanals an eine spezifische Proteinregion. Diese Bindung der Lokalanästhetika ist abhängig vom Aktivitätszustand des Na^+ -Kanals und erfolgt überwiegend in deren offenem Zustand in der Depolarisationsphase [9]. Eine hohe Aktionspotentialfrequenz steigert somit die Affinität und damit die Wirkung des Lokalanästhetikums. Dieser Mechanismus wird als „*use-dependend block*“ bezeichnet.

Spannungsabhängige Na^+ -Kanäle sind Transmembranproteine, die aus vier homologen Untereinheiten (I-IV) mit je sechs alpha-Helices (Segment 1 - 6) bestehen. Die Abfolge positiv geladener Aminosäuren in Segment 4 ist als sensibler Bereich für die spannungs- und elektrochemischen Konformationsänderungen identifiziert worden. Als Pore für den Natriumeinstrom wurden zudem Strukturen der Segmente 5 und 6 identifiziert [10]. Eine spezifische Bindungsstelle für Lokalanästhetika konnte bisher nicht genau definiert werden, jedoch existiert in Segment 6 eine charakteristische Abfolge der Aminosäuren Phenylalanin und Tyrosin, die durch ihren hydrophoben Charakter mit Lokalanästhetika mutmaßlich interagieren können [11–13].

Es wurden zudem weitere Mechanismen beschrieben, welche die elektrochemischen Eigenschaften der Lipiddoppelmembran neuronaler Zellen beeinflussen. Indem Lokalanästhetika unspezifisch an die Lipid-Doppelschicht binden, verändern sie deren physikochemischen Eigenschaften (Fluidität, Mikroviskosität, Permeabilität), sowie ebenfalls das elektrostatische Potential. Insbesondere im Umfeld von Ionenkanälen und Rezeptoren führt dies zu Konformationsänderungen der Transmembranproteine mit konsekutivem Einfluss auf entsprechende Ionenströme und konkret in Bezug auf spannungsabhängige Na^+ -Kanäle zu einer Verringerung der Na^+ -Permeabilität [14–16]. Diese Eigenschaft steht durch ihre unspezifischen Zielstrukturen ganz besonders im Fokus toxischer Effekte und ist z.B. für die kardiotoxischen Eigenschaften von entsprechender Relevanz [17,18]. Neben o.g. Hauptwirkung auf spannungsabhängige Na^+ -Kanäle sind auch spannungsgesteuerte Calcium (Ca^{2+})-Kanäle gegenüber Lokalanästhetika affin und deren Blockade vermutlich für einen Teil der

analgetischen Wirkung mitverantwortlich. Gerade Einflüsse auf den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt stehen jedoch ebenfalls im Fokus toxischer Eigenschaften und sind insbesondere für die in dieser Arbeit untersuchten Aspekte der Myotoxizität von Bedeutung [19].

1.1.4 Toxizität von Lokalanästhetika

Wie alle Arzneimittel können auch Lokalanästhetika allergische oder anaphylaktische Reaktionen hervorrufen [20,21]. Ein besonders allergenes Potential ist dabei der Gruppe der Aminoester zuzuschreiben, insbesondere jenen mit para-ständigen Aminogruppen und deren Abbauprodukte [22]. Von den allergischen Reaktionen abzugrenzen sind zytotoxische Reaktionen. Hier sind insbesondere systemische toxische Effekte und ihre Auswirkungen auf das Zentralnervensystem sowie das kardiovaskuläre System hervorzuheben. Klinisch relevante zentralnervöse Effekte reichen von perioralem Taubheitsgefühl über Ohrengeräusche, Vigilanzstörungen und Dysarthrie bis hin zu Krampfanfällen mit Bewusstlosigkeit und Apnoe [23,24]. Kardiotoxische Einflüsse äußern sich z.B. durch plötzliche Bradykardien oder elektrophysiologischen Anomalitäten [23].

Von diesen systemischen Toxizitätsfolgen sind direkte zytotoxische Eigenschaften von Lokalanästhetika, also lokale Auswirkungen auf das umliegende Gewebe am Applikationsort, zu unterscheiden. Direkte Zytotoxizität konnte vor allem in peripherem Nervengewebe und der umliegenden Muskulatur festgestellt werden [25]. Neuere Studien *in vitro* und *in vivo* zeigen zudem auch toxische Wirkungen auf Knorpelgewebe [26–29].

1.2 Das Lokalanästhetikum Bupivacain

Bupivacain gehört zu der Gruppe der Aminoamide (s. Abbildung 1-1) und liegt als Racemat aus einem R- und S-Enantiomer vor. Wie alle Lokalanästhetika wirkt Bupivacain vor allem über die reversible Blockade der spannungsabhängigen Na^+ -Kanäle (s. Kapitel 1.1.3). Bupivacain ist ein langwirksames Lokalanästhetikum mit einem langsamen Wirkeintritt und einer Wirkdauer von 240 min bis 480 min. Die lange Wirkdauer liegt unter anderem an einer hohen Proteinbindung von bis zu 95%. Der pKa-Wert liegt bei 8,1, sodass Bupivacain bei einem physiologischem pH von 7,35 bis 7,45 formal zwar in einem Gleichgewicht vorliegt, diese jedoch sehr stark zur protonierten Form verschoben ist (s. Tabelle 1-1). Es erfolgt daher eine verzögerte (pH-abhängige) Diffusion nach intrazellulär, da nur ungeladene Moleküle durch die Zellmembran diffundieren können. Dies erklärt den langsamen Wirkeintritt. Für die reversible Blockade des spannungsabhängigen Na^+ -Kanals ist nach Überschreiten

der Plasmamembran eine intrazelluläre Re-Protonierung des ungeladenen Moleküls erforderlich [30].

Bupivacain ist das Lokalanästhetikum mit der höchsten toxischen Potenz. Ab einer Plasmakonzentration von 1,5 µg/ml kann es zentralvenöse oder kardiale Nebenwirkungen auslösen (Abbildung 1-2). Insbesondere die hohe Proteinbindungskapazität von Bupivacain begünstigt außerdem seine verlängerte toxische Wirkung. Bei systemischer Intoxikation kommt es vor allem am Herzen zu einer Beeinflussung des Reizleitungssystems, die zu ventrikulären Arrhythmien bis hin zu Kammerflimmern und Asystolie führen kann [31–33]. In Bezug auf die lokale Wirkung ist Bupivacain das am stärksten myotoxische und chondrotoxische Lokalanästhetikum [26, 34, 35].

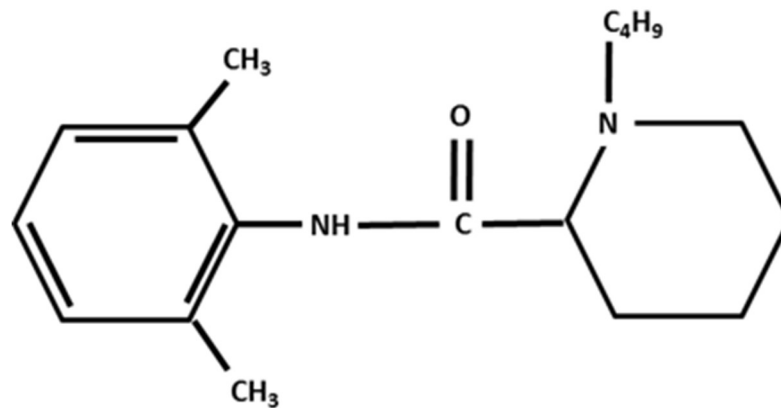


Abbildung 1-2. Strukturformel des Lokalanästhetikums Bupivacain.

1.2.1 Myotoxizität von Bupivacain

Klinische Manifestationen von Myotoxizität sind, obwohl die myotoxische Wirkung von Lokalanästhetika bereits sehr früh in der Literatur beschrieben wurde [36], in der klinischen Anästhesie eine sehr selten Komplikation. Bei Katarakt-Operationen oder anderen okularen Manipulationen, bei denen eine Retrobulbär-Anästhesie mit dem Lokalanästhetikum Bupivacain erfolgte, konnte jedoch relativ gehäuft eine persistierende Schädigungen der Augenmuskulatur festgestellt werden [37,38]. In Veröffentlichungen im Bereich der Augenheilkunde sind derartige Zwischenfälle mit einer Inzidenz von etwa 0,25% beschrieben [37], wobei hierzu keine systematische Prävalenzstudien vorliegen. Im Bereich größerer Muskelgruppen und somit im Anwendungsbereich der peripheren Regionalanästhesie gibt es trotz hochdosierter Applikation von Lokalanästhetika nur vereinzelte Fallberichte über muskuläre Dysfunktionen, die im Zusammenhang mit einer vorausgegangenen Dauerinfusion eines

Lokalanästhetikums stehen. Sie äußern sich insbesondere durch anhaltende Muskelschmerzen [39].

1.2.2 Histopathologische Veränderungen der Zellstruktur durch Bupivacain

Mikroskopischen Untersuchungen zeigten sowohl in vivo als auch in vitro (in humanem Gewebe und in Tiermodellen), dass Lokalanästhetika die Zellstruktur von Myozyten, Chondrozyten und Neuronen schädigen und lokale inflammatorische Reaktionen hervorrufen [25,26,28]. In Maus-Modellen konnten nach intramuskulärer Injektion von Lokalanästhetika vielfältige, allerdings eher unspezifische, strukturelle Veränderungen demonstriert werden, die von einer permanenten Myonekrose bis hin zur vollständigen Regeneration des Muskelgewebes reichen [40–42]. Sowohl bei einmaliger hochkonzentrierter Bupivacain-Injektion [41] als auch bei Dauerinfusion von Bupivacain [35] in muskuläres Gewebe konnten diese histopathologischen Veränderungen gleichermaßen beobachtet werden. Sie umfassen in erster Linie eine Hyperkontraktion von Faserbündeln und Mikrofibrillen [43] mit anschließender Zerreißung einzelner Fibrillen, einer Auflösung des Sarkoplasmatischen Retikulums, sowie pathologischen Veränderungen des Zellkerns. Zudem zeigt sich eine Degeneration der Zellorganellen, bis hin zum vollständigen Bild einer kalzifizierenden Nekrose mit Auflösung der gesamten Zellstruktur. Begleitet wird das Bild durch ein ausgedehntes interstitielles Ödem mit der Einwanderung von mononukleären inflammatorischen Zellen [40].

Eine Schädigung von umgebendem vaskulärem und neuronalem Gewebe, sowie von Basallamina und Satelliten-Zellen scheint nicht manifest zu werden [34,44]. Dies erklärt unter Umständen die gute Regenerationsfähigkeit muskulären Gewebes nach Lokalanästhetika-Exposition [42,45].

Insbesondere Bupivacain ist darüber hin aus auch in der Lage apoptotische Mechanismen auszulösen [35,46]. Bereits im mikroskopischen Bild können in Korrelation hierzu pathologische Veränderungen mitochondrialer Strukturen festgestellt werden, die elektronenmikroskopisch mit einer Auflösung der Cristae der inneren Membran sowie einer Schwellung der gesamten Zellorganelle einhergehen [47].

1.3 Pathomechanismen der direkten Toxizität

Der bisherige Forschungsstand zeigt, dass die Lokalanästhetika-induzierte Toxizität in Neuronen, Chondrozyten und Myozyten unabhängig von ihrer Wirkung an Na⁺-Kanälen

vermittelt wird [48]. Sie steht nicht nur mikroskopisch, sondern auch auf molekularer Ebene, in engem Zusammenhang mit den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) in den Neuronen, bzw. dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) in den Myozyten [49]. So wurde beispielsweise die Bildung von toxischen reaktiven Sauerstoffradikalen („*Reactive Oxygen Species*“, ROS) [50] und eine Beeinflussung des mitochondrialen Energie-Metabolismus durch Lokalanästhetika beobachtet [51,52]. Ferner scheint auch die Elektrolythomöostase, und hierbei insbesondere das Gleichgewicht des Ca^{2+} -Haushalts, eine große Rolle zu spielen [53–55]. Als Resultat einer Dysbalance können sowohl nekrotische als auch apoptotische Effekte beobachtet werden.

1.3.1 Nekrotische Effekte der Lokalanästhetika

Bei Anwendung von Lokalanästhetika können Prozesse des Zelluntergangs am Applikationsort beobachtet werden. Hierbei spielt offenbar neben dem Wirkstoff selbst auch die Konzentration der eingesetzten Lokalanästhetika eine Rolle: niedrige Konzentrationen induzieren überwiegend apoptotische Prozesse, hohe Konzentrationen führen überwiegend zu einer unmittelbaren Zellnekrose [56–58].

Die genauen Umstände des nekrotischen Zelluntergangs sind, abgesehen von einer Konzentrationsabhängigkeit, ungeklärt und scheinen unspezifisch zu sein. Es ist jedoch anzunehmen, dass die ursächlichen Mechanismen ebenfalls mitochondrial vermittelt werden [59]. Entscheidend hierfür sind vermutlich der Verlust der Membranintegrität, Veränderungen des Ionenhaushaltes mit konsekutivem Verlust des Ruhemembranpotentials, sowie Veränderungen der zellulären Energiebalance [57].

1.3.2 Apoptotische Effekte der Lokalanästhetika

1.3.2.1 Grundlagen der mitochondrialen Apoptose-Kaskade

Apoptotische Vorgänge werden weitestgehend von intrazytosolischen Proteinen reguliert. Einen Hauptanteil stellt die Gruppe der Caspasen dar. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die als Zymogene in jeder Zelle vorliegen und zunächst proteolytisch in ihre aktive Form umgewandelt werden müssen [60]. Sie sind u.a. für den Abbau intrazellulärer Proteine während der Apoptose von Bedeutung [61]. Es existieren prinzipiell zwei Haupt-Aktivierungswege des Caspase-Systems: der intrinsische und der extrinsische Weg, die beide im Folgenden für das weitere Verständnis kurz erläutert werden sollen.

Der extrinsische Weg wird über Oberflächenrezeptoren der Zelle, den sog. „*Death-Receptors*“ vermittelt. Die Bindung eines Liganden führt zur Rekrutierung des „*Fas-associated protein with death domain*“ (FADD) und anschließender Bildung eines „*death-inducing signaling Complex*“ (DISC) [62]. Als Ligand kommen nicht nur Proteine, wie beispielsweise der Tumornekrosefaktor α (TNF α), sondern auch Membranstrukturen auf der Zelloberfläche anderer Zellen in Frage (z.B. Fas (CD95/Apo-1)) [63]. Der DISC aktiviert die Caspasen 8 und 10, die wiederum die Caspasen 3 oder 7 aktivieren. Die folgende intrazytosolische Kaskade resultiert letztlich im apoptotischen Zelluntergang (s. Abbildung 1-3).

Der intrinsische Weg wird durch eine Vielzahl an extrazellulären und intrazellulären Faktoren getriggert. Zu den extrazellulären Stimuli gehören chemische Noxen, Strahlenexposition oder andere physikalische Einflüsse. Intrazellulär sind oxidativer Stress, DNA- oder mitochondriale Schädigungen oder auch Protein-Fehlbildungen von Bedeutung. Kennzeichnend für den intrinsischen Aktivierungsweg ist, dass dieser über mitochondriale Prozesse und dabei über eine Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran („*mitochondrial outer membrane permeabilization*“ (mOMP)) moduliert wird. Dabei spielen Proteine der „*B-cell lymphoma 2*“ (Bcl-2) -Familie eine entscheidende Rolle. Sie sind im Intermembranraum des Mitochondriums als „Wächter der mitochondrialen Integrität“ [64] lokalisiert und bestehen aus pro- und antiapoptotischen Proteinen. Unspezifische apoptotische Signale aktivieren die proapoptotischen Proteine „*Bcl-2-associated X protein*“ (BAX) und „*Bcl-2 antagonist or killer*“ (BAK), die letztlich eine Permeabilisation der äußeren Mitochondrienmembran herbeiführen. Hierüber lösen sie die Freisetzung von Cytochrom c (cyt c) und anderen proapoptotischen Stoffen aus (z.B. OMI/HtrA2, Smac/Diablo, Endonuclease G oder den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF)). Antiapoptotische Bcl2-Proteine verhindern die mOMP, indem sie BAX, BAK und andere Apoptose-aktivierende Proteine binden. Cyt c führt im Cytoplasma mit dem „*apoptotic protease activating factor 1*“ (Apaf-1) zur Aktivierung der Caspase 9, mit der sie ein Proteinpolymer, das Apoptosom bilden [65,66]. Das Apoptosom erlaubt nun die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 und verstärkt die nachfolgende Apoptose-Kaskade [67] (s. Abbildung 1-3).

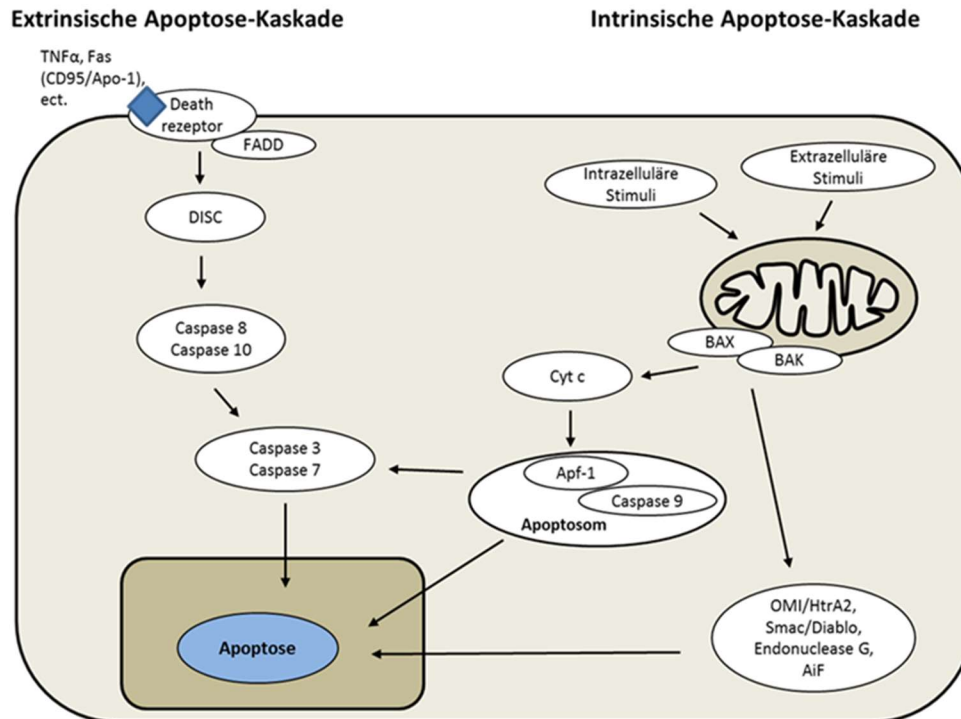


Abbildung 1-3. Vereinfachte Darstellung der mitochondrialen Apoptosekaskade (eigene Darstellung).

Die gemeinsame apoptotische Endstrecke vollzieht sich in einer globalen Proteolyse und der Aktivierung von DNAsen [61]. Zudem aktivieren Proteine der Bcl2-Familie auch Apoptosom-unabhängig eine Caspasen-Kaskade [68]. Ebenso kann eine direkte Caspase-unabhängige Apoptoseinduktion durch Endonuclease G und den AiF über spezifische DNAsen erfolgen [69,70].

Gerade in Bezug auf myotoxische Eigenschaften von Lokalanästhetika kommt insbesondere dem Sarkoplasmatischen Retikulum (SR) sowie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) eine entscheidende Rolle zu. Das ER/SR-System ist in der Lage, unabhängig von der mOMP, den intrinsischen Apoptoseweg im Zusammenhang mit „Zellstress“ (gestörte Glykosylierungsvorgänge, Mangel an Energiemetaboliten oder z.B. aufgrund einer Störung der Ca²⁺-Homöostase) zu aktivieren [71,72].

Es existieren mehrere wechselseitige Ionen-/Proteintransportprozesse zwischen dem SR und den Mitochondrien, die zur Freisetzung apoptotischer Faktoren (z.B. Cytochrom c) und damit zur intrinsischen Aktivierung führen. Als Kommunikationsträger kommen verschiedene Proteine (z.B. auch der Bcl2-Familie, BAX oder BAK) infrage [73–76]. Sie führen hierbei zu einer Veränderung der Ca²⁺-Homöostase, Sensibilisierung des Mitochondriums für apoptotische Signale und der cyt c-Freisetzung sowie zur Induktion von Caspase 12 [77,78].

Die Caspase 12 ist auf der SR-Membran verankert und bei Aktivierung in der Lage eigenständige eine Apoptose-Kaskade auszulösen [79].

1.3.2.2 Einfluss der Lokalanästhetika auf apoptotische Signalkaskaden

Bislang wurden zur genaueren Differenzierung der Relevanz o.g. apoptotischer Mechanismen gezielt einzelne Abschnitte der mitochondrialen Apoptose-Kaskade untersucht. Hierbei wurde u.a. der Einfluss der Lokalanästhetika auf das Caspasen-System, verschiedene Proteinkinase-Systeme oder aber auf das mitochondriale Membranpotential festgestellt [46,80,81]. In Versuchen mit Knockout-Zellen (in Bezug auf FADD, Bcl2, Caspase 8 und Caspase 9) konnte eine relevante Aktivierung des extrinsischen Weges über Zelloberflächenrezeptoren ausgeschlossen und eine Beteiligung des intrinsischen Weges nachgewiesen werden [57]. Auch eine direkte Bupivacain- und Lidocain-induzierte Caspase 3- und Caspase 7-Aktivierung konnte bereits beschrieben werden [56]. Ein Nachweis der Beteiligung von SR-Stress konnte durch einen Bupivacain-induzierten CHOP („*C/EBP homologous protein*“)-Anstieg erbracht werden, der durch ROS-Reduktion teilweise unterdrückt werden kann [50].

Weiterhin existieren direkte toxische Effekte auf das Mitochondrium. Sie können über den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials zur Freisetzung intramitochondrial gespeicherter Apoptose-induzierender Intermembranproteine (z.B. cyt c) führen [46].

1.3.3 Einfluss der Lokalanästhetika auf den mitochondrialen Energie-Metabolismus

Die aerobe ATP-Produktion spielt in Nerven- und Muskelzellen aufgrund des erhöhten Energiebedarfs eine besondere Rolle, die in der vermehrten Anzahl an Mitochondrien zum Ausdruck kommt. Eine Auswirkung von Lokalanästhetika auf den neuronalen Zellstoffwechsel zeigt sich u.a. durch einen Rückgang der ATP-Produktion um ca. 30-50% *in vitro* [51]. Pathogenetisch liegen hierfür mehrere Einflüsse im Bereich der Atmungskette vor. Langwirksame Lokalanästhetika können die oxidative Phosphorylierung entkoppeln und die Atmungskette sowohl in Komplex I als auch in Komplex III hemmen [82–84]. Weiterhin führen sie über eine direkte Hemmung der mitochondrialen F₀-F₁-ATPase zu einem Absinken der ATP-Synthase-Aktivität [85]. Weitere bereits aufgezeigte Mechanismen sind der Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials [86,87] und die Auflösung der intramitochondrialen Strukturen mit konsekutiver Mitoptosis [87]. Zudem konnte nach

langer Bupivacain-Exposition eine Abnahme der Proteindichte der Atmungskette beschrieben werden [87].

1.3.4 Der Einfluss von Lokalanästhetika auf die Ca^{2+} -Homöostase

Ca^{2+} ist ein wichtiger sekundärer Signaltransmitter („*second messenger*“), der auf molekularer Ebene an der Steuerung vieler Prozesse beteiligt ist. In Nervenzellen hat Ca^{2+} besonderen Einfluss auf das neuronale Wachstumsverhalten, die Ausbildung neuer Axone und die Plastizität von Neuronen [88–90]. In Muskelzellen bindet es an Troponin C, wodurch eine Konformationsänderung des Troponin-/Tropomyosin-Komplexes ausgelöst wird, die wiederum eine Bindung zwischen Aktin und Myosin ermöglicht. In beiden Zelltypen hat Ca^{2+} einen entscheidenden Einfluss auf die Modulation von Ionenkanälen und Rezeptoren, die Aktivierung von Enzymen, die Genexpression, sowie letztlich auch auf den mitochondrialen Energie-Stoffwechsel (siehe auch Kapitel 1.3.3.) [91,92]. Ca^{2+} ist außerdem entscheidend am Aufbau des mitochondrialen Membranpotentials beteiligt. Eine Störung beeinträchtigt die Funktion des Mitochondriums und ist in der Lage zum Zelltod zu führen [93]. Bisherige Studien konnten zeigen, dass die Applikation von Lokalanästhetika, insbesondere von Bupivacain, über unterschiedliche und bislang weitgehend unbekannte Mechanismen in engem Zusammenhang mit einer intrazytosolischen Ca^{2+} -Erhöhung steht [40,55].

1.3.4.1 Grundlagen des Mitochondriums und seines Ca^{2+} -Stoffwechsels

Das Mitochondrium besitzt eine Doppelmembran aus je einer Phospholipiddoppelschicht, die äußere („*outer mitochondrial membrane*“ [OMM]) und die innere Membran („*inner mitochondrial membrane*“ [IMM]). Sie unterscheiden sich in ihrem Proteinaufbau. Es bilden sich zwei Kompartimente: der Intermembranraum zwischen innerer und äußerer Membran und die Matrix, der Raum innerhalb der inneren Membran. In der Außenmembran befinden sich unselektive Porine, die eine freie Diffusion von Molekülen < 5 kDa erlauben, sowie Transportsysteme, die den aktiven zielgerichteten Transport von größeren Proteinen ermöglichen. Sie ist vor allem in Myozyten eng mit dem SR über Proteinbindungen verbunden [94,95]. Diese Verbindung wird als „Mitochondrien-assoziierte ER-Membran“ (MAM) bezeichnet und ist am Ca^{2+} -Signalweg, dem Lipid-Stoffwechsel, dem Energiemetabolismus sowie dem Zellüberleben beteiligt [96–98]. In der inneren Membran befinden sich neben den Proteinen des Energiemetabolismus und speziellen Transportproteine auch Integritäts-assoziierte Proteine (z.B. Bcl-2). Zudem regulieren Proteine der IMM das Milieu der Matrix (s. Abbildung 1-4).

1.3.4.2 Der Ca^{2+} -Influx

Der Ca^{2+} -Transport über die OMM erfolgt weitgehend durch freie Diffusion aus dem Zytosol. Zudem besteht eine weitere selektive Transportmöglichkeit, über den spannungsabhängigen Anionen-Kanal, VADC („*voltage-dependent anion channel*“), der spannungsabhängig für Kationen permeabel ist. Dieser ist mit dem SR über das „*Glucose-Regulated Protein 75*“ (GRP75) assoziiert [99–101]. Durch eine Blockade des VDAC konnte bereits gezeigt werden, dass die Störung des Anionen-Einstroms und die gleichzeitiger Erhöhung des Kationeneinstroms zu einer Permeabilitätssteigerung der Mitochondrienmembran mit Folge der Apoptoseinduktion führt [100,102].

In der IMM existiert ein kleiner hochselektiver Ionenkanal, der „*mitochondriale Ca^{2+} -uniporter*“ (MCU), der Teil eines für den Ca^{2+} -Transport verantwortlichen Makroproteinkomplexes ist [103–105]. Er transportiert Ca^{2+} -Ionen entlang des elektrochemischen Gradienten in die Matrix, ohne direkte Kopplung an einen ATP-Verbrauch oder andere Ionenströme [106]. Auch andere zweiwertige Kationen können hierüber mit geringerer Affinität durch die IMM gelangen. Im Jahr 2011 konnte der MCU als 40 kDa-Protein mit zwei Transmembranhelices in der IMM identifiziert werden [101,105]. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls gezeigt werden, dass eine Überexpression des MCU zu einer Abschwächung eines zytosolischen Ca^{2+} -Peaks führt, indem die Ca^{2+} -Aufnahme in die Mitochondrienmatrix verdoppelt wird [104]. Damit kommt dem MCU eine bedeutende Rolle in der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase des Zytoplasmas zu.

Eine indirekte Beeinflussung des MCU durch p38 MAPK (z.B. durch Bupivacain) führt zu einem intramitochondrialen Ca^{2+} -Anstieg [107]. Ca^{2+} selbst gilt als wichtiger Regulator des MCU, der durch einen Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} sowohl aktiviert als auch wieder inaktiviert werden kann [108,109]. Bisherige Studien konnten zeigen, dass der MCU maßgeblich an der Regulation des mitochondrial vermittelten Zelltods beteiligt ist [110]. Weniger relevant, aber aus Gründen der Vollständigkeit erwähnenswert ist ein Ryanodin-Rezeptor innerhalb der IMM, der ebenfalls am Ca^{2+} -Transport in die Matrix beteiligt ist [111,112].

1.3.4.3 Der Ca^{2+} -Efflux

Der Ca^{2+} -Efflux erfolgt über mehrere Proteinsysteme: Neben den beiden mitochondrialen Antiportern $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher („*mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger*“ (mNCCX)) in Verbindung mit der Na^+/H^+ -Pumpe und einem $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher („*mitochondrial $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger*“ (mHCX)) existiert ein spezieller Kanal („*mitochondrial permeability*

transition pore“ (mPTP)), dem neben einem schnellen Ca^{2+} -Auswärts-Transport weitere Funktionen in der Zellorganisation zugeschrieben werden können. Die mPTP nimmt im Ca^{2+} -Stoffwechsel daher eine Sonderstellung ein und wird daher im Rahmen der mitochondrialen Membranpermeabilisation näher erläutert (s. Kapitel 1.3.4.4). Grundlage für die Funktion der Ca^{2+} -Antiporter ist der aktive Na^+ -Auswärtsstransport aus der Matrix bzw. die passive Rückdiffusion der freien Protonen [113–116].

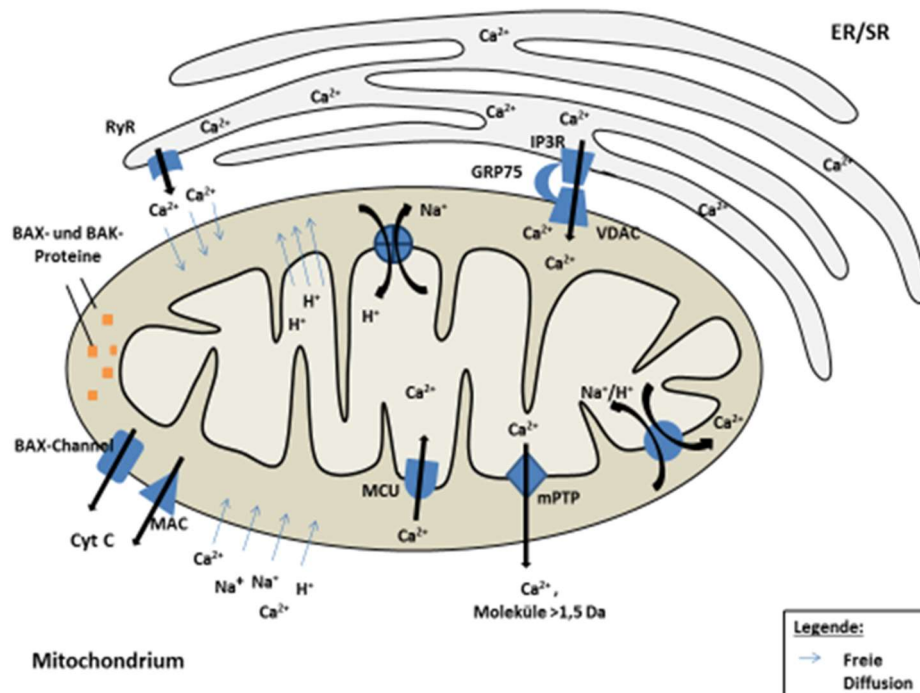


Abbildung 1-4. Schematische Darstellung des Ca^{2+} -Ionenstoffwechsels des Mitochondriums (eigene Darstellung).

1.3.4.4 Die mitochondriale Membranpermeabilisation (mOMP) im Rahmen des Ca^{2+} -Stoffwechsels

Durch Enzyme der Atmungskette, sowie durch mitochondriale Ionenkanäle, entsteht ein Membranpotential $\Delta\Psi$ von ungefähr -180 mV über der inneren Mitochondrienmembran, das für die Funktionalität aller Proteinstrukturen essentiell ist [117]. Der Zusammenbruch dieses Potentials durch die mOMP ist ein entscheidender Schritt in der intrinsischen Aktivierung der Apoptose (siehe auch Kapitel 1.3.2.). Erst dadurch wird die Freisetzung von cyt c über spezifische Kanalsysteme und die darauffolgende Bildung des Apoptosoms möglich. Über den intrinsischen Weg sind BAX und BAK in der Lage neben der Rekrutierung vorhandener Kanäle der OMM, wie der „mitochondrial apoptosis-induced channel“ (MAC), eigenständig Kanäle, die sog. „BAX-Channels“, zu formieren [118], welche die Integrität des

Mitochondriums beeinträchtigen. Ein anderer Weg der mOMP führt über die Aktivierung der „mitochondriale permeability transition pore“ (mPTP), einer weitgehend unspezifischen Pore in der IMM [119]. Alle diese Strukturen sind entscheidend an die Ca^{2+} -Homöostase gekoppelt [93] (s. Abbildung 1-5).

1.3.4.5 Der „BAX-Channel“

Sowohl die antiapoptischen, als auch die apoptischen Proteine der Bcl2-Familie sind dafür bekannt, dass sie in vitro Poren mit verschiedenen Eigenschaften in Membranen formen können [120–122]. Auch BAX und BAK als Hauptakteure der mOMP sind hierzu durch Oligomerisierung bzw. Konformationsänderung in der Lage [116,122–125]. Hierdurch ist zumindest in vitro eine Freisetzung von cyt c ins Zytoplasma bereits beschrieben worden [126].

1.3.4.6 Der “mitochondrial apoptosis-induced channel” (MAC)

Der MAC formiert sich in der frühen Phase des intrinsischen und in der späten Phase des extrinsischen Apoptoseweges in der OMM. Er ist eng verknüpft mit der Freisetzung von cyt c und der Depolarisation des mitochondrialen Membranpotentials [127–129] und ist strukturell mit dem „BAX-Channel“ vergleichbar [129,130].

1.3.4.7 Die „mitochondriale permeability transition pore“ (mPTP)

Die mPTP ist ein Proteinsystem in der IMM und reguliert insbesondere die Ca^{2+} -Konzentration der Matrix und verhindert unter physiologischen Bedingungen eine Ca^{2+} -Überladung [131,132]. Im Gegensatz zu MAC und „BAX-Channel“ ist die Öffnung der mPTP spannungsabhängig. Die geöffnete mPTP besitzt eine hohe Leitfähigkeit für Moleküle bis 1,5 kDa [133] und führt damit zu einer mitochondrialen Depolarisation. Zudem konnte gezeigt werden, dass ein Teil des physiologischen Ca^{2+} -Ausstroms ebenfalls über die mPTP vermittelt wird, indem diese in den Zustand eines langsam-leitenden selektiven Ca^{2+} -Kanal wechselt [132,134,135]. Dieser kann von verschiedenen Effektoren moduliert werden [134]. Die Bedeutung der mPTP für das Zellüberleben ist von der Dauer des Öffnungszustandes abhängig [136], durch den die ATP-Synthese verhindert und gleichzeitig eine ATPase aktiviert werden.

Eine dauerhafte Öffnung kann folglich zum gänzlichen Verlust des Ionen-Gradienten, zu einem osmotisch bedingten Anschwellen des Mitochondriums, zur Entfaltung der Cristae und zur Ruptur der äußeren Membran führen [137]. Additiv erfolgt die Ausschüttung von

1.3.4.8 Die Rolle des Ca^{2+} -Stoffwechsels des ER/SR und seine Veränderung durch Lokalanästhetika

Am SR konnte die Relevanz der Beeinflussung des Ca^{2+} -Stoffwechsels bereits gezeigt werden. Im Ruhezustand wird Ca^{2+} mit Hilfe von membrangebundenen Ca^{2+} -ATPasen kontinuierlich aus dem Zytosol in das SR gepumpt. Diese gewährleisten den sofortigen Rücktransport von Ca^{2+} nach Freisetzung Ca^{2+} ins Zytoplasma, sodass die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration weitgehend konstant bleibt. Außerdem halten sie einen Gradienten von $1:10^4$ bis $1:10^5$ über der Membran des SR aufrecht [145]. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration liegt bei $0,1 \mu\text{M}$ und kann bei Stimulation durch ein Aktionspotential kurzzeitig auf das 100- bis 1000-fache ansteigen. Dabei wird Ca^{2+} aus den zellulären Speichern freigesetzt. Es gibt zwei unterschiedliche intrazelluläre Ca^{2+} -Kanäle, die für den schnellen Ca^{2+} -Anstieg im Zytoplasma verantwortlich sind, der Ryanodinrezeptor (RyR) und der Inositol-Triphosphat-Rezeptor (IP3R). Nach Aktivierung führen sie zu einer Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR in das Zytoplasma. Beide Kanäle weisen in ihrem Aufbau strukturelle Ähnlichkeiten auf und existieren in mehreren Isoformen [146]. Der IP3-Rezeptor ist ein Protein mit sechs Transmembrandomänen, das sich im SR befindet. Gewebeabhängig sind drei unterschiedliche Isoformen zu finden [147,148]. Er wird hauptsächlich durch Ca^{2+} oder Inositol-Triphosphat (IP3) kontrolliert [149]. Darüber hinaus existieren zur Modulation Steuerungsdomänen, die durch diverse Kinasesysteme phosphoryliert und damit aktiviert werden können. Daran beteiligt sein können die Protein Kinase A (cAMP-abhängig) [150], die Protein Kinase B (Akt/PKB) [151], die Protein Kinase G (cGMP-abhängig) [152], die Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CaMKII) [153], die Protein Kinase C (PKC) [154] und verschiedene Protein-Tyrosin Kinasen (PTK) [155]. Der IP3-Rezeptor ist dafür bekannt, dass er Ca^{2+} aus dem SR freisetzt und so als second-Messenger zwischen SR und Mitochondrium dient. Der RyR ist in unterschiedlichen Organen in drei verschiedenen Isoformen exprimiert: RyR1 findet sich vor allem in Muskelgewebe, RyR2 wird dem Herz zugeordnet und RyR3 findet man in Nervenzellen. Es ist jedoch auch bekannt, dass auch alle drei Isoformen nebeneinander exprimiert vorliegen können [156,157]. Studien legen nahe, dass der RyR1 am SR über direkte physikalische Bindungen mit einem Proteinkomplex in der Zellmembran verbunden ist, dem Dihydropyridin-Rezeptor [158]. Über sog. „elektromechanische Kopplung“ wandelt er Potentialveränderungen der Muskelfibrille durch ankommende Aktionspotentiale in ein Aktivierungssignal für den RyR1 um. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des RyR1 und folglich zur Ca^{2+} -Ausschüttung aus dem SR [159]. In verschiedenen Untersuchungen konnte die Myotoxizität der Lokalanästhetika mit dem Anstieg der zytosolischen

Ca^{2+} -Konzentration in Verbindung gebracht werden. Mit Hilfe von Quereceptin, das die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR blockiert, konnte nachgewiesen werden, dass eine Schädigung der Myozyten bei fehlendem zytosolischem Ca^{2+} -Einstrom ausbleibt. Selbiges zeigte sich in Anwesenheit von Ca^{2+} -Antagonisten, wie Verapamil [160,161]. Es gibt nur wenige Studien zum Ca^{2+} -Stoffwechsel in Neuronen, aber auch sie zeigen, dass auch hier die Toxizität von Lokalanästhetika in engem Zusammenhang mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration steht [54]. Am ehesten lässt sich der Einfluss auf den Ca^{2+} -Stoffwechsel durch eine Beeinflussung des Aufnahmemechanismus und der Entleerung der zytosolischen Ca^{2+} -Speicher erklären, wie im Folgenden erklärt wird. Abhängig von der Isoform des RyR, fördert Bupivacain insbesondere in Muskelzellen den Ca^{2+} -Ausstrom durch den RyR1 aus dem SR [162]. Auch andere Lokalanästhetika wurden auf ihren Einfluss auf den RyR untersucht [163]. Zusätzlich konnte der Einfluss von Bupivacain auf die Ca^{2+} -ATPase und damit auf die Wiederaufnahme von Ca^{2+} nachgewiesen werden. Weiterhin zeigten sich Veränderungen der Sensibilisierung der Ca^{2+} -Bindestellen an den Proteinkomplexen und des Kontraktionsapparates [55]. Auch andere Lokalanästhetika können die Wiederaufnahme der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR hemmen [164]. Ein Effekt auf die Membranpermeabilität des SR mit Erhöhung der Ca^{2+} -Leitfähigkeit scheint von untergeordneter Wichtigkeit zu sein. Wie genau Bupivacain und die übrigen Lokalanästhetika auf die Rezeptoren des SR wirken, ist bislang ungeklärt. Man vermutet, dass Bupivacain über die Produktion von reaktiven ROS zu einer Modulation des RyR sowie der Membranpermeabilität des SR führt [50]. Andere Studien sprechen von einer direkten Interaktion am RyR [163]. Ebenso scheinen Lipophilie und Stereoselektivität die Effektivität der Ca^{2+} -Beeinflussung zu verändern [165].

1.3.5 Oxidativer Stress durch Lokalanästhetika

Reaktive Sauerstoffspezies („*reactive oxygene species*“, ROS) sind Stoffwechselprodukte, die im Rahmen einer aeroben Energiegewinnung anfallen und sehr toxisch sind [166,167]. Zum Schutz der Zelle existieren mehrere Mechanismen (Katalasen, Glutathion Peroxidase), die einen erhöhten Anfall solcher Substanzen verhindern, und die durch ROS verursachte Schäden reparieren können [168]. Die AMP-abhängige Protein-Kinase, verstärkt in bestimmten Konstellationen die Produktion von ROS [169]. ROS sind in der Lage ebenfalls den Ca^{2+} -Stoffwechsel der Zelle durch Beeinflussung der beteiligten Kanalsysteme zu verändern und zu einem Überangebot an freiem Ca^{2+} zu führen [170,171]. Bupivacain initiiert eine erhöhte Produktion von ROS [82,172], die SR-Stress und somit eine Apoptose-Kaskade auslösen können [50].

2 Zielsetzung

Lokalanästhetika, allen voran Bupivacain mit dem höchsten myotoxischen Potential, wirken konzentrationsabhängig toxisch auf Skelettmuskelzellen. Insbesondere sind sie in der Lage in Myozyten apoptotische Mechanismen zu initiieren. Die genauen Signalwege sind bislang kaum aufgeklärt. Die Korrelation der Lokalanästhetika-vermittelten Myotoxizität mit der Ca^{2+} -Homöostase und die gleichzeitige Bedeutung sowohl direkter Zellschädigung, als auch der Apoptoseinduktion (über mehrere Signalwege) konnten bereits gezeigt werden. Hierbei scheint die Interaktion mit Mitochondrien einen wesentlichen Beitrag zu leisten.

Das Ziel der Arbeit ist es an murinen Muskelzellen die Rolle des Mitochondriums und der mitochondrialen Signalwege im Rahmen einer Bupivacain-Exposition zu betrachten. Durch gezielte Blockade exemplarisch bedeutsamer mitochondrialer Kanäle soll deren Bedeutung für die Signalwege der Myotoxizität von Lokalanästhetika analysiert werden.

Mitochondriale Apoptosekaskaden werden unter anderem durch eine intrazelluläre Erhöhung lokaler Ca^{2+} -Konzentration getriggert [93,173]. Der Signalweg wird hierbei über mehrere Transportprozesse vermittelt. Im Rahmen der Studienvorbereitung wurden drei wichtige Ca^{2+} -getriggerte Kanäle der Apoptose, nämlich die mPTP, der MAC und der MCU, mittels Literaturstudium identifiziert (s. Kapitel 1.3.4). Alle betrachteten Transportkanäle können selektiv durch verschiedene Substanzen blockiert werden, sodass die Ca^{2+} -vermittelte Signalkaskade an dieser Stelle gezielt unterbrochen werden kann. Aus bereits veröffentlichten Untersuchungsergebnissen konnten entsprechend geeignete Substanzen identifiziert und die vermeintlich benötigten Substanzkonzentrationen abgeschätzt werden (s. Kapitel 4.3.2). Die mPTP kann durch Cyclosporin A (CsA) blockiert werden [174,175]. Für den MAC wurde der Blocker „*mitochondrial apoptotic inhibitor*“ (iMAC) ausgewählt [176,177]. Ein spezifische Blocker für den MCU ist Ru360 [178].

3 Material

3.1 Geräte

CO2-Inkubatoren Heracell 150i	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Digital-pH-Meter	Knick, Berlin, Deutschland
Durchflusszytometer FACS Calibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage BP 2215	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank	Bosch, Gerlingen, Deutschland
Kühlschrank	Bosch, Gerlingen, Deutschland
Lichtmikroskop Leitz DMIRB	Leica, Wetzlar, Deutschland
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten Pipetmon (10, 200, 1000 µl)	Gilson, Limburg an der Lahn, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex super RK510 H	Bandelin, Berlin, Deutschland
Zellbank klein, Lamin Air HB 2448	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Zellbank groß, Hera safe KS	Thermo Fisher scientific Inc., Waltham, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus sepatech, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge stratos	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus instruments, Hanau, Deutschland

3.2 Verbrauchsmaterialien

Combitips	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Einweg-Pipettenspitzen (100,200,1000 µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
FACS-Röhrchen, 5 ml	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Falkons (15, 50 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Falkons braun (50 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Falkon Zellkulturflasche	Schuber&Weiss, München, Deutschland
Glaspipetten (1, 5, 10, 25, 50 ml)	Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland
Tissue Culture Multi-Wellplatten 24	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

3.3 Chemikalien und Reagenzien

3.3.1 Medikamente

Bupivacain hydrochloride	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Bax channel Blocker Imac	Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, USA
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ru360	Calbiochem, EMD Millipore, Billerica, USA

3.3.2 Kits

FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I	BD Pharmingen TM, Heidelberg, Deutschland
--	---

3.3.3 Sonstiges

Aqua dest.	Laboreigene Herstellung
BD FACS Flow	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BD FACS Rinse Solution	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Chicken Embryo extract lyophilized (CEE)	Seralab, West Sussex, United Kingdom
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	PAA, Cölbe, Deutschland
Fetales Kälber Serum (FKS)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Hepes Buffer (1 M)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Horse Serum (HS)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
L-Glutamin 2mM	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat NaOH (1mol/L)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin-Lösung (Pen/Strep)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Salzsäure (HCl) (0,1%)	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
RPMI 1640	PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland
0,5% Trypsin/EDTA	Life Technologies Ltd, Pailey, UK

3.4 Verwendete Zellen

Primäre Zellkultur aus: BALB/c AnNcrI Mäuse	Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland
Zellkultur aus: C2C12-Zellen	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

3.5 Datenbank und Software

Citavi 5	Swiss Academic Software, Wädenswil, Schweiz
Flow Jo	TreeStar, Ashland, USA
IBM SPSS Statistics 21	IBM, Armonk, USA
Microsoft Office Excel 2010	Microsoft, Redmond, USA
Microsoft Office Word 2010	Microsoft, Redmond, USA,

4 Methoden

4.1 Verwendete Zellen

Um die myotoxische Wirkung von Bupivacain genauer zu untersuchen, wurden bereits im Vorfeld Zellkulturmodelle aus murinen Muskelzellen etabliert. Unter sterilen Kautelen und konventionellen Kulturbedingungen von 37°C, 5% CO₂ und 97% Luftfeuchtigkeit wurden eigenständig gewonnene primäre Mausmuskelzellen (pM-Zellen) aus BALB/c AnNcrI-Mäusen (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland), sowie kommerziell erhältlichen immortalisierten C2C12-Zellen (Sigma Aldrich, München) kultiviert.

4.1.1 C2C12-Zellen und ihre Gewinnung

Die C2C12-Zellen wurden in 10 ml-Zellkulturflaschen unter konventionellen Bedingungen kultiviert. Es wurde sowohl ein Kulturmedium, das der Vermehrung der Zellen diene, als auch ein Differenzierungsmedium, das zur Ausdifferenzierung in reife Muskelzellen führt, verwendet. Sie setzten sich wie folgt zusammen.

Proliferationsmedium (Medium A):	RPMI 1640
	+ 20% Fetales Kälber-Serum (FKS)
	+ 1% 2mM L-Glutamin
	+ 1% Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)
Differenzierungsmedium (Medium B):	RPMI 1640
	+ 2% Horse Serum (HS)
	+ 1% 2mM L-Glutamin
	+ 1% Pen/Strep

4.1.2 Primäre Mausmuskelzellen und ihre Gewinnung

Die primären Mausmuskelzellen wurden unter Berücksichtigung der Regularien der lokalen Tierschutzkommission entsprechend laborinternen Protokollen durch das dort beschäftigte Fachpersonal durch Präparation der Mm. extensor digitorum longus, Mm. soleus und Mm. tibialis anterior aus Muskelgewebe von BALB/c AnNcrI-Mäusen gewonnen und dankenswerterweise zur Verfügung gestellt.

Analog der Kultivierung von C2C12-Zellen wurden auch hier zwei Kulturmedien benötigt: ein Proliferationsmedium zur Vermehrung der Zellen und ein Differenzierungsmedium zur Ausreifung in Myozyten.

Proliferationsmedium (Medium A):

DMEM

- + 10% FKS
- + 10% HS
- + 1% 2mM L-Glutamin
- + 1% Pen/Strep
- + 1% CEE

Differenzierungsmedium (Medium B):

DMEM

- + 2% HS
- + 1% 2mM L-Glutamin
- + 1% Pen/Strep
- + 0,5% CEE (gelöst in Aqua dest.)

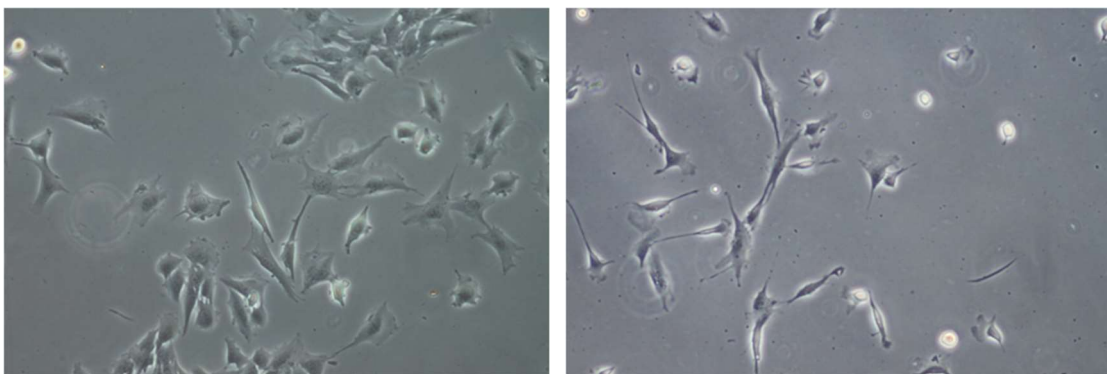


Abbildung 4-1. Zellkulturen in Proliferationsphase unter dem Lichtmikroskop; A: vereinzelte C2C12-Zellen, B: vereinzelte primäre Mausmuskelzellen (400-fache Vergrößerung).

4.2 Zellkultur

Aus beiden Zellkulturen wurde jeweils eine Passage herangezogen und bei -196°C im Stickstofftank konserviert, sodass alle Versuchsreihen auf diese Ur-Passagen basieren. Nach selektivem Auftauen wurden die Zellen entsprechend den o.g. Kulturbedingungen mit Medium A inkubiert. Jeden zweiten Tag erfolgte ein Mediumwechsel unter Temperaturerhaltung. Nach mikroskopischer Kontrolle erfolgte eine Passagierung bei konfluenter Zellausbreitung (in der Regel nach je 4-5 Tagen).

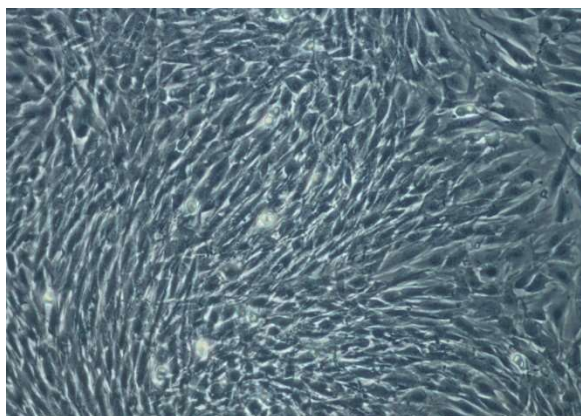


Abbildung 4-2. Konfluente C2C12-Zellen am Tag des Versuchsbeginns (200-fache Vergrößerung).

4.2.1 Vorbereitungen

Zur Kultivierung und Inkubation der pM-Zellen wurden die Zellkulturflaschen zunächst mit einer Matrigellösung beschichtet. Kommerziell erhältliches reines Matrigel wurde dazu im Verhältnis 1:10 mit reinem DMEM verdünnt. Pro Kulturflasche wurden 0,5 ml der hergestellten Matrigellösung verwendet. Hierbei wurde auf eine gleichmäßige Benetzung geachtet. Im Anschluss wurden die Flaschen mind. 30 min vor Zellzugabe unter o.g. Kulturbedingungen leer inkubiert. (Für die C2C12 Zellen waren keine vorbereitenden Maßnahmen erforderlich, sie konnten direkt in Medium A, auf den unbehandelten Flaschenboden wachsend, inkubiert werden).

4.2.2 Auftauen

Die Kryoröhrchen mit den gefrorenen Zellen wurden unter warmem Wasser zunächst leicht angetaut, bis sich das Eis vom Rand löste und das Eispellet in 10 ml Proliferationsmedium (kalt) überführt werden konnte, um die Temperaturunterschiede gering zu halten. Das Zentrifugenröhrchen wurde sofort für 5 min bei 4°C und 425 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde im Anschluss nach Absaugen des Überstands in 10 ml warmen (37°C)

Proliferationsmedium resuspendiert und in Kulturflaschen überführt. Es erfolgte ein weiterer Wechsel des Mediums innerhalb von 24 h um letzte Reste des Einfriermediums zu entfernen.

4.2.3 Passagieren

Bei einer Zelldichte >90% (nach lichtmikroskopischer Kontrolle) wurde ein Passagieren der Zellen nötig. Hierzu wurden das vorhandene Medium entfernt und die Muskelzellen zum Entfernen von weiteren Stoffwechselprodukten mit 10 ml PBS gespült. Anschließend wurden zur Lösung der Zellen 4 ml Trypsin-Lösung (1:10) hinzugegeben und die Zellen damit i.d.R. für 2 min. (je nach Erfolg) inkubiert. Trypsin führt zu Spaltung extrazellulärer Proteinstrukturen, lockert dadurch die Gewebestruktur und führt somit zu einer leichteren Ablösung der adhären wachsenden Zellen. Die Wirkung des Trypsins wurde im Anschluss durch Zugabe eines Überschusses an Medium A (hier 6 ml) gestoppt und die Zellsuspension in einem 50 ml Falcon für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das verbleibende Pellet wurde in 10 ml Proliferationsmedium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend in Kulturflaschen überführt.

4.2.4 Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zellen wurden zunächst passagiert und anschließend in einem Zentrifugenröhrchen in 10 ml Proliferationsmedium gelöst. Nun wurden je 10 µl von beiden Seiten in die Zählkammer gegeben und die 16-Felder-Kammer unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$\text{Arithmetisches Mittel aus 4 Zählquadranten} \times \text{Verdünnungsfaktor (10.000)} = \text{Zellen/ml}$

4.2.5 Einfrieren

Zum Einfrieren der Zellen wurden drei verschiedene Medien benötigt, deren Zusammensetzung im Folgenden aufgeführt ist.

Basismedium:	Je nach Zellart: RPMI oder DMEM mit mind. 30% FKS
Einfriermedium I:	90% Basismedium + 10% Hepes (20 µM)
Einfriermedium II:	70% Basismedium + 10% Hepes (20µM) + 20% DMSO

Alle Medien wurden kurz vor dem Einfriervorgang hergestellt. Einfriermedium I und II mussten auf Eis gelagert werden. Die gewünschten Kulturflaschen wurden geerntet und ausgezählt. Die ausgezählte Zellsuspension wurde zentrifugiert und das Zellpellet anschließend in 10 ml Basismedium resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das entsprechende Zellpellet in 5 ml Einfriermedium I gelöst. Zuletzt wurden je 600 µl der Zellsuspension mit Einfriermedium I in die bereitstehenden Kryoröhrchen gegeben und je Kryoröhrchen 600 µl Einfriermedium II zugegeben. Die Einfrierbox wurde initial 12 h in einem Gefrierschrank mit -80°C gelagert und innerhalb von 24 h in einem Stickstofftank bei -196°C zur Langzeitlagerung verwahrt.

4.3 Protokolle zur Intoxikation mit Bupivacain

Um die Wirkung der mitochondrialen Ionenkanalblocker und des Bupivacains auf die pM- und C2C12-Zellen in vitro zu untersuchen, wurden diese mit unterschiedlichen Konzentrationen beider Stoffe unter verschiedenen Zeitbedingungen (s. Abbildung 4-3) inkubiert.

4.3.1 Auswahl des verwendeten Bupivacain und seiner Konzentrationen

In bereits veröffentlichten Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte eine Konzentrationsabhängigkeit der Bupivacain-induzierten Myotoxizität beschrieben werden [179]. Orientierend an den somit bereits ermittelten toxisch relevanten Lokalanästhetikakonzentrationen wurden im Rahmen eines Vorversuchs die verwendete Bupivacain-Konzentrationsbreite an C2C12-Zellen zunächst eingegrenzt und dann für alle Versuchsansätze für C2C12-Zellen und pM-Zellen verwendet.

Die Muskelzellen wurden hierzu mit Bupivacain-Lösungen der Konzentration von 0 ppm (0mM), 500 ppm (1,73 mM), 1000 ppm (3,47 mM), 1350 ppm (4,68 mM), 1750 ppm (6,07 mM) und 2500 ppm (8,67 mM) inkubiert. Für die Vorversuche wurden 24-Well-Platten verwendet. Pro Well ergab sich ein Endvolumen von 1 ml, das sich zur Hälfte aus Proliferationsmedium und zur anderen Hälfte aus der entsprechenden Bupivacain-Lösung zusammensetzte. Daher wurden reine Bupivacain-Lösungen mit den doppelten Konzentrationen angesetzt. Da Bupivacain in Form von Bupivacain-Hydrochlorid (BHCl)- Pulver vorlag, wurde in einer vorhergehenden Berechnung zunächst die Masse des reinen Bupivacain in dem vorliegenden BHCl-Pulver bestimmt. Davon abgeleitet wurde dann die nötige Masse der BHC-Mischung errechnet.

Da BHCl in basischen Medien aufgrund seines pKa-Werts von 8,1 kaum löslich ist, wurde als Grundlage für die BHCl-Lösung ein Mediumgemisch Medium 1 hergestellt, das neben dem sehr basischen Proliferationsmedium (Medium A) auch einen Anteil einer Pufferlösung PBS enthielt, wodurch sich die Gesamtbasizität der Mischung relativierte.

Medium 1: PBS + Medium A (1:1)

Für die jeweiligen Bupivacain-Lösungen wurde jeweils je 15 ml einer entsprechenden Verdünnung angefertigt (s. Tabelle 4-1). Zudem wurde durch Zugabe von je 0,05 ml HCl 0,1M pro 15 ml eine vollständige Löslichkeit des BHCl gewährleistet.

Tabelle 4-1. Verdünnungsreihe der Bupivacain-Lösungen des Vorversuchs.

Medium 1		32 ml PBS	+ 32 ml Medium A
0 ppm		15 ml Medium 1	
1000 ppm	16,9 mg BHCl	+ 14,95 ml Medium 1	+ 0,05 ml HCl
2000 ppm	33,79 mg BHCl	+ 14,95 ml Medium 1	+ 0,05 ml HCl
2700 ppm	45,62 mg BHCl	+ 14,95 ml Medium 1	+ 0,05 ml HCl
3500 ppm	59,13 mg BHCl	+ 14,95 ml Medium 1	+ 0,05 ml HCl
5000 ppm	84,48 mg BHCl	+ 14,95 ml Medium 1	+ 0,05 ml HCl

Für die jeweilige Lösung wurde mit Hilfe der Feinwaage die entsprechende Menge BHCl eingewogen und unter sterilen Bedingungen in 14,95 ml Medium 1 und 0,05 ml HCl 0,1 M mit Hilfe eines Ultraschallbads gelöst. Vor Exposition der Zellen wurde die Lösung zunächst durch Zugabe von NaOH (1 M) auf einen annähernden neutralen pH um 7,0 bei Raumtemperatur gebracht. Die hierbei zugeführten NaOH-Volumina lagen im Bereich zwischen 5 µl bis 20 µl, sodass eine Auswirkung auf die endgültige Bupivacain-Konzentration vernachlässigbar ist. Der pH-Wert wurde mit Hilfe eines pH-Meters bestimmt.

In Anlehnung an bereits vorhandener Arbeitsprotokolle der Arbeitsgruppe wurden die C2C12-Zellen für zwei Stunden bei entsprechender Bupivacain-Konzentration (Medium 1) und in Proliferationsmedium (Medium A) inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium vollständig entfernt und durch Proliferationsmedium (Medium A) für weitere 24 h unter Kulturbedingungen ersetzt. Anschließend wurden die Zellen gelöst, mit Propidiumiodid/Annexin V angefärbt (s. Kapitel 4.4.5.24.4.5.2) und mit Hilfe der Durchflusszytometrie valuiert.

Anhand der Ergebnisse dieses Vorversuchs wurde die Konzentrationsbreite für Bupivacain auf die Konzentrationen von 0 ppm (0mM), 1000 ppm (3,47 mM), 1350 ppm (4,68 mM) und 1750 ppm (6,07 mM) eingegrenzt (s. Kapitel 5.1.2).

4.3.2 Auswahl der verwendeten Blocker-Konzentrationen

Die mPTP kann durch Cyclosporin A (CsA) blockiert werden [174,175]. Die in der Literatur beschriebenen erforderlichen Konzentrationen für CsA liegen bei etwa 0,5 μM [133]. Es wurde daher folgender Konzentrationsbereich ausgewählt: 0 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1 μM und 5 μM .

Der Blocker „*mitochondrial apoptotic inhibitor*“ (iMAC) kann den MAC erfolgreich blockieren [176,177]. Die in der Literatur bislang erwähnten Konzentrationen für eine vollständige Blockade des MAC liegen zwischen 0,8 μM und 5 μM [133,176,177]. Für diese Arbeit wurden demnach folgender Konzentrationsbereich gewählt: 0 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM und 5 μM .

Schließlich wurde für die Blockade des MCU der spezifische Blocker Ru360 verwendet [178]. In Anlehnung an die Richtwerte der Literaturinformation von Ru360 ergibt sich nach ca. 30 min. eine spezifische Blockade des MCU mutmaßlich bei Konzentrationen von ca. 10 μM in intakten Myozyten [180]. Daher wurden in dieser Arbeit die Konzentrationen 0 μM , 0,5 μM , 2,5 μM , 5 μM und 10 μM für Ru360 verwendet.

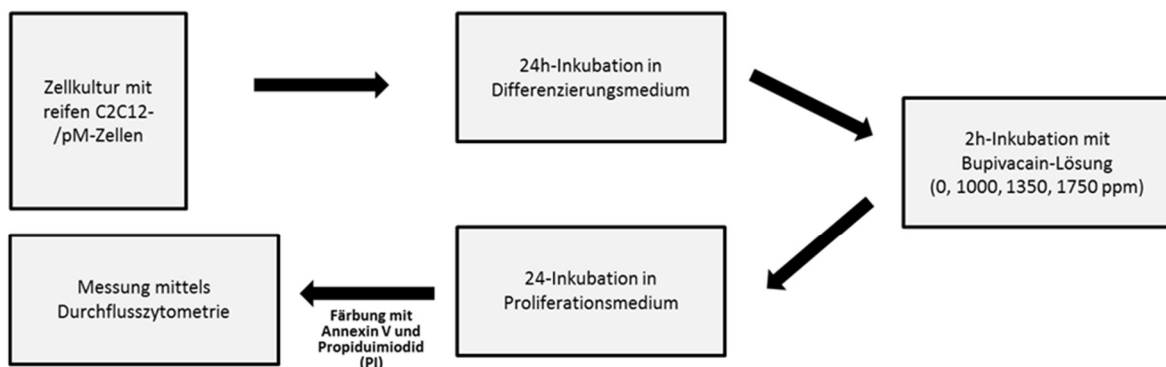
Für alle Blockerkonzentrationen wurde eine Präinkubationszeit mit der doppelten reinen Blockerlösung vor Zugabe des Bupivacain verwendet, unter der Vorstellung, dass die Substanzen bis zur Erreichung ihrer maximalen Wirkung am Bestimmungsort eine gewisse Zeitspanne benötigen. Diese Zeiten sind bislang nicht näher quantifiziert worden. Lediglich die Literaturinformation von Ru360 liefert einen vergleichbaren Ansatz von ca. 30 min [180]. Es wurden daher jeweils mehrere unterschiedliche Zeitspannen der Präinkubation betrachtet: 0 min, 15 min, 30 min und 60 min.

4.4 Versuchsdurchführung

Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurden Myozyten mit unterschiedlichen verdoppelten Blocker-Konzentrationen und verschiedenen Präinkubationszeiten (0 min, 15 min, 30 min, 60 min) inkubiert und nach Präinkubation in einer Bupivacain-haltigen Lösung unterschiedlicher Konzentrationen (0 ppm, 1000 ppm, 1350 ppm, 1750 ppm) zusammen mit der

normalen Blocker-Konzentration für weitere zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eine 24-stündige Erholungsphase überführt, nach der sie anschließend mit den Farbstoffen Annexin V/FITC (Annexin) und Propidium-Iodid (PI) gefärbt und mittels Durchflusszytometrie differenziert wurden. Beurteilt wurde der Anteil apoptotischer (Annexin⁺-Zellen), primär nekrotischer (PI⁺/Annexin⁻-Zellen) und vitaler Zellen (PI⁻/Annexin⁻-Zellen).

1. Vorversuche



2. Hauptversuche

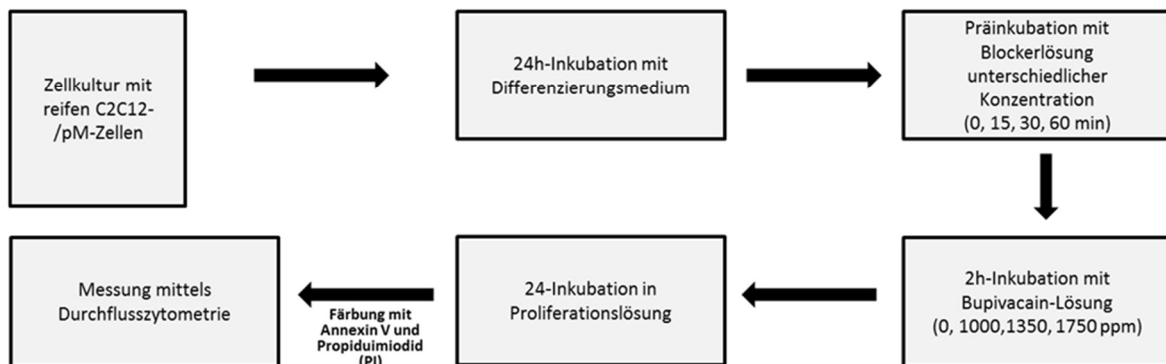


Abbildung 4-3. Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Vor- und Hauptversuche.

4.4.1 Einflussfaktoren und Fehlerquellen in der Versuchsanordnung

4.4.1.1 Der Einfluss des Lösungsmittels DMSO

CsA und iMAC wurden aufgrund ihrer Lipophilie in DMSO (0,12 % -ige Lösung für CsA und 0,139 % -ige Lösung für iMAC) gelöst. Das Lösungsmittel DMSO gilt als potentiell zelltoxische (insbesondere durch Apoptoseinduktion) [181]. Ein Einfluss von DMSO im Kontext dieser Arbeit wurde in Vorversuchen ausgeschlossen (s. Kapitel 5.1.3.).

Ru360 wurde in destilliertem autoklavierten Wasser gelöst. Das verwendete Proliferationsmedium selbst enthielt zum größten Teil Wasser, mit einer toxischen Wirkung von Ru360 war somit nicht zu rechnen. Aus Gründen der Vollständigkeit wurden im Vorfeld ebenfalls Untersuchungen mit einer Proliferationsmedium-Lösung (zu 0,551% mit destillierter autoklavierten H₂O -Lösung verdünnt) durchgeführt. Sowohl bei C2C12- als auch den pM-Zellen ergaben sich keine Veränderungen der Anteile Annexin⁺- oder PI⁺-Zellen (Daten nicht gezeigt).

4.4.1.2 Der Einfluss der mitochondrialen Blockerlösungen

Im Vorfeld wurde ein toxischer Einfluss der reinen Blockerlösungen auf beide Zellpopulationen ausgeschlossen. Alle verwendeten Blocker greifen in den Ionenstoffwechsel des Mitochondriums ein und können dadurch potentiell die Zellhomöostase stören. Es wurde diesbezüglich für jede Versuchskonstellation der Effekt der reinen Blockerlösungen auf beide Zelllinien mituntersucht. Ein Einfluss von CsA, iMAC und Ru360 auf die Fragestellung konnte dadurch im Vorfeld ausgeschlossen werden.

4.4.2 Herstellung der Medien

Für einen Ansatz der Versuchsreihe wurden drei 24-Wellplatten verwendet. Pro Lösungsansatz wurde ein Gesamtvolumen von 1 ml gewählt. Dieses setzte sich aus der Bupivacain-Lösung und der Blockerlösung zusammen. Es wurden entsprechend des gewählten Gesamtvolumens sowohl Bupivacain-Lösungen als auch Blocker-Lösungen in höherer Konzentration vorbereitet, sodass nach Mischung eine korrekte Konzentration beider Bestandteile im Lösungsgemisch vorlag.

4.4.2.1 Bupivacain-Lösungen im Hauptversuch

Anhand der Vorversuche wurden Bupivacain-Konzentrationen von 0 ppm (0mM), 1000 ppm (3,47 mM), 1350 ppm (4,68 mM) und 1750 ppm (6,07 mM) festgesetzt. Analog zur Herstellung der Vorversuchs-Lösungen wurden auch in den Hauptversuchen wieder reine Bupivacain-Lösungen in doppelter Konzentration hergestellt (s. Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2. Verdünnungsreihe der Bupivacain-Lösungen des Hauptversuchs

Medium 1		32 ml PBS	+ 32 ml Medium A
0 ppm		15 ml Medium 1	
2000 ppm	33,79 mg BHCl	+ 14,95 ml Medium 1	+ 0,05 ml HCl

2700 ppm	45,62 mg BHCl	+ 14,95 ml Medium 1	+ 0,05 ml HCl
3500 ppm	59,13 mg BHCl	+ 14,95 ml Medium 1	+ 0,05 ml HCl

4.4.2.2 Cyclosporin A-Lösungen

CsA (5 mg) wurde zunächst in 0,5 ml DMSO in Lösung gebracht. Für die Versuchsdurchführung waren Lösungen der Konzentrationen 0,2 μ M, 1 μ M, 2 μ M und 10 μ M erforderlich. Als Ausgangslösung wurden zunächst 13,5 ml einer Stammlösung der Konzentration 10 μ M hergestellt, aus der die übrigen benötigten Lösungen am Versuchstag verdünnt wurden. (Da die Stammlösungen einen DMSO-Gehalt von 0,12% DMSO enthielt, wurden auch die übrigen CsA-Lösungen durch Zugabe von DMSO entsprechend an diesen Prozentsatz angeglichen). Als Kontrolllösung (= 0 μ M CsA) wurden sowohl ein reines Proliferationsmedium (Medium A), als auch eine DMSO-Lösung (0,12%) verwendet (s. Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3. Schema zur Herstellung der Cyclosporin A-Lösungen

Stammlösung:	16,24 μ l	CsA+DMSO	+	13,48 ml Medium A	
10 μ M:					
0,2 μ M:	0,18 ml	Stammlösung	+	8,80 ml Medium A	+ 10,60 μ l DMSO
1 μ M:	0,9 ml	Stammlösung	+	8,09 ml Medium A	+ 9,74 μ l DMSO
2 μ M:	1,8 ml	Stammlösung	+	7,19 ml Medium A	+ 8,66 μ l DMSO
DMSO:				9,98 ml Medium A	+ 12 μ l DMSO
Medium A:				9 ml Medium A	

4.4.2.3 iMAC-Lösungen

Auch iMAC (5 mg) wurde in DMSO (1ml) gelöst. Für die Versuchsdurchführung wurden Lösungen der Konzentrationen 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M und 10 μ M hergestellt. Zunächst wurden 17,5 ml einer 10 μ M-Stammlösung hergestellt. Die übrigen Lösungen wurden über eine Verdünnungsreihe generiert. Da die Stammlösungen einen DMSO-Gehalt von 0,139 % enthielten, wurden auch hier die weiteren Lösungen entsprechend adaptiert. Ebenfalls wurde als

Kontrolllösung (= 0 μ M iMAC) sowohl eine 0,139%-ige DMSO-Lösung, als auch reines Proliferationsmedium (Medium A) verwendet (s. Tabelle 4-4).

Tabelle 4-4. Schema zur Herstellung der iMAC-Lösungen.

Stammlösung:	24,34 μ l	iMAC+DMSO	+	17,47 ml Medium A	
10 μ M:					A
1 μ M:	1ml	Stammlösung	+	9 ml Medium A	+ 12,52 μ l DMSO
2 μ M:	2ml	Stammlösung	+	8 ml Medium A	+ 11,12 μ l DMSO
4 μ M:	4ml	Stammlösung	+	6 ml Medium A	+ 8,34 μ l DMSO
DMSO:				9,98 ml Medium A	+ 13,9 μ l DMSO
Medium A:				9 ml Medium A	

4.4.2.4 Ru360-Lösungen

Ein Milligramm des Blockers Ru360 wurde in 1 ml sterilisiertem Aqua dest. (H₂O) gelöst. Zur Versuchsdurchführung wurden Lösungen der Konzentration 0,5 μ M, 2,5 μ M, 5 μ M und 10 μ M aus einer Stammlösung (10 μ M) vorbereitet. Die Konzentrationen 0,5 μ M, 2,5 μ M und 5 μ M wurden aus einer vorher hergestellten Stammlösung von 10 μ M verdünnt. Die verwendete Kontrolllösung (= 0 μ M Ru360) entsprach hier entweder reinem Proliferationsmedium (Medium A) oder aber Proliferationsmedium, das mit dem entsprechenden Lösungsmittel (hier Aqua dest.) verdünnt wurde (s. Tabelle 4-5).

Tabelle 4-5. Schema zur Herstellung der Ru360-Lösungen.

Stammlösung:	90,88 μ l	Ru360+dest.	+	16,40 ml Medium A	
10 μ M:		H ₂ O			A
5 μ M:	4,50 ml	Stammlösung	+	4,47 ml Medium A	+ 24,8 μ l H ₂ O
2,5 μ M:	2,25 ml	Stammlösung	+	6,71 ml Medium A	+ 37,2 μ l H ₂ O
0,5 μ M:	0,45 ml	Stammlösung	+	8,50 ml Medium A	+ 47,1 μ l H ₂ O

Dehydr. H ₂ O:	9,94 ml Medium A + 55,1 µl H ₂ O
Medium A:	9 ml Medium A

4.4.3 Vorbereitung der Zellen

Zunächst wurde die Zellzahl bestimmt und die Zellen in Proliferationsmedium (Medium A) in einer Dichte von 250.000 Zellen pro 1 ml und Well in vier 24-Well-Platten ausgesät und unter konventionellen Bedingungen im Brutschrank bis zur Konfluenz inkubiert (= Versuchstag 1). Dafür waren im Verlauf je nach Wachstumsrate unterschiedlich lange Inkubationszeiten nötig (bei C2C12-Zellen etwa 24 h, bei pM-Zellen ca. 3-5 Tage). Eine regelmäßige Kontrolle der Zelldichte erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Der Tag, an dem die Zellen ausreichend konfluent waren wird als Versuchstag 2 bezeichnet.

4.4.4 Exposition der C2C12- und pM-Zellen mit den Bupivacain-Lösungen und den mitochondrialen Blocker-Lösungen

An Versuchstag 2, wurde das Proliferationsmedium der bis dahin konfluent gewachsenen Zellen durch je 1 ml Differenzierungsmedium ersetzt, um die Ausdifferenzierung der Zellen in reife Myozyten mit regelrecht entwickelten Zellorganellen zu erreichen. Gleichzeitig wurden die Lösungen entsprechend den o.g. Schemata hergestellt und für 24 h bei + 4 °C gelagert.

Nach 24 Stunden Differenzierung (= Versuchstag 3) wurden zunächst die Lösungen im Wasserbad bei 37°C angewärmt und anschließend die Exposition der Myozyten mit Lokalanästhetikum und mitochondrialen Blockerlösungen durchgeführt: Hierzu wurde konkret je eine zellbesetzte Well-Platte für 0, 15, 30 und 60 min. (= Präinkubationszeit) mit entsprechender Blockerlösung (in aufsteigender Konzentration versetzt). Anschließend wurden die Bupivacain-Lösungen (in ebenfalls aufsteigender Konzentration) hinzugefügt und die Platten unter Kulturbedingungen für zwei Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die überstehenden Lösungen abgesaugt und durch je 1 ml Proliferationsmedium ersetzt. Aufgrund der aus bisherigen Untersuchungen beobachteten Latenzzeit für apoptotische Mechanismen erfolgte anschließend eine weitere Inkubation für 24 Stunden [179].

4.4.5 Durchflusszytometrie

4.4.5.1 Vorbereitungen

Nach Ende der Latenzzeit wurden die Lösungen aus den 24-Well-Platten in bereitstehende FACS[®]-Röhrchen überführt. Durch Zugabe von 0,3 ml Trypsin pro Well für 2 min. wurden adhärenente Zellen abgelöst. Nach mikroskopischer Kontrolle wurde die Trypsin-Reaktion mit je 0,5 ml Proliferationsmedium abgestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension zu den Überständen hinzugefügt um eine möglichst vollständige Erfassung zu gewährleisten. Nach Zentrifugation (5 min, 425 g bei Raumtemperatur) wurde das entstandene Zellpellet in 100 µl Bindepuffer (Bindepuffer aus FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I von BD Pharmingen[™] 1: 10 mit Aqua dest.) in Lösung gebracht.

4.4.5.2 Färbung apoptotischer/nekrotischer Zellen

Sowohl Nachweis als auch Unterscheidung apoptotischer und direkt-nekrotischer Zellschädigung erfolgte mit Hilfe des FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen[™]), das als Nachweisprinzip eine Markierung der entsprechenden Zellen durch die Substanzen Annexin V und Propidium-Iodid (PI) beinhaltet. Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein, das mit hoher Affinität an das membranständige Phospholipid Phosphatidylserin bindet, welches selektiv im Rahmen apoptotischer Prozesse an der äußeren Membranoberfläche exprimiert wird [182]. PI ist eine Substanz, die nach nekrotischer Zellschädigung und der damit verbundenen Permeabilitätserhöhung der Zellmembran ins Zellinnere diffundiert und dort an doppelsträngige DNA oder rRNA bindet [182].

Für die FACS[®]-Analyse wurden initial „Referenzwerte“ generiert. Hierzu wurde zur Kontrollprobe ohne Bupivacain (ohne Blocker und ohne Präinkubation) 0,4 ml Bindepuffer pipettiert. Diese Lösung wurde dann analog der entsprechenden Herstelleranleitung des FITC Annexin V Apoptosis Detection KIT I in Leerwert, Annexin-Wert (mit 5 µl Annexin V-Lösung) und PI-Wert (mit 5 µl PI-Lösung) geteilt. Die Referenzmessung erfolgte nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (25 °C) im Dunkeln und nach Zugabe von weiteren 100 µl Bindepuffer.

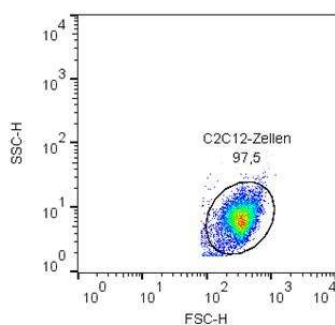
4.4.5.3 Methode Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik zur Sortierung und Messung von zuvor gefärbter Zellen, die im Rahmen der Messung einen fokussierten Laserstrahl passieren. Hierbei wird Streulicht und Fluoreszenzlicht separat detektiert [183].

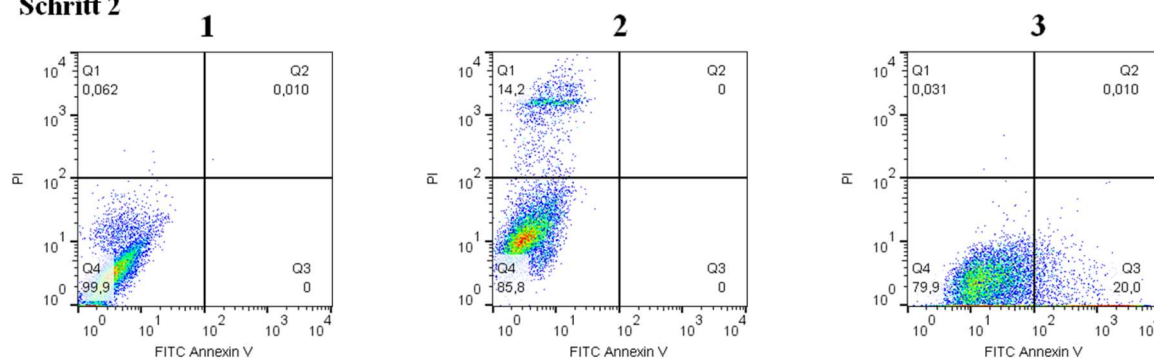
4.4.5.4 Auswertung der Durchflusszytometrie

Die Auswertung der Durchflusszytometrieergebnisse erfolgte Software-basiert mit dem Programm FlowJo[®]. Betrachtet wurde der Anteil vitaler Zellen (PI⁻/Annexin⁻-Zellen), der Anteil apoptotischer Zellen (Annexin⁺-Zellen unabhängig ihres PI-Färbeverhalten) und der Anteil primärnekrotischer Zellen (PI⁺/Annexin⁻-Zellen). Hierzu wurde das Messfeld zunächst (anhand der Referenzwerte) in vier Quadranten eingeteilt und der Anteil der Zellen pro Quadrat an der Gesamtzellzahl bestimmt (s. Abbildung 4-4).

Schritt 1



Schritt 2



Schritt 3

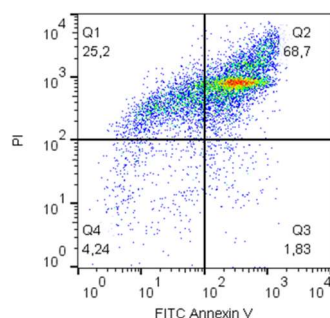


Abbildung 4-4. Auswertung der Durchflusszytometrie mittels FlowJo[®] am Beispiel von C2C12-Zellen bei Bupivacain 1750 ppm zum Inkubationszeitpunkt 0 mit CsA = 0 μ M. **Schritt 1:** Gating der gewünschten Zellpopulation; **Schritt 2:** Eichung der Rastereinteilung anhand 1. PI⁻/Annexin⁻-Zellen, 2. PI⁺/Annexin⁻-Zellen, 3. PI⁻/Annexin⁺-Zellen; **Schritt 3:** Anwendung der Rastereinteilung an der C2C12-Zellen, die mit einer Bupivacain-Konzentration von 1750 ppm zum Inkubationszeitpunkt 0 ohne CsA-Lösung zunächst für 2 h und anschließend für 24 h mit Proliferationsmedium inkubiert wurden. Q1: Anteil PI⁺/Annexin⁻-Zellen, Q2: Anteil PI⁺/Annexin⁺-Zellen, Q3: Anteil PI⁻/Annexin⁺-Zellen, Q4: Anteil PI⁻/Annexin⁻-Zellen.

4.5 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung aller Ergebnisse erfolgte Software-basiert mit „IBM SPSS Statistic Version 21“.

Die Testung auf Vorliegen einer Normalverteilung innerhalb der Stichprobe erfolgte mit Hilfe des Shapiro-Wilks-Tests, die Überprüfung der Varianzhomogenität wurde mittels Levene-Test untersucht. Im Falle normalverteilter Daten wurden entsprechende Gruppenunterschiede mit ANOVA und Dunnett-T3-Test (bei Varianzungleichheit) valuiert, andernfalls mit Hilfe des Kruskal Wallis-Tests mit anschließender Post-Hoc-Analyse über Dunnett-T3-Test.

Primär wurde der Anteil Annexin⁺-Zellen an der Gesamtzellzahl betrachtet und dargestellt. Dieser Anteil wird im Folgenden als Gesamtapoptose bezeichnet. Außerdem wurden die Anteile der PI⁺/Annexin⁻-Zellen (primär nekrotische Zellen) und der PI⁻/Annexin⁻-Zellen (vitale Zellen) ausgewertet. Unterschieden sich die Werte der betrachteten Gruppen mit $p \leq 0,05$ wurden sie als signifikant bezeichnet.

In den Abbildungen sind Mediane, oberes und unteres Quartil sowie die Extremwerte und Ausreißer aus mindestens 4 unabhängigen Experimenten dargestellt. Ausreißer werden in den Diagrammen als \circ dargestellt. Als Ausreißer sind hierbei diejenigen Werte definiert, die zwischen dem 1,5- und 3-fachem oberhalb bzw. unterhalb der 75% bzw. 25%-Perzentile liegen. Außerdem wurde die Signifikanz in den Diagrammen symbolisch dargestellt (* $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$).

Die Tabellen stellen ebenfalls Median sowie Interquartilbereich aus mind. 4 unabhängigen Experimenten dar. Außerdem zeigen sie Werte der Kruskal-Walis-Berechnung und der ANOVA-Berechnung sowie die jeweiligen p-Werte aus der Post-Hoc-Analyse (berechnet mittels Dunnett-T3-Test). Betrachtet wurden hierbei ausschließlich Unterschiede zum Referenzwert der Bupivacain-Gruppe (Bupivacain-Konzentration von 0, 1000, 1350 oder 1750 ppm ohne mitochondrialer Blocker-Lösung).

5 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss selektiver mitochondrialer Ionenkanalblockade auf das Apoptoseverhalten von murinen Myozyten unter Bupivacain-Exposition untersucht.

5.1 Nachweis der Myotoxizität von Bupivacain und Festsetzung der Bupivacain-Konzentration

5.1.1 Morphologische Zellveränderungen nach Bupivacain-Intoxikation

Morphologische Veränderungen korrelierend zur Zellschädigung unter Einfluss von Lokalanästhetika sind bereits mehrfach histopathologisch beschrieben worden [40–43]. Im Rahmen der Versuchsdurchführung wurden daher regelmäßige auch lichtmikroskopisch erfassbare Änderungen der Zellmorphologie dokumentiert.

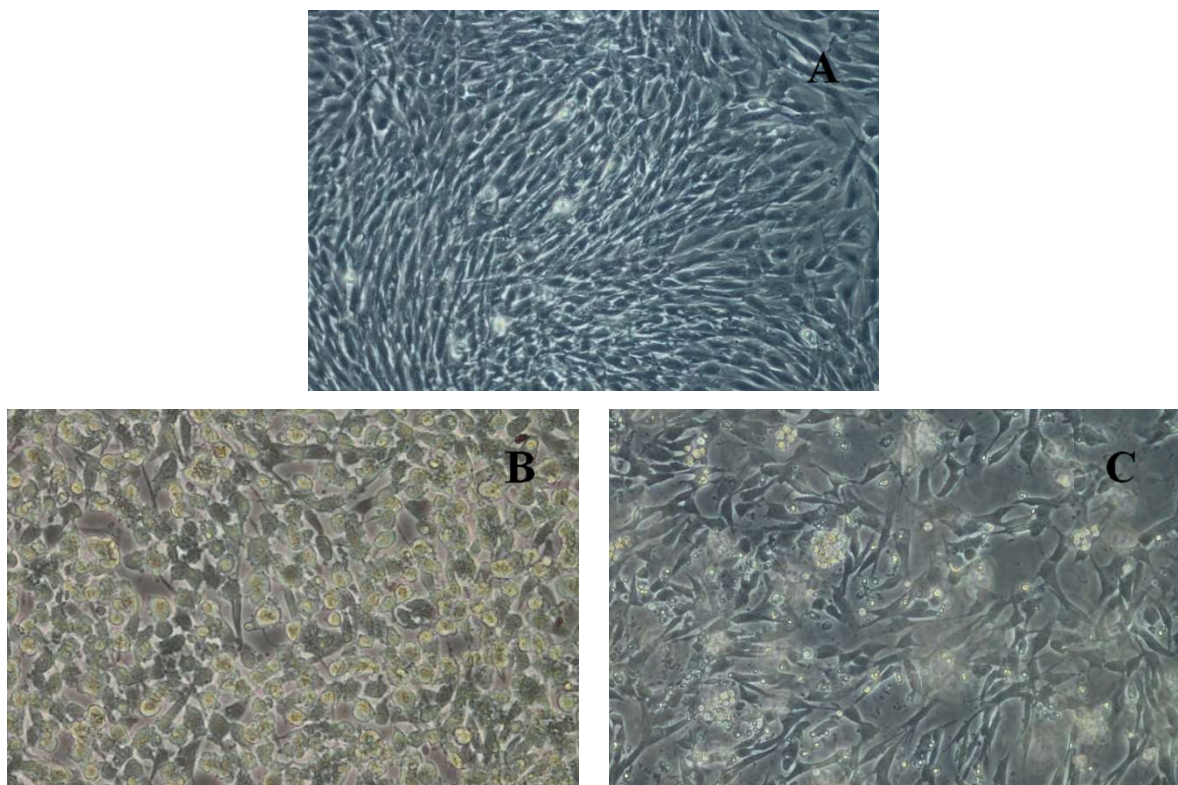


Abbildung 5-1. Mikroskopische Betrachtung der Zellkulturen am Beispiel von C2C12-Zellen unter 1350 ppm Bupivacain (200-fache Vergrößerung). A: konfluenten Zellteppich vor Bupivacain-Exposition, B: C2C12-Zellen nach 2-stündiger Exposition mit Bupivacain 1350 ppm, C: C2C12-Zellen nach 2 h Exposition mit Bupivacain und anschließender 24-stündiger Inkubationszeit mit Proliferationsmedium

Abbildung 5-1 zeigt am Beispiel von C2C12-Zellen die Veränderungen der Zellmorphologie während des Intoxikationszyklus. Vor Zugabe der Bupivacain-Lösung zeigte sich ein konfluenter und adhärenter Zellteppich (s. Abbildung 5-1A). Nach 2-stündiger Exposition mit Bupivacain veränderten die Zellen ihre Form, quollen auf und lösten sich aus dem Zellverband (s. Abbildung 5-1B). Nach Entfernung der Lokalanästhetiklösung und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium konnte zum Teil ein Rückgang in die längliche Muskelzell-typische Form beobachtet werden (s. Abbildung 5-1C).

5.1.2 Nachweis der Mytoxizität mithilfe der Durchflusszytometrie

5.1.2.1 Mytoxizität von Bupivacain bei C2C12-Zellen in der Durchflusszytometrie

Abbildung 5-2 zeigt, dass niedrige Bupivacain-Konzentrationen bis 1000 ppm bei den C2C12-Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner signifikanten Zunahme des Anteils Annexin⁺-Zellen führte. Bei höheren Bupivacain-Konzentrationen (1350 ppm, 1750 ppm und 2500 ppm) konnte eine signifikante und konzentrationsabhängige Zunahme der Annexin⁺-Zellen und damit eine signifikante Zunahme der Apoptose beobachtet werden.

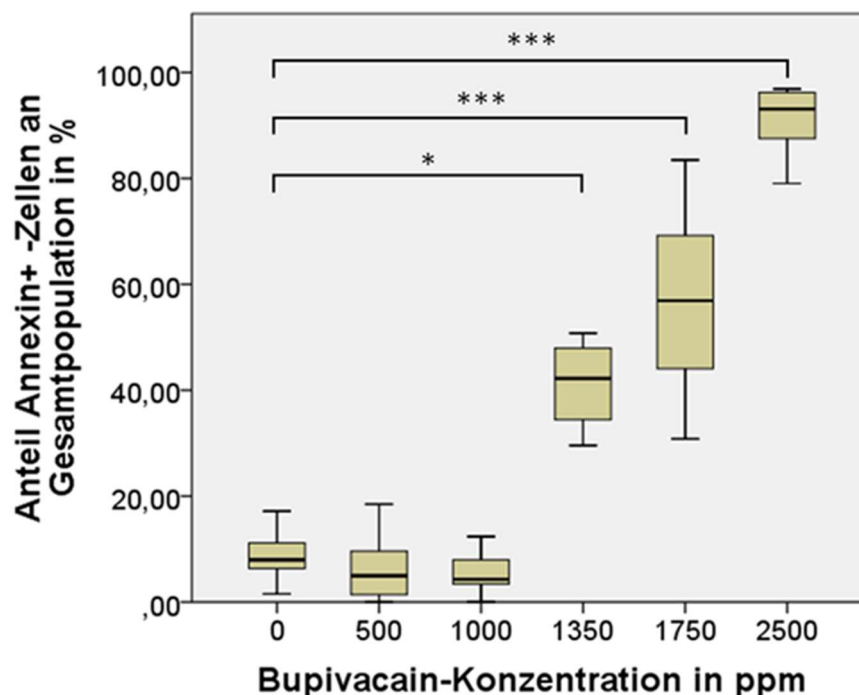


Abbildung 5-2. Anteil Annexin⁺-Zellen an Gesamtpopulation bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und anschließender 24-stündiger Inkubationszeit in Proliferationsmedium.

Tabelle 5-1 zeigt die Abhängigkeit primär nekrotische Schädigung von der verwendeten Bupivacain-Konzentration. Der Anteil der PI⁺/Annexin⁻-Zellen (primär nekrotische Zellen) bei Konzentrationen bis 1000 ppm Bupivacain unterschied sich nicht von der Kontrollgruppe, stieg jedoch bei 1350 ppm Bupivacain sprunghaft und signifikant an, um dann wiederum zugunsten der Annexin⁺-Zellen abzunehmen.

Der Anteil der PI⁻/Annexin⁻-Zellen (vitale Zellen) nahm bei Bupivacain-Konzentrationen ab 1350 ppm signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe ab.

Tabelle 5-1. Anteile PI⁺/Annexin⁻ - und PI⁻/Annexin⁻-Zellen an Gesamtpopulation bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und anschließender 24-stündiger Inkubationszeit in Proliferationsmedium.

		Anteil PI ⁻ /Annexin ⁻ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Anteil PI ⁺ /Annexin ⁻ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]
Bupivacain [ppm]	0	87,70 (8,85)	2,71 (3,99)
	500	91,60 (19,3)	3,47 (4,24)
	1000	91,90 (5,25)	3,91 (2,45)
	1350	4,33 (2,39)	54,50 (18,15)
	1750	10,80 (12,43)	30,55 (23,10)
	2500	2,71 (2,43)	2,56 (11,10)
p-Wert Kruskal Wallis-Test		<0,001	<0,001
post-hoc Dunnett T3 - Test	500	0,715	1,000
	1000	0,626	0,999
	1350	<0,001	0,004
	1750	<0,001	<0,001
	2500	<0,001	1,000

Die Vorversuche mit den C2C12-Zellen zeigten, dass das zugrundeliegende Versuchsmodell funktioniert. Bupivacain induzierte in unserem Modell eine konzentrationsabhängige Zunahme der Apoptose, während nekrotische Effekte sowie der Anteil vitaler Zellen zugleich abnahmen.

Da durch gezielte Inhibitionseffekte insbesondere die Veränderung des Apoptoseverhaltens untersucht werden sollte, wurde die Konzentrationsbreite von Bupivacain anhand der obigen Ergebnisse der C2C12-Zellen auf 0 ppm, 1000 ppm, 1350 ppm und 1750 ppm festgesetzt.

5.1.2.2 Mytoxizität von Bupivacain bei pM-Zellen in der Durchflusszytometrie

Aus Abbildung 5-3 ist ersichtlich, dass bei pM-Zellen bereits eine Bupivacain-Konzentration von 1000 ppm zu einer signifikanten Zunahme der Gesamtaoptose (Anteil der Annexin⁺-Zellen) führte. In höheren Konzentrationsbereichen zeigte sich kein weiterer Anstieg der Apoptoserate.

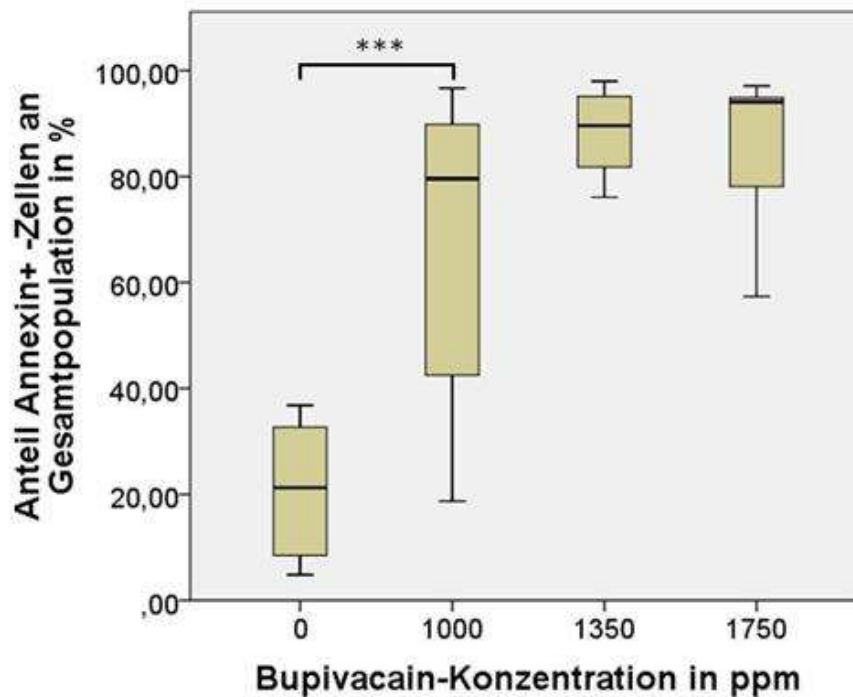


Abbildung 5-3. Anteil Annexin⁺-Zellen an Gesamtpopulation bei pM-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und anschließender 24-stündiger Inkubationszeit in Proliferationsmedium.

In Tabelle 5-2 zeigt sich der Anteil der primär nekrotischen Zellen (PI⁺/Annexin⁻-Zellen) ohne signifikante Veränderungen innerhalb der unterschiedlichen Bupivacain-Konzentrationsbereiche.

Der Anteil PI⁻/Annexin⁻-Zellen reduzierte sich ab einer Konzentration von 1000 ppm signifikant zur Kontrollgruppe (s. Tabelle 5-2). Hier stabilisierte er sich auf einem niedrig konstanten Niveau ohne weitere signifikanten Veränderungen bei steigenden Bupivacain-Konzentrationen.

Tabelle 5-2. Anteil PI⁺/Annexin⁻- und PI⁻/Annexin⁻- Zellen an Gesamtpopulation bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und anschließender 24-stündiger Inkubationszeit in Proliferationsmedium.

		PI ⁻ /Annexin ⁻ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	PI ⁺ /Annexin ⁻ - Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]
Bupivacain [ppm]	0	76,00 (27,75)	3,23 (4,36)
	1000	6,00 (8,35)	6,05 (39,71)
	1350	4,51 (4,75)	5,64 (9,46)
	1750	4,61 (4,99)	1,43 (17,26)
p-Wert Kruskal Wallis-Test		<0,001	0,593
post-hoc Dunnett-T3 - Test	1000	<0,001	0,374
	1350	<0,001	1,000
	1750	<0,001	0,934

Im Vergleich zu den C2C12-Zellen reagierten die pM-Zellen sensibler auf Intoxikation mit Bupivacain. Bereits bei einer Konzentration von 1000 ppm konnte bei den pM-Zellen einen Anstieg des Anteils apoptotischen Zellen erreicht werden. Die Wirkung von Bupivacain war außerdem nicht konzentrationsabhängig, sondern bereits ab 1000 ppm voll ausgeprägt. Bei den C2C12-Zellen zeigte sich eine spätere und konzentrationsabhängige Steigerung der Gesamtapoptose.

5.1.3 Der Einfluss der Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO)

Aus Abbildung 5-4 wird ersichtlich, dass eine 60-minütige Inkubation mit DMSO-Lösung keinen Einfluss auf den Anteil Annexin⁺-Zellen in beiden Zellpopulationen hatte. Auch bei anderen Inkubationszeiten konnten keine signifikanten Effekte auf die Zellpopulationen gezeigt werden (Daten nicht dargestellt). Ebenso blieben die Anteile vitaler und primär nekrotischer Anteile unabhängig der angewandten Inkubationsdauer konstant, sodass mit keiner Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch DMSO zu rechnen war (Daten nicht gezeigt).

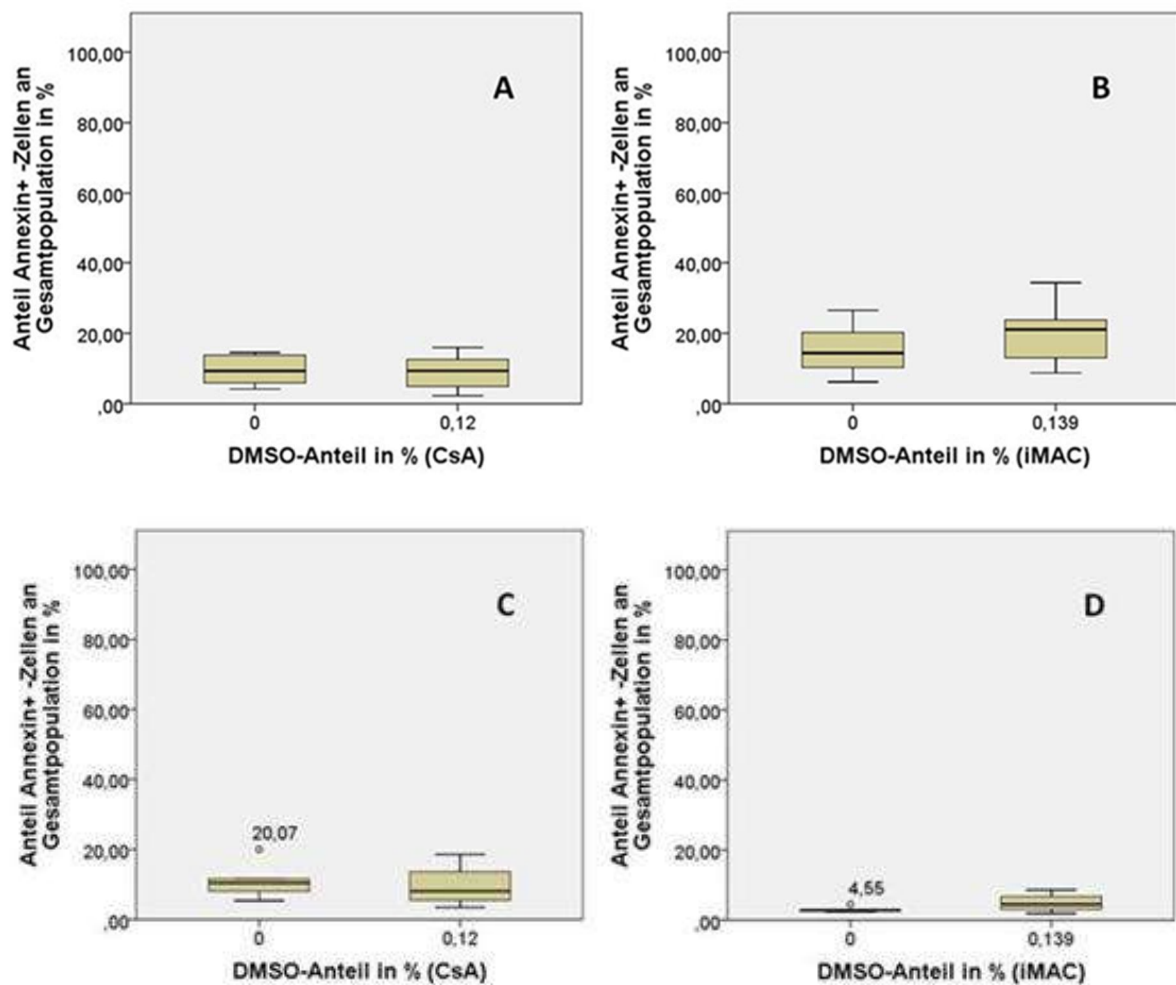


Abbildung 5-4. Einfluss von DMSO den Anteil Annexin⁺-Zellen bei C2C12- und pM-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit DMSO und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium. A, B: bei C2C12-Zellen, C, D: bei pM-Zellen

5.2 Einfluss selektiver mitochondriale Ionenkanal-Blockade

5.2.1 Einfluss von CsA auf die Bupivacain-induzierte Apoptose

Zunächst zeigte sich bei den reinen Bupivacain-Intoxikationen (CsA = 0 μ M) die erwartete konzentrationsabhängige Zunahme des Anteils Annexin⁺-Zellen und damit eine Zunahme der Gesamtapoptoserate sowohl bei den C2C12-Zellen als auch bei den pM-Zellen. Ferner hatte CsA (ohne vorhandene Bupivacain-Lösung) unabhängig von Konzentration und Präinkubationszeit keinen eigenen Einfluss auf den Anteil Annexin⁺-Zellen.

Bei einer mittleren Bupivacain-Konzentration von 1000 ppm führte die Zugabe von CsA ohne Präinkubation bei C2C12-Zellen zu einer leichten Steigerung des Anteils Annexin⁺-

Zellen, mit Signifikanz ab einer CsA-Konzentration von 5 μM im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 5-5B). In den Gruppen mit längeren Präinkubationszeiten war dieser Effekt in beiden Zellpopulationen nicht mehr erkennbar (s. Tabelle 5-4, Tabelle 5-5).

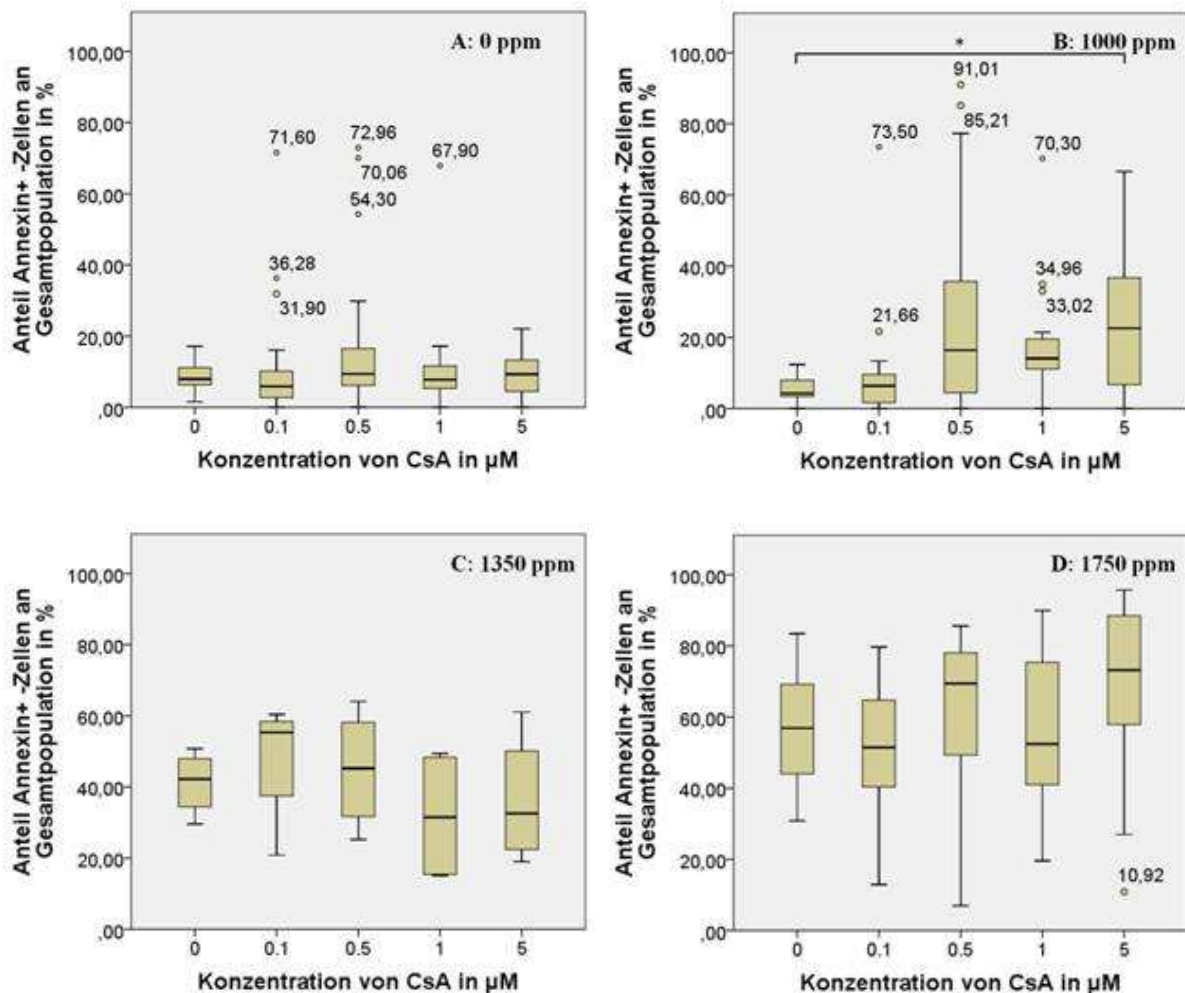


Abbildung 5-5. Anteil Annexin⁺-Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und CsA (ohne Präinkubationszeit) und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.

Korrelierend hierzu war bei C2C12-Zellen - bei global unverändertem Anteil primär nekrotischer Zellen - die insgesamt Abnahme vitaler Zellen zu beobachten (s. Tabelle 5-3). Bei höheren Bupivacain-Konzentrationen und pM-Zellen ließ sich dieser Effekt allerdings nicht mehr beobachten.

Tabelle 5-3. Anteil PI⁻/Annexin⁻-Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und CsA (ohne Präinkubation) und 24-stündiger Inkubation mit Proliferationsmedium.

PI ⁻ /Annexin ⁻ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]		Bupivacain [ppm]			
		0	1000	1350	1750
CsA [μ M]	0	87,70 (8,85)	91,90 (5,25)	4,33 (2,39)	10,80 (12,43)
	0,1	88,80 (8,97)	91,20 (6,35)	5,85 (3,56)	11,60 (21,05)
	0,5	83,10 (15,80)	75,40 (38,20)	5,57 (3,55)	4,00 (18,32)
	1	82,80 (8,60)	77,40 (16,83)	6,80 (4,79)	5,81 (10,28)
	5	83,40 (11,80)	64,10 (37,35)	4,33 (2,42)	4,44 (5,72)
p-Wert Kruskal Wallis-Test		0,040	0,002	0,353	0,051
post-hoc Dunnett T3 -Test	0,1	1,000	0,893	0,931	0,918
	0,5	0,359	0,023	0,857	1,000
	1	0,827	0,014	0,762	1,000
	5	0,749	0,002	1,000	0,995

Bei Bupivacain-Konzentrationen von 1350 ppm und 1750 ppm ergaben sich Zellmodellunabhängig keine signifikanten Veränderungen der Bupivacain-induzierten Mytoxizität unter dem Einfluss von CsA. Die Anteile apoptotischer, primär nekrotischer und vitaler Zellen waren konstant (s. Tabelle 5-4, Tabelle 5-5).

Auffällig war lediglich eine nicht signifikante Reduktion der Gesamtapoptose bei ausschließlich C2C12-Zellen, die mit 1750 ppm Bupivacain und 5 μ M CsA bei einer CsA-Präinkubation von 60 min inkubiert worden waren.

Tabelle 5-4. Annexin⁺-Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und CsA und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.

Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 0 min					Präinkubationszeit 15 min						
	Bupivacain [ppm]					Bupivacain [ppm]						
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
0	7,98 (5,23)	4,30 (5,42)	42,23 (17,36)	56,89 (25,86)	15,48 (22,62)	47,41 (17,76)	45,69 (25,56)	47,23 (59,99)	15,48 (22,62)	47,41 (17,76)	45,69 (25,56)	47,23 (59,99)
0,1	5,88 (7,86)	6,40 (8,38)	55,32 (30,23)	51,48 (32,54)	1,94 (3,89)	48,97 (22,02)	46,19 (15,50)	48,14 (29,96)	1,94 (3,89)	48,97 (22,02)	46,19 (15,50)	48,14 (29,96)
0,5	9,38 (13,11)	16,39 (37,01)	45,23 (32,67)	69,45 (32,55)	2,71 (21,17)	54,37 (25,20)	41,44 (19,96)	42,28 (11,71)	2,71 (21,17)	54,37 (25,20)	41,44 (19,96)	42,28 (11,71)
1	7,79 (6,88)	14,09 (10,83)	31,49 (33,61)	52,43 (35,31)	6,16 (8,38)	50,79 (19,37)	49,68 (14,53)	43,95 (20,15)	6,16 (8,38)	50,79 (19,37)	49,68 (14,53)	43,95 (20,15)
5	9,33 (9,21)	22,55 (30,59)	32,55 (34,90)	73,21 (31,27)	13,16 (23,20)	56,10 (31,25)	48,48 (11,17)	49,16 (70,46)	13,16 (23,20)	56,10 (31,25)	48,48 (11,17)	49,16 (70,46)
p-Wert Kruskal Wallis - Test	0,849	0,034	0,296	0,031	0,416	0,851	0,271	0,995	0,416	0,851	0,271	0,995
post-hoc Dunnnett T3 - Test	1,000	0,958	0,995	0,970	0,493	1,000	1,000	1,000	0,493	1,000	1,000	1,000
	0,397	0,112	1,000	0,986	0,989	0,990	1,000	0,987	0,989	0,990	1,000	0,987
	1,000	0,071	0,972	1,000	0,836	1,000	1,000	1,000	0,836	1,000	1,000	1,000
	1,000	0,018	1,000	0,385	1,000	0,997	0,929	1,000	1,000	0,997	0,929	1,000
Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 30 min					Präinkubationszeit 60 min						
	Bupivacain [ppm]					Bupivacain [ppm]						
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
0	12,99 (12,69)	49,79 (16,87)	51,31 (22,27)	74,87 (37,73)	9,30 (8,47)	50,36 (10,25)	40,18 (32,78)	52,71 (54,95)	9,30 (8,47)	50,36 (10,25)	40,18 (32,78)	52,71 (54,95)
0,1	10,04 (13,50)	48,66 (13,02)	36,77 (24,11)	49,91 (33,00)	13,06 (12,89)	49,66 (14,98)	57,43 (7,96)	60,46 (43,92)	13,06 (12,89)	49,66 (14,98)	57,43 (7,96)	60,46 (43,92)
0,5	10,04 (4,08)	48,84 (30,00)	49,61 (11,65)	63,65 (37,73)	10,81 (9,69)	54,38 (32,38)	49,08 (10,18)	44,81 (37,40)	10,81 (9,69)	54,38 (32,38)	49,08 (10,18)	44,81 (37,40)
1	12,44 (19,85)	51,25 (32,57)	42,93 (12,99)	67,96 (40,58)	7,13 (23,05)	59,68 (31,39)	51,63 (15,12)	56,60 (32,18)	7,13 (23,05)	59,68 (31,39)	51,63 (15,12)	56,60 (32,18)
5	13,69 (29,03)	45,70 (22,59)	45,60 (33,03)	72,32 (19,67)	8,22 (15,39)	58,83 (25,96)	54,36 (19,75)	34,27 (21,06)	8,22 (15,39)	58,83 (25,96)	54,36 (19,75)	34,27 (21,06)
p-Wert Kruskal Wallis - Test	0,692	0,913	0,927	0,619	0,771	0,341	0,919	0,112	0,771	0,341	0,919	0,112
post-hoc Dunnnett T3 - Test	1,000	1,000	0,520	0,950	0,955	0,995	0,679	1,000	0,955	0,995	0,679	1,000
	0,997	0,998	0,998	0,952	0,999	1,000	0,906	0,997	0,999	1,000	0,906	0,997
	1,000	1,000	0,950	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
	0,981	1,000	0,996	1,000	1,000	1,000	0,948	0,850	1,000	1,000	0,948	0,850

Tabelle 5-5. Annexin⁺-Zellen bei pM-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und CsA und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.

Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 0 min				Präinkubationszeit 15 min			
	Bupivacain [ppm]				Bupivacain [ppm]			
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
	26,40 (21,80)	67,65 (54,22)	85,70 (10,53)	78,35 (16,63)	8,73 (7,56)	91,65 (0,40)	82,30 (18,80)	86,55 (13,13)
	8,70 (14,37)	33,35 (56,93)	62,80 (51,00)	70,75 (20,40)	7,08 (9,14)	89,25 (4,95)	78,40 (25,00)	73,65 (22,95)
	9,52 (8,81)	84,80 (5,63)	73,45 (70,94)	71,85 (24,10)	8,33 (3,58)	89,15 (3,68)	77,30 (31,61)	64,26 (47,32)
	8,97 (13,69)	91,70 (0,60)	70,00 (68,34)	67,00 (67,03)	6,57 (15,67)	92,10 (4,28)	80,10 (26,18)	72,75 (26,65)
	10,05 (14,53)	91,55 (3,68)	74,50 (65,88)	75,20 (70,22)	8,30 (10,34)	93,15 (2,45)	77,20 (25,13)	80,80 (15,88)
p-Wert	0,379	0,005	0,958	0,581	0,773	0,068	0,972	0,821
Kruskal Wallis - Test								
post-hoc	0,391	0,993	0,610	0,994	1,000	0,535	1,000	0,834
Dunnnett T3 - Test	0,264	0,676	0,853	0,995	0,997	0,473	0,998	0,728
	0,260	0,486	0,798	0,889	1,000	1,000	0,999	0,823
	0,424	0,501	0,854	0,967	1,000	0,786	1,000	0,996
Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 30 min				Präinkubationszeit 60 min			
	Bupivacain [ppm]				Bupivacain [ppm]			
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
	8,79 (8,20)	91,60 (1,43)	77,38 (15,83)	84,68 (50,00)	10,47 (9,09)	90,80 (2,28)	29,43 (69,68)	61,60 (67,96)
	9,14 (9,48)	87,45 (4,58)	70,94 (47,28)	73,05 (22,74)	6,79 (10,00)	91,90 (0,38)	53,49 (51,85)	47,99 (52,14)
	11,45 (11,98)	86,90 (8,50)	66,60 (50,26)	80,65 (32,43)	6,85 (12,51)	92,60 (1,95)	41,42 (58,29)	43,30 (50,14)
	10,65 (6,13)	87,10 (67,40)	64,09 (52,34)	79,41 (15,89)	8,65 (27,18)	92,10 (2,40)	33,09 (48,52)	48,49 (56,67)
	9,72 (6,32)	92,60 (68,76)	75,60 (28,16)	75,15 (31,17)	8,29 (14,96)	93,50 (1,43)	51,17 (45,84)	60,15 (39,31)
p-Wert	0,938	0,393	0,511	0,913	0,899	0,070	0,475	0,561
Kruskal Wallis - Test								
post-hoc	1,000	0,209	0,956	1,000	0,990	0,669	0,979	1,000
Dunnnett T3 - Test	1,000	0,413	0,847	1,000	1,000	0,724	1,000	1,000
	1,000	0,895	0,840	1,000	0,999	0,927	1,000	1,000
	1,000	0,951	0,998	1,000	1,000	0,140	0,913	1,000

5.2.2 Einfluss von iMAC auf die Bupivacain-induzierte Apoptose

Bei alleiniger Inkubation mit Bupivacain in der Kontrollgruppe (iMAC = 0 μ M) zeigte sich die erwartete konzentrationsabhängige Zunahme des Anteils Annexin⁺-Zellen und damit eine Zunahme der Gesamtapoptose sowohl bei C2C12-Zellen als auch pM-Zellen. Ebenso ist festzustellen, dass die alleinige Zugabe von iMAC keinen signifikanten Einfluss auf den Anteil Annexin⁺-Zellen in allen Versuchsabschnitten hatte. Innerhalb der Bupivacain-Gruppen (1000 ppm, 1350 ppm, 1750 ppm) ließen sich weder bei C2C12-Zellen noch bei pM-Zellen signifikante Veränderungen der Anteile Annexin⁺-Zellen nach Zugabe von iMAC unterschiedlicher Konzentrationen beobachten (s. Tabelle 5-6, Tabelle 5-7).

Die Anteile der PI⁺/Annexin⁻-Zellen (primär nekrotische Zellen) und der PI⁻/Annexin⁻-Zellen (vitale Zellen) blieben unverändert, sodass insgesamt kein signifikanter Einfluss von iMAC auf die Bupivacain-induzierte Mytoxizität ersichtlich war.

Tabelle 5-6. Annexin⁺-Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und iMAC und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.

Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 0 min				Präinkubationszeit 15 min			
	Bupivacain [ppm]				Bupivacain [ppm]			
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
	28,99 (9,83)	68,64 (24,47)	58,52 (40,16)	88,30 (35,16)	17,79 (5,23)	32,62 (27,46)	61,99 (24,82)	66,04 (52,87)
iMAC [µM]	33,97 (38,59)	62,915 (27,04)	53,77 (41,06)	71,00 (67,63)	23,16 (63,34)	20,26 (25,87)	62,35 (43,39)	78,22 (56,21)
	36,62 (32,96)	64,50 (28,18)	54,58 (44,20)	35,00 (73,81)	30,62 (62,83)	37,25 (20,38)	64,11 (34,30)	60,11 (43,43)
	38,14 (16,51)	66,27 (9,32)	68,95 (40,90)	68,30 (66,34)	16,69 (61,79)	26,75 (22,05)	60,50 (19,78)	79,66 (45,40)
	43,27 (21,28)	51,35 (23,22)	61,66(58,70)	65,03 (71,80)	25,47 (1,97)	62,46 (42,69)	69,73 (38,97)	91,85 (36,74)
p-Wert	0,541	0,558	0,952	0,518	0,551	0,050	0,864	0,436
Kruskal Wallis - Test	0,998	0,998	1,000	0,982	0,936	0,994	1,000	1,000
post-hoc	0,871	1,000	1,000	0,706	0,825	0,960	1,000	1,000
Dunnnett T3 - Test	0,792	1,000	1,000	0,965	0,982	0,999	1,000	1,000
	0,392	0,811	1,000	0,967	0,405	0,342	1,000	0,965
Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 30 min				Präinkubationszeit 60 min			
	Bupivacain [ppm]				Bupivacain [ppm]			
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
	8,22 (10,98)	26,12 (19,66)	51,78 (44,37)	53,91 (48,12)	14,38 (13,93)	40,40 (39,14)	45,37 (58,11)	75,35 (47,43)
iMAC [µM]	11,71 (16,33)	18,76 (18,18)	31,93 (24,13)	48,83 (34,03)	14,13 (4,92)	24,68 (15,62)	68,59 (48,58)	75,22 (44,07)
	12,48 (4,45)	11,81 (10,22)	35,97 (41,86)	43,59 (35,47)	12,35 (9,92)	25,90 (19,64)	57,06 (36,50)	71,53 (72,51)
	10,92 (8,48)	17,71 (14,35)	34,58 (37,44)	60,13 (30,16)	18,79 (13,24)	21,31 (22,01)	63,29 (38,68)	81,22 (45,50)
	12,02 (9,64)	21,25 (33,19)	57,11 (17,15)	69,21 (61,80)	15,87 (8,27)	25,68 (24,23)	69,23 (55,96)	88,04 (38,68)
p-Wert	0,813	0,364	0,356	0,566	0,726	0,755	0,839	0,658
Kruskal Wallis - Test	1,000	0,994	0,869	1,000	1,000	0,558	1,000	1,000
post-hoc	1,000	0,483	0,998	0,995	0,980	0,585	1,000	1,000
Dunnnett T3 - Test	1,000	0,991	0,999	1,000	1,000	0,823	1,000	1,000
	0,986	1,000	0,982	1,000	1,000	0,805	0,999	0,999

Tabelle 5-7. Annexin⁺-Zellen bei pM-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und iMAC und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.

Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 0 min					Präinkubationszeit 15 min				
	Bupivacain [ppm]					Bupivacain [ppm]				
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750		
	6,95 (10,88)	42,48 (39,69)	54,14 (65,41)	26,27 (38,93)	2,34 (3,27)	11,59 (72,01)	58,84 (68,17)	62,29 (66,71)		
iMAC [µM]	2,75 (7,32)	36,31 (48,15)	20,69 (20,41)	35,44 (39,37)	2,71 (5,06)	39,32 (59,39)	27,18 (53,81)	37,49 (18,43)		
	3,70 (5,10)	41,14 (57,36)	20,96 (29,71)	53,80 (46,42)	3,66 (3,12)	55,17 (76,39)	22,05 (58,64)	46,14 (61,44)		
	4,33 (5,69)	39,32 (70,49)	45,67 (56,87)	42,52 (34,37)	3,62 (3,66)	40,76 (44,74)	56,03 (73,74)	33,67 (27,01)		
	5,08 (5,02)	85,30 (33,06)	30,16 (74,00)	55,99 (63,44)	3,38 (4,57)	64,98 (59,74)	67,26 (60,68)	50,51 (27,05)		
p-Wert	0,785	0,189	0,815	0,281	0,924	0,669	0,283	0,799		
Kruskal Wallis - Test	0,785	0,998	0,655	1,000	1,000	0,998	0,954	0,812		
post-hoc	0,782	1,000	0,729	0,967	1,000	0,987	0,975	1,000		
Dunnnett T3 - Test	0,728	1,000	1,000	1,000	0,999	0,990	1,000	0,939		
	0,925	0,583	1,000	0,894	0,998	0,870	1,000	0,998		
Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 30 min					Präinkubationszeit 60 min				
	Bupivacain [ppm]					Bupivacain [ppm]				
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750		
	4,06 (1,76)	73,20 (75,76)	44,60 (84,69)	42,37 (74,56)	2,80 (1,24)	16,63 (45,99)	49,00 (74,71)	43,07 (50,13)		
iMAC [µM]	3,22 (2,46)	19,23 (37,80)	32,50 (25,13)	28,99 (76,33)	4,38 (3,65)	43,39 (50,76)	16,91 (45,50)	49,03 (37,52)		
	2,88 (4,92)	17,79 (22,43)	61,05 (77,51)	38,61 (37,41)	1,92 (2,09)	37,11 (70,65)	26,87 (40,11)	44,00 (41,48)		
	2,32 (1,91)	17,11 (62,76)	38,56 (61,61)	75,20 (62,00)	2,58 (2,21)	41,52 (59,63)	28,26 (31,20)	36,24 (48,57)		
	4,30 (3,06)	31,57 (68,43)	29,87 (63,41)	72,97 (64,62)	2,58 (2,58)	71,50 (62,55)	51,55 (9,81)	43,73 (55,06)		
p-Wert	0,080	0,793	0,786	0,700	0,322	0,575	0,412	0,928		
Kruskal Wallis - Test	1,000	0,931	0,978	1,000	0,959	0,984	0,938	1,000		
post-hoc	1,000	0,690	1,000	1,000	0,626	0,995	0,965	1,000		
Dunnnett T3 - Test	0,255	0,991	1,000	0,999	0,994	0,983	0,915	1,000		
	0,892	1,000	1,000	1,000	1,000	0,641	1,000	1,000		

5.3 Einfluss von Ru360 auf die Bupivacain-induzierte Apoptose

Die Exposition mit Bupivacain führte sowohl bei C2C12-Zellen als auch bei pM-Zellen zu einer erhöhten Lokalanästhetika-induzierten Myotoxizität und gesteigerten Apoptoserate, wenngleich in dieser Versuchsreihe sehr variierende Apoptoseraten festzustellen waren. Die alleinige Inkubation mit Ru360 beeinflusst das Zellüberleben von Myozyten nicht.

Unabhängig von Bupivacain-Konzentrationen und Zellart zeigte sich keine signifikante Reduktion der Apoptoserate (Anteil Annexin⁺-Zellen) bei zusätzlicher Inkubation mit Ru360. Dieses Ergebnis war bei allen Ru360-Präinkubationszeiten und Ru360-Konzentrationen identisch (s. Tabelle 5-8, Tabelle 5-9).

Es zeigte sich lediglich bei einer Konzentration von 1350 ppm eine signifikante Reduktion primär nekrotischer Effekte (PI⁺/Annexin⁻-Zellen) bei Inkubationszeiten von 15 min, 30 min und 60 min in unterschiedlichen Ru360-Konzentrationsbereichen (s. Tabelle 5-10). Der Anteil vitaler Zellen (PI⁺/Annexin⁻-Zellen) zeigte keine signifikanten Änderungen.

Tabelle 5-8. Annexin⁺-Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und Ru360 und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.

Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 0 min				Präinkubationszeit 15 min			
	Bupivacain [ppm]				Bupivacain [ppm]			
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
Ru360 [µM]	59,20 (37,68)	53,26 (16,25)	51,04 (17,80)	91,09 (34,87)	55,03 (28,92)	24,32 (17,15)	49,79 (23,62)	64,50 (51,52)
	41,41 (17,46)	53,85 (28,44)	42,07 (13,42)	67,22 (64,25)	40,00 (20,41)	32,37 (26,67)	28,78 (38,80)	56,41 (30,31)
	50,97 (25,84)	37,36 (26,43)	51,08 (15,16)	76,38 (34,70)	44,20 (23,16)	35,89 (27,42)	30,24 (38,50)	46,80 (28,60)
	43,92 (14,84)	25,22 (42,43)	51,00 (30,42)	82,84 (22,38)	51,20 (28,00)	20,79 (41,06)	25,98 (27,88)	37,20 (33,27)
	35,92 (21,19)	48,74 (18,78)	55,65 (14,18)	92,97 (5,86)	49,51 (28,15)	39,33 (18,03)	47,24 (24,35)	59,14 (17,79)
p-Wert	0,398	0,241	0,757	0,358	0,969	0,666	0,585	0,459
Kruskal Wallis - Test	0,974	1,000	0,923	0,955	0,999	0,449	0,887	1,000
post-hoc	0,998	0,775	1,000	1,000	1,000	0,763	0,923	1,000
Dunnett T3 - Test	0,981	0,622	1,000	1,000	1,000	0,999	0,753	0,997
	0,770	0,997	1,000	0,723	1,000	0,419	1,000	1,000
Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 30 min				Präinkubationszeit 60 min			
	Bupivacain [ppm]				Bupivacain [ppm]			
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
Ru360 [µM]	35,37 (29,19)	13,50 (8,91)	28,46 (18,74)	41,65 (48,11)	32,13 (37,85)	21,24 (26,56)	37,96 (33,69)	48,59 (53,37)
	43,90 (27,72)	26,09 (23,25)	18,64 (26,06)	47,13 (13,07)	45,48 (18,55)	45,37 (22,08)	17,87 (18,49)	43,28 (24,05)
	39,93 (30,06)	24,74 (22,74)	16,33 (18,33)	41,41 (25,03)	34,83 (27,95)	15,70 (15,19)	20,37 (35,27)	50,25 (14,56)
	25,98 (19,47)	23,28 (16,99)	24,54 (15,54)	43,62 (30,91)	27,19 (27,47)	44,96 (29,79)	23,53 (38,48)	47,95 (47,45)
	34,01 (34,35)	32,90 (18,63)	32,40 (13,80)	58,01 (26,71)	25,21 (26,98)	25,63 (46,78)	48,97 (21,07)	57,47 (22,95)
p-Wert	0,774	0,389	0,244	0,619	0,739	0,315	0,389	0,465
Kruskal Wallis - Test	0,971	0,484	0,840	1,000	0,999	0,213	0,538	1,000
post-hoc	0,917	0,756	0,652	0,999	1,000	1,000	0,992	0,995
Dunnett T3 - Test	1,000	0,471	0,989	1,000	0,998	0,439	0,927	0,999
	1,000	0,147	0,999	1,000	0,999	0,968	1,000	0,836

Tabelle 5-9. Annexin⁺-Zellen bei pM-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und Ru360 und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.

Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 0 min				Präinkubationszeit 15 min			
	Bupivacain [ppm]				Bupivacain [ppm]			
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
Ru360 [µM]	36,11 (25,48)	93,05 (7,40)	96,00 (4,80)	95,60 (2,80)	24,30 (15,49)	63,30 (29,40)	92,90 (16,55)	85,65 (34,63)
	26,85 (14,80)	88,75 (15,28)	95,45 (3,68)	94,05 (3,75)	25,30 (11,38)	58,30 (43,35)	84,70 (19,90)	94,90 (31,86)
	32,30 (22,02)	93,05 (9,63)	96,00 (2,55)	94,05 (3,38)	21,73 (7,15)	53,90 (35,67)	77,90 (43,08)	89,00 (22,70)
	25,80 (4,18)	89,35 (16,15)	95,80 (1,02)	93,05 (5,28)	24,50 (5,30)	45,80 (37,47)	67,10 (28,10)	82,50 (38,05)
	26,45 (13,20)	93,45 (7,75)	96,05 (1,88)	94,60 (6,33)	43,60 (13,43)	63,96 (30,37)	82,00 (21,35)	89,18 (16,09)
p-Wert	0,512	0,923	0,988	0,398	0,037	0,427	0,345	0,885
Kruskal Wallis - Test								
post-hoc	0,580	0,963	1,000	0,978	1,000	0,663	0,931	1,000
Dunnnett T3 - Test	0,951	0,999	1,000	0,746	0,984	0,960	0,773	1,000
	0,490	0,963	1,000	0,468	1,000	0,608	0,564	1,000
	0,770	1,000	1,000	0,989	0,316	1,000	0,996	1,000
Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 30 min				Präinkubationszeit 60 min			
	Bupivacain [ppm]				Bupivacain [ppm]			
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
Ru360 [µM]	22,81 (8,30)	22,87 (57,71)	85,50 (7,13)	87,35 (26,88)	22,08 (7,09)	57,05 (50,33)	82,25 (19,68)	82,25 (12,83)
	17,92 (13,54)	47,35 (37,42)	75,65 (27,28)	77,10 (57,99)	19,55 (20,79)	47,09 (40,23)	65,65 (15,65)	76,15 (22,98)
	29,70 (13,99)	44,60 (29,10)	54,15 (40,55)	74,30 (67,58)	20,72 (3,06)	40,75 (34,30)	71,25 (13,55)	73,80 (24,88)
	22,41 (8,11)	38,31 (30,88)	64,25 (36,15)	75,00 (65,68)	19,28 (19,41)	52,10 (33,17)	71,75 (61,14)	58,50 (59,92)
	21,97 (26,02)	57,32 (37,37)	84,20 (58,42)	91,00 (11,73)	21,30 (12,77)	55,24 (38,16)	87,00 (32,49)	88,95 (11,43)
p-Wert	0,552	0,192	0,169	0,357	0,910	0,167	0,567	0,360
Kruskal Wallis - Test								
post-hoc	1,000	1,000	0,736	0,982	0,999	1,000	0,564	0,981
Dunnnett T3 - Test	0,701	0,998	0,225	0,936	1,000	0,975	0,985	0,967
	1,000	1,000	0,631	0,967	0,992	0,995	0,979	0,752
	0,999	0,652	0,983	0,966	1,000	0,993	1,000	0,927

Tabelle 5-10. PI⁺/Annexin⁻-Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und Ru360 und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.

PI ⁺ /Annexin ⁻ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 0 min				Präinkubationszeit 15 min			
	Bupivacain [ppm]				Bupivacain [ppm]			
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
Ru360 [µM]	4,34 (4,66)	18,90 (11,25)	42,10 (16,30)	4,02 (33,28)	7,82 (17,85)	6,76 (3,13)	28,70 (8,00)	32,60 (49,65)
	15,00 (16,36)	14,65 (4,23)	48,10 (9,65)	30,70 (63,49)	10,205 (7,72)	7,655 (5,58)	12,50 (5,85)	40,70 (29,43)
	14,00 (13,26)	12,45 (7,86)	40,70 (4,72)	21,54 (33,82)	11,65 (4,11)	7,97 (5,30)	12,70 (6,81)	50,20 (25,60)
	14,15 (6,13)	18,05 (20,59)	36,60 (27,55)	15,87 (23,07)	10,20 (8,33)	8,36 (14,39)	13,60 (4,95)	59,50 (31,75)
	8,60 (14,91)	22,05 (15,23)	39,50 (12,88)	4,155 (3,11)	16,80 (5,40)	8,73 (7,33)	25,40 (13,40)	38,70 (18,30)
p-Wert	0,392	0,185	0,436	0,202	0,373	0,667	0,042	0,500
Kruskal	0,375	0,828	0,986	0,949	1,000	1,000	0,085	1,000
Wallis - Test	0,268	0,689	0,964	1,000	1,000	0,960	0,002	1,000
post-hoc	0,037	1,000	0,985	1,000	1,000	0,886	0,008	0,997
Dunnett T3 - Test	0,731	0,953	1,000	0,727	0,999	0,988	1,000	1,000
PI ⁺ /Annexin ⁻ -Zellen an Gesamtpopulation [%] [Median (IQR)]	Präinkubationszeit 30 min				Präinkubationszeit 60 min			
	Bupivacain [ppm]				Bupivacain [ppm]			
	0	1000	1350	1750	0	1000	1350	1750
Ru360 [µM]	11,86 (14,09)	6,45 (8,77)	17,90 (7,58)	52,55 (46,88)	13,40 (4,56)	8,88 (3,61)	19,55 (7,90)	45,55 (46,45)
	11,10 (4,90)	8,14 (4,40)	9,00 (6,61)	43,85 (7,28)	13,55 (14,12)	12,80 (7,99)	10,48 (5,71)	53,40 (17,25)
	10,26 (7,05)	9,21 (2,93)	7,43 (7,80)	52,20 (17,55)	15,60 (26,78)	12,70 (5,37)	8,99 (4,34)	42,15 (13,63)
	11,60 (4,79)	8,07 (12,66)	7,50 (4,13)	52,85 (27,03)	16,50 (20,85)	9,71 (5,89)	11,45 (5,46)	41,95 (36,30)
	10,69 (23,06)	8,96 (12,20)	11,95 (2,23)	39,20 (24,75)	12,70 (16,00)	6,62 (5,81)	20,75 (14,13)	39,10 (21,98)
p-Wert	0,916	0,906	0,074	0,612	0,564	0,189	0,027	0,692
Kruskal	1,000	0,997	0,089	1,000	0,981	0,745	0,054	1,000
Wallis - Test	0,995	0,999	0,074	1,000	0,835	0,663	0,039	0,994
post-hoc	1,000	0,998	0,047	1,000	0,924	1,000	0,077	0,988
Dunnett T3 - Test	0,999	0,978	0,278	1,000	1,000	0,961	1,000	0,874

6 Diskussion

Im Gegensatz zur systemischen Toxizität von Lokalanästhetika, die klinisch hinreichend bekannt und pathomechanistisch bereits in Teilen untersucht ist, sind die Mechanismen der lokalen Toxizität bisher kaum geklärt. Der Fokus der hier vorliegenden Arbeit liegt hierbei insbesondere auf der Myotoxizität von Lokalanästhetika [47]. Von allen klinisch relevanten Lokalanästhetika gilt Bupivacain hierbei als das Lokalanästhetikum mit dem größten myotoxischen Potential [35]. Obwohl der genaue Pathomechanismus bisher nicht verstanden ist, ist bekannt, dass die Myotoxizität nicht allein auf eine direkte Zellschädigung durch Lokalanästhetika, sondern auch auf deren Einfluss auf die Ca^{2+} -Homöostase und die Induktion von Apoptosekaskaden zurückzuführen ist [53–55]. Eine wesentliche Rolle scheint den Mitochondrien zuzukommen [46]. Ca^{2+} -abhängige mitochondriale Mechanismen können über eine Beteiligung verschiedener intramitochondrialer Ionen- und Transportkanäle wie den „*mitochondrial-apoptosis channel*“, „*mitochondrial Permeability Transition Pore*“ oder den „*mitochondrial calcium uniporter*“ zur Apoptose der Zellen führen [118,119].

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Modifikation mitochondrialer Ionenkanäle die Myotoxizität von Bupivacain untersucht um hierüber einen Beitrag zur Erforschung der Pathomechanismen der Myotoxizität zu leisten.

6.1 Nachweis der Myotoxizität und Auswahl der Bupivacain-Konzentrationen

In der vorliegenden Arbeit wurde mit einem 2D-Zellkultur-Modell gearbeitet. Die Myozyten breiten sich als einzellige Schicht aus, sodass die Dreidimensionalität der *in vivo*-Situation unbeachtet bleibt. Auch physiologische und pharmakologische Faktoren wie die Verteilung oder Resorption des Lokalanästhetikums fließen in ein derartiges Modell nicht ein. Zur Beantwortung der vorliegenden Fragestellung sind diese Faktoren jedoch nicht primär entscheidend. 2D-Zellkultur-Modelle sind breit etabliert und bieten damit eine gute Vergleichsgrundlage. Daher sind sie im Rahmen dieser und ähnlicher Arbeit vergleichsweise gut und einfach anwendbar. Innerhalb der Arbeitsgruppe wurde zur Betrachtung der apoptotischen Effekte ein Versuchsmodell mit 2-stündiger Bupivacain-Inkubation und einer anschließenden Erholungszeit von 24 h etabliert [184]. Mittels Durchflusszytometrie wurden die Anteile apoptotischer, primär nekrotischer und vitaler Zellen gemessen. Die Versuchsanzahl wurde auf mindestens 4 Versuchsreihen pro Vergleichsgruppe festgesetzt, sodass im Mittel über 96

Einzelmessungen je Blockergruppe (CsA, Ru360, iMAC) erfolgten (exklusive Vorversuche). Insgesamt konnten in den Versuchsreihen viele Effekte leider nur tendenziell beobachtet werden, ohne statistische Signifikanz zu erreichen. Hierzu sind Folgeversuche mit höheren Fallzahlen oder aber auch eine feinere Abstimmung der verwendeten Konzentrationsreihen notwendig und sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit konnte die mikroskopische Betrachtung der C2C12- und der pM-Zellen zeigen, dass die 2-stündige Inkubation mit Bupivacain *in vitro* zu einer unspezifischen Schädigung der myozytären Zellverbände führt. Die Zellen lösten sich aus ihren Verbänden, kugelten sich ab und schwammen vereinzelt im Medium. Dieses Phänomen war nach 24 h teilweise reversibel und die Zellverbände mit der typischen Muskelstruktur wiederhergestellt. In der Literatur wurden derartige Beobachtungen noch nicht formuliert. Die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte nach Bupivacain-Intoxikation sind im Hinblick auf das gewählte 2D-Zellkulturmodell jedoch vermeintlich als Bestätigung der Toxizität zu werten. In der Literatur wurde bereits anhand verschiedener *in-vivo*-Tiermodelle insbesondere nach intramuskulärer Bupivacain-Injektion elektronen- und lichtmikroskopisch nachgewiesen, dass Bupivacain unspezifische myotoxische Reaktionen hervorruft. Die ultrastrukturellen Veränderungen wurden ausführlich beschrieben. Diese reichen von irreversiblen Myonekrosen über apoptotische Prozesse bis hin zur vollständigen Regeneration des Muskelgewebes nach bis zu 4 Wochen [40–42].

Mittels Durchflusszytometrie wurde in der vorliegenden Arbeit der Anteil apoptotischer, primär nekrotischer und vitaler Zellen an der Gesamtzellzahl analysiert. Bei den C2C12-Zellen zeigte sich mit steigender Bupivacain-Konzentration eine steigende Apoptoserate. Gleichzeitig sank der Anteil vitaler Zellen. Diese konzentrationsabhängige Zunahme der Bupivacain-induzierten Myotoxizität konnte bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [184] und zeigte an dieser Stelle eine solide Modellstruktur. Bei den pM-Zellen war bereits bei Bupivacain-Konzentrationen von 1000 ppm ein Maximum an Zellschädigung erreicht. Diese Beobachtung stimmt mit den beschriebenen Erkenntnissen von Hofmann et al. bzw. Plank et al. überein. Die Autoren beobachten bereits, dass pM-Zellen sensibler auf eine Exposition mit Bupivacain reagieren und vermuten u.a. eine Verminderung des sarkoplasmatischen Retikulums als mögliche Ursache [179,184,185]. Möglicherweise wurde unter diesem Aspekt ein ungünstig hoher Konzentrationsbereich gewählt, so dass gerade apoptotische Prozesse bei pM-Zellen nicht adäquat erfassbar waren.

6.2 Blockade der mPTP durch CsA

Insbesondere für Bupivacain ist ein Zusammenhang zwischen der Induktion der Apoptose und der Öffnung der „*Permeability Transition Pore*“ (mPTP) bekannt [46]. Unter anderem könnte Bupivacain über einen Anstieg des zytoplasmatischen Ca^{2+} zur Öffnung der mPTP und damit zur Ausschüttung proapoptotischer oder pronekrotischer Faktoren, insbesondere Cytochrom c (cyt c) führen. [137,141]. Irwin et al. konnten sowohl in isolierten Mitochondrien als auch in intakten murinen Muskelfaser in situ nachweisen, dass niedrige Bupivacain-Konzentrationen zu einer Öffnung der mPTP führen. Außerdem war es mittels Cyclosporin A – einem selektiven mPTP-Blocker – möglich, die durch Bupivacain-induzierte cyt c-Freisetzung zu inhibieren [46]. Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Versuchsreihe für eine Bupivacain-Konzentration von 1000 ppm und eine CsA-Konzentration 5 μM sogar eine signifikant erhöhte Rate an apoptotischen C2C12-Zellen beobachtet werden. In den übrigen Konzentrationsreihen war dagegen kein Effekt auf die Apoptoserate nachweisbar. Auch der Anteil vitaler Zellen war hier bei CsA-Konzentrationen von 0,5 μM , 1 μM und 5 μM signifikant erniedrigt. Ähnliche myotoxische Einflüsse durch CsA konnten bereits Tang et al. nachweisen. Dabei rief CsA über den „*Calcium sensing receptor*“ einen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} hervor [186], was durch Beeinflussung der ERK MAPK- und p38 MAPK-Signalkaskaden zu einer erhöhten Apoptoserate führt [187]. Auch in neuronalen Zellen und Glia-Zellen konnte eine CsA-induzierte Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels mit konsekutiver Verstärkung der Apoptose beobachtet werden [188]. Möglicherweise wirkt CsA auch in der vorliegenden Arbeit über die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels synergistisch oder additiv mit Bupivacain und erhöht dadurch kumulativ die Toxizität für die jeweilige Zellkultur, sodass dadurch proapoptotische Ca^{2+} -abhängige Signalkaskaden unabhängig von einer Inhibierung der cyt c-Freisetzung gefördert werden.

6.3 Blockade des MAC durch iMAC

Die Öffnung des „*mitochondrial apoptotic channel*“ (MAC) ist eng verknüpft mit der Freisetzung von cyt c in der frühen Phase der Apoptose [127,128]. Peixoto et al. wiesen nach, dass die Blockade des MAC durch „*mitochondrial apoptotic channel inhibitors*“ (iMAC) die Freisetzung von cyt c und damit die Initiierung der Apoptose hemmen kann [177]. Ausgeschlossen hiervon werden jedoch starke toxische Effekte, wie sie beispielsweise durch den Kinase-Inhibitor Staurosporin hervorgerufen werden können. Diese konnten durch einen Blockade des MAC nicht verhindert werden [177,189].

In der hier vorliegenden Arbeit konnte durch die alleinige Blockade des MAC kein Einfluss auf die Bupivacain-induzierte Toxizität beobachtet werden. Allerdings wurde der Einfluss von Bupivacain bei MAC-Blockade lediglich mittels Durchflusszytometrie betrachtet und damit allein das toxische Endresultat ohne eine Betrachtung molekularer Ebenen beurteilt. Die Bedeutung des MACs scheint daher im Gesamten eher weniger bedeutend zu sein. Möglich wäre auch, dass die Toxizität von Bupivacain insgesamt als zu stark einzustufen ist [189]. Unabhängig von dem hier beobachteten Endresultat ist damit die Rolle des MAC weiterhin ungeklärt.

6.4 Blockade des MCU durch Ru360

Der „*mitochondrial calcium uniporter*“ (MCU) ist ein Proteinkomplex der inneren Mitochondrialen Membran, der eine bedeutende Rolle bei der Ca^{2+} -Homöostase, dem Energiemetabolismus und der Apoptoseinduktion spielt. Außerdem kommt ihm eine wichtige Rolle bei der durch oxidativen Stress vermittelten Zytotoxizität zu. Liao et al. zeigten in HeLa-Zellen (Epithelzellen eines Zervixkarzinoms) und primären cerebellären Körnerzellen, dass die Blockade von MCU die Ca^{2+} -Aufnahme des Mitochondriums minimierte und einen protektiven Effekt auf den durch oxidativen Stress hervorgerufenen Zelltod hatte [110]. Ähnliches konnten Yan et al. nachweisen [190]. Außerdem demonstrierten jene Autoren im Tiermodell an Ratten, dass eine Blockade der MCU den Anteil apoptotischer Zellen nach einer Subarachnoidalblutung sowie die Freisetzung von cyt c und Aktivierung der Caspase 3 reduzierte [190]. In weiteren Studien in Neuronen hatte die Blockade von MCU durch Reduktion sowohl der Freisetzung von cyt c aus den Mitochondrien als auch der Produktion von „*reactive oxygen species*“ (ROS) einen neuroprotektiven Effekt. Auch hier konnte der Anteil apoptotischer Zellen gesenkt werden [191]. Eine Öffnung des MCU im Rahmen von Ischämie-Reperfusionsschäden in Neuronen dagegen zeigte eine gesteigerte Apoptoserate [192]. In einem vergleichbaren Setting an Kardiomyozyten konnte ebenfalls bei Ischämie-Reperfusionsschäden eine Blockade des MCU durch Ru360 eine Verminderung der Apoptoserate hervorrufen [193]. Ischämische Prozesse in Kardiomyozyten gehen, ähnlich wie eine Intoxikation mit Bupivacain, mit einer Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und der Produktion von ROS einher. Idealerweise wäre daher eine Übertragbarkeit der an Kardiomyozyten nachgewiesenen Apoptosereduktion durch MCU-Blockade auch nach Bupivacain-Intoxikation zu erwarten.

Passend hierzu zeigte sich bei mittleren Bupivacain-Konzentrationen Zellmodell-unabhängig eine tendenzielle Reduktion der Apoptoserate jedoch ohne Signifikanz. Innerhalb dieses Konzentrationsbereichs wurde durch Zugabe von Ru360 eine signifikante Erniedrigung der primär nekrotischen Zellen beobachtet. Gleichzeitig nahm der Anteil vitaler Zellen zu. Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass eine Blockade des MCU protektive Effekte auf die Bupivacain-induzierte Myotoxizität haben kann.

6.5 Schlussfolgerung

Die vorliegende Arbeit kann bestärken, dass labortechnisch hergestellte, immortalisierte C2C12-Zellen im Vergleich zu primäre Mausmuskelzellen weniger sensibel auf Lokalanästhetika reagieren. Dies macht ihre Handhabung zwar einfacher, schränkt aber die Vergleichbarkeit zu in vivo Prozessen ein. Diskutiert werden können hier unterschiedliche Ursachen. Einerseits wird in der Literatur vermutet, dass eine signifikante Reduktion des Sarkoplasmatischen Retikulums ursächlich hierfür ist [185]. Andererseits muss jedoch auch beachtet werden, dass im Rahmen der labortechnischen Herstellung gezielt intrazelluläre Apoptose-induzierende Signalkaskaden modifiziert werden.

Weiterhin konnte die konzentrationsabhängige Toxizität von Bupivacain auf Myozyten in Form einer konzentrationsabhängigen Apoptose-Induktion gezeigt werden. Auch wenn im Weiteren viele Effekte nur tendenziell beobachtet werden konnten, liefert die vorliegende Arbeit weitere Hinweise darauf, dass diese Myotoxizität zu einem gewissen Grad mitochondrial beeinflusst wird. Sie unterstützt die Vermutung, dass ein wichtiger Weg hierbei über Ca^{2+} -abhängige Prozesse des Mitochondriums zu führen scheint. So hatte die Blockade des Ca^{2+} -Strom über den MCU in der IMM einen protektiven Effekt auf die Myotoxizität von Bupivacain. Außerdem scheint eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels durch Cyclosporin A die Toxizität von Bupivacain zu verstärken. Ähnlich konnten auch weitere Arbeiten einen Einfluss einer Modifikation der Ca^{2+} -Homöostase auf die Toxizität von Lokalanästhetika zeigen: Die Blockade von Ca^{2+} aus dem SR durch Dantrolen zeigte eine signifikante Reduktion der primär nekrotischen Zellen, während auch hier eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels durch Koffein eine Nekrose-Induktion förderte [185]. Im Besonderen gilt hier zu erwähnen, dass die Veränderungen der Toxizität insbesondere in mittleren Konzentrationsbereichen zu beobachten sind [185]. In sehr niedrigen oder höheren Konzentrationen findet sich auch hier keine signifikante Modifikation der Toxizität.

In Zusammenschau der in dieser Arbeit sowie durch Literaturrecherche gewonnenen Erkenntnisse scheint der mitochondriale Ca^{2+} -abhängige Signalweg in der Bupivacain-induzierten Myotoxizität eine wichtige Rolle zu spielen. Allerdings müssen parallel hierzu auch weitere Effektorkaskaden existieren. Eine gänzliche Aufhebung der Bupivacain-induzierten Myotoxizität konnte durch gezielte Modifikation der Ca^{2+} -Homöostase weder in der vorliegenden Arbeit noch in weiteren den Ca^{2+} -Zellstoffwechsel betreffenden Versuchsreihen in der Literatur erreicht werden [185].

Im Rahmen des Forschungsgebietes der Neurotoxizität von Lokalanästhetika, welche bereits sehr ausführlich untersucht wurde, wurden neben der Ca^{2+} -Homöostase und der ROS-Produktion weitere Signalwege als wesentliche Effektoren der Apoptose-induzierenden Toxizität identifiziert. Sie wurden von Verlinde et al. schematisch dargestellt [194] (s. Abbildung 6-1). Insbesondere die Aktivierung unterschiedlicher Proteinkinasen-Systeme wie den Signalwegen PI3K sowie MAPK werden signifikante Einflüsse auf die Neurotoxizität nachgewiesen. Die wichtigsten Effektorkaskaden sind in der Abbildung 6-1 rot markiert. Die MAPKs gehören zu der Familie der Serin-Threonin-Proteinkinasen und dienen als wichtige Vermittler in der Kommunikation zwischen Zellmembran und Zellkern [195]. Dadurch spielen sie auch eine wichtige Rolle beim Zelluntergang, respektive der Apoptose, indem sie beispielsweise die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie CHOP initiieren [196]. Im Besonderen konnte die Aktivierung des p38 MAPK-Signalwegs beschrieben werden [173]. Direkte neurotoxische Effekte von Lidocain konnten sowohl in vitro als auch in vivo durch eine Blockade des p38 MAPK-Signalwegs verhindert werden. Dadurch war ein Rückgang der Apoptose-Rate zu verzeichnen [197]. Auch der von der Serin/Threonin Kinase Akt induzierte Signalweg wurde in unterschiedlichen Studien untersucht. Der Akt-Signalweg steuert Zellfunktionen wie das Zellüberleben, Wachstum, Proliferation, Angiogenese, Metabolismus und Migration [198]. Unter dem Einfluss von Bupivacain und Lidocain zeigte sich die Aktivität von Akt herabgesetzt [80], während die Aktivierung von Akt durch Phosphorylierung einen protektiven Effekt auf die Zellschädigung von Neuronen zeigte [199]. Weiterhin konnte im Rahmen der Neurotoxizität die Involvierung anderer Signalsysteme wie der „*c-jun terminal N-kinase*“ (JNK) und der „*extracellular signal-regulated kinase*“ (ERK) nachgewiesen werden [81]. Die Aktivierung dieser Proteinkinasensysteme erfolgt hierbei jedoch ortsabhängig. So kann beispielsweise in Neuronen eine Inhibierung der Caspasen-Systeme protektiv wirken, während sie in Axonen keinen Schutz bietet [200]. Es

als Ursache der Lokalanästhetika-induzierten Myotoxizität nachweisen [201]. Hiermit eröffnet sich ein völlig neuer Aspekt eines möglichen Pathomechanismus.

Zusammenfassend liefert die vorliegende Arbeit einen Beitrag zur Aufklärung des Pathomechanismus der Lokalanästhetika-induzierten Myotoxizität, wirft aber zugleich neue Fragen auf und eröffnet weitere Forschungsansätze für die Zukunft. Neben der Erfassung der klinischen Relevanz der Myotoxizität von Lokalanästhetika in der täglichen Anwendung, zu der aktuell noch aussagekräftige Prävalenzstudien fehlen, sollte die Übertragbarkeit der im Rahmen der Neurotoxizität als signifikant erachteten Signalkaskaden überprüft werden. Unterstützend zu den in der Arbeit vorliegenden durchflusszytometrischen Messungen bietet es sich an die exakten Ca^{2+} -Austauschprozesse über die mitochondrialen inneren und äußeren Membranen sowie die Bedeutung der Blockaden der einzelnen Mitochondrienkanäle auf molekularer Ebene weiter zu quantifizieren.

7 Zusammenfassung

Lokalanästhetika, allen voran Bupivacain mit dem höchsten myotoxischen Potential, wirken konzentrationsabhängig toxisch auf Skelettmuskelzellen. Insbesondere Bupivacain ist außerdem in der Lage in Myozyten apoptotische Zellvorgänge zu induzieren. Hier scheinen die Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Spiegels und die Bildung von „*Reaktiv Oxygen Species*“ (ROS) eine Rolle zu spielen. Ziel der Arbeit war es, durch Blockade der „*mitochondrialen Permeability Pore*“ (mPTP), des „*mitochondrial apoptotic channel*“ (MAC) und des „*mitochondrial Calicum Uniporter*“ (MCU) eine Modifizierung der Myotoxizität von Bupivacain zu erreichen, um Rückschlüsse auf die intrazellulären apoptotischen Signalkaskaden ziehen zu können.

Für die Durchführung wurden murine immortalisierte C2C12-Zellen und aus BALB/c An-Nerl Mäuse gewonnene primäre Mausmuskelzellen *in vitro* mit Bupivacain und den jeweiligen o.g. Substanzen unterschiedlicher Konzentration sowie nach unterschiedlicher Präinkubationszeiten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in eine 24-stündige Erholungsphase überführt. Im Anschluss wurden sie mit Annexin V/FITC (Annexin) und Propidium-Iodid (PI) gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Beurteilt wurde dabei der Anteil apoptotischer Zellen ($\text{PI}^+/\text{Annexin}^+$, $\text{PI}^-/\text{Annexin}^+$), der Anteil primär nekrotischer Zellen ($\text{PI}^+/\text{Annexin}^-$) und der Anteil vitaler Zellen ($\text{PI}^-/\text{Annexin}^-$).

In den Vorversuchen konnte die Myotoxizität von Bupivacain bestätigt werden. Hierbei zeigte sich eine unterschiedliche Sensibilität von C2C12- und pM-Zellen gegenüber Bupivacain. Die Zugabe von CsA führte bei C2C12-Zellen sogar zu einer signifikant erhöhten Apoptoserate (Bupivacain-Konzentration 1000 ppm und CsA-Konzentration 5 μM). Auch der Anteil vitaler Zellen war hier bei CsA-Konzentrationen von 0,5 μM , 1 μM und 5 μM signifikant erniedrigt. Bei den pM-Zellen konnten keine signifikanten Änderungen gezeigt werden. Für iMAC ließen sich innerhalb der Bupivacain-Gruppen (1000 ppm, 1350 ppm, 1750 ppm) weder bei C2C12-Zellen noch bei pM-Zellen signifikante Veränderungen der Anteile apoptotischer primär nekrotischer oder vitaler Zellen beobachten. Die Blockade des MCU durch Ru360 zeigte bei mittleren Bupivacain-Konzentrationen von 1350 ppm eine Zellmodell-unabhängige tendenzielle Reduktion der Apoptoserate bei Ru360-Konzentrationen von etwa 2,5 μM und 5 μM . Hiermit einhergehend war eine signifikante Reduktion der primär nekrotischen Zellen mit tendenzieller Zunahme der vitalen Zellen.

Zusammenfassend bestärkt die vorliegende Arbeit, dass labortechnisch hergestellte, immortalisierte C2C12-Zellen im Vergleich zu primäre Mausmuskelzellen weniger sensibel auf Lokalanästhetika reagieren. Weiterhin lässt sich die konzentrationsabhängige Toxizität von Bupivacain auf Myozyten in Form einer konzentrationsabhängigen Apoptose zeigen. Es zeigen sich im weiteren Hinweise, dass die Lokalanästhetika-induzierte Myotoxizität zu einem gewissen Grad über eine Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels mitochondrial beeinflusst wird. An vorliegender Arbeit anknüpfend bieten sich weitere Forschungsansätze insbesondere durch Messungen der mitochondrialen Ca^{2+} -Austauschprozesse sowie durch die Beobachtung der Effekte von Ionenkanalblockaden auf molekularer Ebene an.

8 Literaturverzeichnis

1. Koller C. Vorläufige Mittheilung über locale Anästhesirung am Auge. Bericht über die Sechzehnte Versammlung der ophthalmologischen Gesellschaft, Heidelberg: Bei-lageheft zu dem Klinischen Wochenblättern für Augenheilkunde 1884;1884:22: 60–63.
2. Schleich CL. Die Infiltrationsanästhesie (lokale Anästhesie) und ihr Verhältnis zur allgemeinen Narkose (Inhalationsanästhesie). Verhdlg. dtsch. Ges. Chir. 1892;1892:1: 121–127.
3. Bier A. Versuche über die Cocainisierung des Rückenmarks. Deutsche Zeitschrift für Chirurgie 1899;1899:51: 361–369.
4. Bier A. Ueber einen neuen Weg Localanästhesie an den Gliedmaassen zu erzeugen. Arch klin Chir 1908;1908:86:1007–1016.
5. Löfgren N. Studies on local anesthetics. Xylocaine, a new synthetic drug.; 1948.
6. Loefgren N, Lundquist B. Studien on local anesthetics, Vol 58. Svenska Kem. Todskr.; 1948.
7. Dullenkopf A, Borgeat A. Lokalanästhetika. Unterschiede und Gemeinsamkeiten der "-caine". Anaesthesist 2003;52:329–340. 12715136.
8. Strichartz GR. The inhibition of sodium currents in myelinated nerve by quaternary derivatives of lidocaine. J Gen Physiol 1973;62:37–57.
9. Strichartz GR. Current concepts of the mechanism of action of local anesthetics. J Dent Res 1981;60:1460–1470.
10. Stuhmer W, Conti F, Suzuki H, Wang XD, Noda M, Yahagi N, et al. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. Nature 1989;339:597–603.
11. Lipkind GM, Fozzard HA. Molecular modeling of local anesthetic drug binding by voltage-gated sodium channels. Mol Pharmacol 2005;68:1611–1622.
12. Wang SY, Nau C, Wang GK. Residues in Na(+) channel D3-S6 segment modulate both batrachotoxin and local anesthetic affinities. Biophys J 2000;79:1379–1387.
13. Yarov-Yarovoy V, Brown J, Sharp EM, Clare JJ, Scheuer T, Catterall WA. Molecular determinants of voltage-dependent gating and binding of pore-blocking drugs in transmembrane segment IIIS6 of the Na(+) channel alpha subunit. J Biol Chem 2001;276:20–27.

14. Paiva JG, Paradiso P, Serro AP, Fernandes A, Saramago B. Interaction of local and general anaesthetics with liposomal membrane models: a QCM-D and DSC study. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2012;95:65–74.
15. Hogberg CJ, Lyubartsev AP. Effect of local anesthetic lidocaine on electrostatic properties of a lipid bilayer. *Biophys J* 2008;94:525–531.
16. Guo XT, Castle NA, Chernoff DM, Strichartz GR. Comparative inhibition of voltage-gated cation channels by local anesthetics. *Ann N Y Acad Sci* 1991;625:181–199.
17. Brau ME, Vogel W, Hempelmann G. Fundamental properties of local anesthetics: half-maximal blocking concentrations for tonic block of Na⁺ and K⁺ channels in peripheral nerve. *Anesth Analg* 1998;87:885–889.
18. Olschewski A, Olschewski H, Brau ME, Hempelmann G, Vogel W, Safronov BV. Effect of bupivacaine on ATP-dependent potassium channels in rat cardiomyocytes. *Br J Anaesth* 1999;82:435–438.
19. Sugiyama K, Muteki T. Local anesthetics depress the calcium current of rat sensory neurons in culture. *Anesthesiology* 1994;80:1369–1378.
20. Nagel JE, Fuscaldo JT, Fireman P. Paraben allergy. *JAMA* 1977;237:1594–1595.
21. Bhole MV, Manson AL, Seneviratne SL, Misbah SA. IgE-mediated allergy to local anaesthetics: separating fact from perception: a UK perspective. *Br J Anaesth* 2012;108:903–911.
22. Eggleston ST, Lush LW. Understanding allergic reactions to local anesthetics. *Ann Pharmacother* 1996;30:851–857.
23. Di Gregorio G, Neal JM, Rosenquist R, Weinberg GL. Clinical presentation of local anesthetic systemic toxicity: a review of published cases, 1979 to 2009. *Reg Anesth Pain Med* 2010;35:181–187.
24. Scott DB. Toxic effects of local anaesthetic agents on the central nervous system. *Br J Anaesth* 1986;58:732–735.
25. Nouette-Gaulain K, Capdevila X, Rossignol R. Local anesthetic 'in-situ' toxicity during peripheral nerve blocks: update on mechanisms and prevention. *Curr Opin Anaesthesiol* 2012;25:589–595.
26. Breu A, Rosenmeier K, Kujat R, Angele P, Zink W. The cytotoxicity of bupivacaine, ropivacaine, and mepivacaine on human chondrocytes and cartilage. *Anesth Analg* 2013;117:514–522.

27. Chu C, Izzo NJ, Papas NE, Fu FH. In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. *Arthroscopy* 2006;22:693–699.
28. Gomoll A, Kang RW, Williams JM, Bach BR, Cole BJ. Chondrolysis after continuous intra-articular bupivacaine infusion: an experimental model investigating chondrotoxicity in the rabbit shoulder. *Arthroscopy* 2006;22:813–819.
29. Karpie JC, Chu CR. Lidocaine exhibits dose- and time-dependent cytotoxic effects on bovine articular chondrocytes in vitro. *Am J Sports Med* 2007;35:1621–1627.
30. Ritchie JM, Greengard P. On the active structure of local anesthetics. *J Pharmacol Exp Ther* 1961;133:241–245.
31. Long WB, Rosenblum S, Grady IP. Successful resuscitation of bupivacaine-induced cardiac arrest using cardiopulmonary bypass. *Anesth Analg* 1989;69:403–406.
32. Graf BM, Martin E, Bosnjak ZJ, Stowe DF. Stereospecific effect of bupivacaine isomers on atrioventricular conduction in the isolated perfused guinea pig heart. *Anesthesiology* 1997;86:410–419.
33. Bardsley H, Gristwood R, Baker H, Watson N, Nimmo W. A comparison of the cardiovascular effects of levobupivacaine and rac-bupivacaine following intravenous administration to healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* 1998;46:245–249.
34. Foster AH, Carlson BM. Myotoxicity of local anesthetics and regeneration of the damaged muscle fibers. *Anesth Analg* 1980;59:727–736.
35. Zink W, Seif C, Bohl, Jurgen R E, Hacke N, Braun PM, Sinner B, et al. The acute myotoxic effects of bupivacaine and ropivacaine after continuous peripheral nerve blockades. *Anesth Analg* 2003;97:1173-9, table of contents.
36. Brun A. Effect of procaine, carbocain and xylocaine on cutaneous muscle in rabbits and mice. *Acta Anaesthesiol Scand* 1959;3:59–73.
37. Gomez-Arnau JI, Yanguela J, Gonzalez A, Andres Y, Garcia del Valle, S, Gili P, et al. Anaesthesia-related diplopia after cataract surgery. *Br J Anaesth* 2003;90:189–193.
38. Han SK, Kim JH, Hwang JM. Persistent diplopia after retrobulbar anesthesia. *J Cataract Refract Surg* 2004;30:1248–1253.
39. Hogan Q, Dotson R, Erickson S, Kettler R, Hogan K. Local anesthetic myotoxicity: a case and review. *Anesthesiology* 1994;80:942–947.
40. Politi PK, Havaki S, Manta P, Lyritis G. Bupivacaine-induced regeneration of rat soleus muscle: ultrastructural and immunohistochemical aspects. *Ultrastruct Pathol* 2006;30:461–469.

41. Duguez S, Feasson L, Denis C, Freyssenet D. Mitochondrial biogenesis during skeletal muscle regeneration. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002;282:E802-9.
42. Benoit PW, Belt WD. Destruction and regeneration of skeletal muscle after treatment with a local anaesthetic, bupivacaine (Marcaine). *J Anat* 1970;107:547–556.
43. Hall-Craggs EC. Early ultrastructural changes in skeletal muscle exposed to the local anaesthetic bupivacaine (Marcaine). *Br J Exp Pathol* 1980;61:139–149.
44. Komorowski TE, Shepard B, Okland S, Carlson BM. An electron microscopic study of local anesthetic-induced skeletal muscle fiber degeneration and regeneration in the monkey. *J Orthop Res* 1990;8:495–503.
45. Carlson BM, Rainin EA. Rat extraocular muscle regeneration. Repair of local anesthetic-induced damage. *Arch Ophthalmol* 1985;103:1373–1377.
46. Irwin W, Fontaine E, Agnolucci L, Penzo D, Betto R, Bortolotto S, et al. Bupivacaine myotoxicity is mediated by mitochondria. *J Biol Chem* 2002;277:12221–12227.
47. Nouette-Gaulain K, Jose C, Capdevila X, Rossignol R. From analgesia to myopathy: When local anesthetics impair the mitochondrion. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:14–19.
48. Sakura S, Bollen AW, Ciriales R, Drasner K. Local anesthetic neurotoxicity does not result from blockade of voltage-gated sodium channels. *Anesth Analg* 1995;81:338–346.
49. Brito OM de, Scorrano L. An intimate liaison: spatial organization of the endoplasmic reticulum-mitochondria relationship. *EMBO J* 2010;29:2715–2723.
50. Galbes O, Bourret A, Nouette-Gaulain K, Pillard F, Matecki S, Py G, et al. N-acetylcysteine protects against bupivacaine-induced myotoxicity caused by oxidative and sarcoplasmic reticulum stress in human skeletal myotubes. *Anesthesiology* 2010;113:560–569.
51. Nouette-Gaulain K, Sirvent P, Canal-Raffin M, Morau D, Malgat M, Molimard M, et al. Effects of intermittent femoral nerve injections of bupivacaine, levobupivacaine, and ropivacaine on mitochondrial energy metabolism and intracellular calcium homeostasis in rat psoas muscle. *Anesthesiology* 2007;106:1026–1034.
52. Sztark F, Ouhabi R, Dabadie P, Mazat JP. Effects of the local anesthetic bupivacaine on mitochondrial energy metabolism: change from uncoupling to decoupling depending on the respiration state. *Biochem Mol Biol Int* 1997;43:997–1003.

53. Benoit PW, Yagiela A, Fort NF. Pharmacologic correlation between local anesthetic-induced myotoxicity and disturbances of intracellular calcium distribution. *Toxicol Appl Pharmacol* 1980;52:187–198.
54. Johnson ME, Saenz JA, DaSilva AD, Uhl CB, Gores GJ. Effect of local anesthetic on neuronal cytoplasmic calcium and plasma membrane lysis (necrosis) in a cell culture model. *Anesthesiology* 2002;97:1466–1476.
55. Zink W, Graf BM, Sinner B, Martin E, Fink, Rainer H A, Kunst G. Differential effects of bupivacaine on intracellular Ca²⁺ regulation: potential mechanisms of its myotoxicity. *Anesthesiology* 2002;97:710–716.
56. Perez-Castro R, Patel S, Garavito-Aguilar ZV, Rosenberg A, Recio-Pinto E, Zhang J, et al. Cytotoxicity of local anesthetics in human neuronal cells. *Anesth Analg* 2009;108:997–1007.
57. Werdehausen R, Braun S, Essmann F, Schulze-Osthoff K, Walczak H, Lipfert P, et al. Lidocaine induces apoptosis via the mitochondrial pathway independently of death receptor signaling. *Anesthesiology* 2007;107:136–143.
58. Kamiya Y, Ohta K, Kaneko Y. Lidocaine-induced apoptosis and necrosis in U937 cells depending on its dosage. *Biomed Res* 2005;26:231–239.
59. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513–519.
60. Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9:459–470.
61. Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43–50.
62. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995;14:5579–5588.
63. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, et al. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989;245:301–305.
64. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2002;2:647–656.
65. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002;9:423–432.

66. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479–489.
67. Li K, Li Y, Shelton JM, Richardson JA, Spencer E, Chen ZJ, et al. Cytochrome c deficiency causes embryonic lethality and attenuates stress-induced apoptosis. *Cell* 2000;101:389–399.
68. Marsden VS, O'Connor L, O'Reilly LA, Silke J, Metcalf D, Ekert PG, et al. Apoptosis initiated by Bcl-2-regulated caspase activation independently of the cytochrome c/Apaf-1/caspase-9 apoptosome. *Nature* 2002;419:634–637.
69. Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, et al. Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 2000;14:729–739.
70. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 2001;412:95–99.
71. Zamorano S, Rojas-Rivera D, Lisbona F, Parra V, Court FA, Villegas R, et al. A BAX/BAK and cyclophilin D-independent intrinsic apoptosis pathway. *PLoS One* 2012;7:e37782.
72. Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001;3:E255-63.
73. Nakagawa T, Yuan J. Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 2000;150:887–894.
74. Hacki J, Egger L, Monney L, Conus S, Rosse T, Fellay I, et al. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* 2000;19:2286–2295.
75. Annis MG, Zamzami N, Zhu W, Penn LZ, Kroemer G, Leber B, et al. Endoplasmic reticulum localized Bcl-2 prevents apoptosis when redistribution of cytochrome c is a late event. *Oncogene* 2001;20:1939–1952.
76. Rudner J, Lepple-Wienhues A, Budach W, Berschauer J, Friedrich B, Wesselborg S, et al. Wild-type, mitochondrial and ER-restricted Bcl-2 inhibit DNA damage-induced apoptosis but do not affect death receptor-induced apoptosis. *J Cell Sci* 2001;114:4161–4172.
77. Nutt LK, Pataer A, Pahler J, Fang B, Roth, J. McConkey, D.J., Swisher SG. Bax and Bak promote apoptosis by modulating endoplasmic reticular and mitochondrial Ca²⁺ stores. *J Biol Chem* 2002;277:9219–9225.

78. Zong W-X, Li C, Hatzivassiliou G, Lindsten T, Yu Q-C, Yuan J, et al. Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis. *J Cell Biol* 2003;162:59–69.
79. Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 2002;277:21836–21842.
80. Maurice JM, Gan Y, Ma F-X, Chang Y-C, Hibner M, Huang Y. Bupivacaine causes cytotoxicity in mouse C2C12 myoblast cells: involvement of ERK and Akt signaling pathways. *Acta Pharmacol Sin* 2010;31:493–500.
81. Lirk P, Haller I, Colvin HP, Lang L, Tomaselli B, Klimaschewski L, et al. In vitro, inhibition of mitogen-activated protein kinase pathways protects against bupivacaine- and ropivacaine-induced neurotoxicity. *Anesth Analg* 2008;106:1456-64, table of contents.
82. Cela O, Piccoli C, Scrima R, Quarato G, Marolla A, Cinnella G, et al. Bupivacaine uncouples the mitochondrial oxidative phosphorylation, inhibits respiratory chain complexes I and III and enhances ROS production: results of a study on cell cultures. *Mitochondrion* 2010;10:487–496.
83. Terada H, Shima O, Yoshida K, Shinohara Y. Effects of the local anesthetic bupivacaine on oxidative phosphorylation in mitochondria. Change from decoupling to uncoupling by formation of a leakage type ion pathway specific for H⁺ in cooperation with hydrophobic anions. *J Biol Chem* 1990;265:7837–7842.
84. Schonfeld P, Sztark F, Slimani M, Dabadie P, Mazat JP. Is bupivacaine a decoupler, a protonophore or a proton-leak-inducer? *FEBS Lett* 1992;304:273–276.
85. Vanderkooi G, Shaw J, Storms C, Vennerstrom R, Chignell D. On the mechanism of action of anesthetics. Direct inhibition of mitochondrial F₁-ATPase by n-butanol and tetracaine. *Biochim Biophys Acta* 1981;635:200–203.
86. Johnson ME, Uhl CB, Spittler K.-H., Wang H, Gores GJ. Mitochondrial injury and caspase activation by the local anesthetic lidocaine. *Anesthesiology* 2004;101:1184–1194.
87. Nouette-Gaulain K, Bellance N, Prevost B, Passerieux E, Pertuiset C, Galbes O, et al. Erythropoietin protects against local anesthetic myotoxicity during continuous regional analgesia. *Anesthesiology* 2009;110:648–659.
88. Gomez TM, Zheng JQ. The molecular basis for calcium-dependent axon pathfinding. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:115–125.

89. Henley JR, Huang KH, Wang D., Poo MM. Calcium mediates bidirectional growth cone turning induced by myelin-associated glycoprotein. *Neuron* 2004;44:909–916.
90. Henley J, Poo MM. Guiding neuronal growth cones using Ca²⁺ signals. *Trends Cell Biol* 2004;14:320–330.
91. Brini M, Cali T, Ottolini D, Carafoli E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:2787–2814.
92. Glancy B, Balaban RS. Role of mitochondrial Ca²⁺ in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* 2012;51:2959–2973.
93. Adams JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev* 2003;17:2481–2495.
94. Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 2009;19:81–88.
95. Rizzuto R, Marchi S, Bonora M, Aguiari P, Bononi A, Stefani D de, et al. Ca(2+) transfer from the ER to mitochondria: when, how and why. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:1342–1351.
96. Rizzuto R, Duchen MR, Pozzan T. Flirting in little space: the ER/mitochondria Ca²⁺ liaison. *Sci STKE* 2004;2004:re1.
97. Vance JE. Molecular and cell biology of phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2003;75:69–111.
98. Voelker DR. Bridging gaps in phospholipid transport. *Trends Biochem Sci* 2005;30:396–404.
99. Hodge T, Colombini M. Regulation of metabolite flux through voltage-gating of VDAC channels. *J Membr Biol* 1997;157:271–279.
100. Tan W, Colombini M. VDAC closure increases calcium ion flux. *Biochim Biophys Acta* 2007;1768:2510–2515.
101. Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, Stefani D de, Wieckowski MR, Cavagna D, et al. Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J Cell Biol* 2006;175:901–911.
102. Rostovtseva TK, Tan W, Colombini M. On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. *J Bioenerg Biomembr* 2005;37:129–142.
103. Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 2004;427:360–364.

104. Stefani D de, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011;476:336–340.
105. Baughman JM, Perocchi F, Girgis H, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, et al. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 2011;476:341–345.
106. Gunter KK, Gunter TE. Transport of calcium by mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 1994;26:471–485.
107. Montero M, Lobaton CD, Moreno A, Alvarez J. A novel regulatory mechanism of the mitochondrial Ca²⁺ uniporter revealed by the p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor SB202190. *FASEB J* 2002;16:1955–1957.
108. Moreau B, Nelson C, Parekh AB. Biphasic regulation of mitochondrial Ca²⁺ uptake by cytosolic Ca²⁺ concentration. *Curr Biol* 2006;16:1672–1677.
109. Sparagna GC, Gunter KK, Sheu SS, Gunter TE. Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *J Biol Chem* 1995;270:27510–27515.
110. Liao Y, Hao Y, Chen H, He Q, Yuan Z, Cheng J. Mitochondrial calcium uniporter protein MCU is involved in oxidative stress-induced cell death. *Protein & cell* 2015;6:434–442.
111. Beutner G, Sharma VK, Giovannucci DR, Yule DI, Sheu SS. Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *J Biol Chem* 2001;276:21482–21488.
112. Michels G, Khan IF, Endres-Becker J, Rottlaender D, Herzig S, Ruhparwar A, et al. Regulation of the human cardiac mitochondrial Ca²⁺ uptake by 2 different voltage-gated Ca²⁺ channels. *Circulation* 2009;119:2435–2443.
113. Bernardi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999;79:1127–1155.
114. Baysal K, Jung DW, Gunter KK, Gunter TE, Brierley GP. Na(+)-dependent Ca²⁺ efflux mechanism of heart mitochondria is not a passive Ca²⁺/2Na⁺ exchanger. *Am J Physiol* 1994;266:C800-8.
115. Jung DW, Baysal K, Brierley GP. The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral. *J Biol Chem* 1995;270:672–678.
116. Villa A, Garcia-Simon MI, Blanco P, Sese B, Bogonez E, Satrustegui J. Affinity chromatography purification of mitochondrial inner membrane proteins with calcium transport activity. *Biochim Biophys Acta* 1998;1373:347–359.

117. Mitchell P. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Special Section: Peter Mitchell - 50th anniversary of the chemiosmotic theory 2011;1807:1507–1538. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272811002283>.
118. Antonsson B, Conti F, Ciavatta A, Montessuit S, Lewis S, Martinou I, et al. Inhibition of Bax channel-forming activity by Bcl-2. *Science* 1997;277:370–372.
119. Tsujimoto Y, Shimizu S. Role of the mitochondrial membrane permeability transition in cell death. *Apoptosis* 2007;12:835–840.
120. Minn AJ, Velez P, Schendel SL, Liang H, Muchmore SW, Fesik SW, et al. Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes. *Nature* 1997;385:353–357.
121. Schlesinger PH, Gross A, Yin XM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, et al. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:11357–11362.
122. Schendel SL, Xie Z, Montal MO, Matsuyama S, Montal M, Reed JC. Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5113–5118.
123. Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 2000;345 Pt 2:271–278.
124. Hsu YT, Youle RJ. Bax in murine thymus is a soluble monomeric protein that displays differential detergent-induced conformations. *J Biol Chem* 1998;273:10777–10783.
125. Griffiths GJ, Dubrez L, Morgan CP, Jones NA, Whitehouse J, Corfe BM, et al. Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J Cell Biol* 1999;144:903–914.
126. Saito M, Korsmeyer SJ, Schlesinger PH. BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* 2000;2:553–555.
127. Pavlov EV, Priault M, Pietkiewicz D, Cheng EH, Antonsson B, Manon S, et al. A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J Cell Biol* 2001;155:725–731.
128. Guihard G, Bellot G, Moreau C, Pradal G, Ferry N, Thomy R, et al. The mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) corresponds to a late apoptotic event. *J Biol Chem* 2004;279:46542–46550.

129. Guo, L, Pietkiewicz, D., Pavlov EV, Grigoriev SM, Kasianowicz JJ, Dejean LM, Korsmeyer SJ, et al. Effects of cytochrome c on the mitochondrial apoptosis-induced channel MAC. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004;286:C1109-17.
130. Dejean LM, Martinez-Caballero S, Guo L, Hughes C, Teijido O, Ducret T, et al. Oligomeric Bax is a component of the putative cytochrome c release channel MAC, mitochondrial apoptosis-induced channel. *Mol Biol Cell* 2005;16:2424–2432.
131. Barsukova A, Komarov A, Hajnoczky G, Bernardi P, Bourdette D, Forte M. Activation of the mitochondrial permeability transition pore modulates Ca²⁺ responses to physiological stimuli in adult neurons. *Eur J Neurosci* 2011;33:831–842.
132. Bernardi P, Stockum S von. The permeability transition pore as a Ca(2+) release channel: new answers to an old question. *Cell Calcium* 2012;52:22–27.
133. Kinnally KW, Antonsson B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis* 2007;12:857–868.
134. Petronilli V, Miotto G, Canton M, Brini M, Colonna R, Bernardi P, et al. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J* 1999;76:725–734.
135. Ichas F, Mazat JP. From calcium signaling to cell death: two conformations for the mitochondrial permeability transition pore. Switching from low- to high-conductance state. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:33–50.
136. Huser J, Blatter LA. Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. *Biochem J* 1999;343 Pt 2:311–317.
137. Rasola A, Bernardi P. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium* 2011;50:222–233.
138. Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, et al. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2002;2:55–67.
139. Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004;61:372–385.
140. Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem* 1992;267:8834–8839.

141. Fontaine E, Eriksson O, Ichas F, Bernardi P. Regulation of the Permeability Transition Pore in Skeletal Muscle Mitochondria: MODULATION BY ELECTRON FLOW THROUGH THE RESPIRATORY CHAIN COMPLEX I. *Journal of Biological Chemistry* 1998;273:12662–12668.
142. Walter L, Miyoshi H, Leverve X, Bernard P, Fontaine E. Regulation of the mitochondrial permeability transition pore by ubiquinone analogs. A progress report. *Free Radic Res* 2002;36:405–412.
143. Nicolli A, Petronilli V, Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by matrix pH. Evidence that the pore open-closed probability is regulated by reversible histidine protonation. *Biochemistry* 1993;32:4461–4465.
144. Wang W, Fang H, Groom L, Cheng A, Zhang W, Liu J, et al. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell* 2008;134:279–290.
145. Sacchetto R, Bertipaglia I, Giannetti S, Cendron L, Mascarello F, Damiani E, et al. Crystal structure of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) from bovine muscle. *J Struct Biol* 2012;178:38–44.
146. Shah PK, Sowdhamini R. Structural understanding of the transmembrane domains of inositol triphosphate receptors and ryanodine receptors towards calcium channeling. *Protein Eng* 2001;14:867–874.
147. Furuichi T, Kohda K, Miyawaki A, Mikoshiba K. Intracellular channels. *Curr Opin Neurobiol* 1994;4:294–303.
148. Iwai M, Tateishi Y, Hattori M, Mizutani A, Nakamura T, Futatsugi A, et al. Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant. *J Biol Chem* 2005;280:10305–10317.
149. Mikoshiba K. IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J Neurochem* 2007;102:1426–1446.
150. Bugrim AE. Regulation of Ca²⁺ release by cAMP-dependent protein kinase. A mechanism for agonist-specific calcium signaling? *Cell Calcium* 1999;25:219–226.
151. Khan MT, Wagner L, Yule DI, Bhanumathy C, Joseph SK. Akt kinase phosphorylation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors. *J Biol Chem* 2006;281:3731–3737.
152. Murthy KS, Zhou H. Selective phosphorylation of the IP₃R-I in vivo by cGMP-dependent protein kinase in smooth muscle. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2003;284:G221–30.

153. Bagni C, Mannucci L, Dotti CG, Amaldi F. Chemical stimulation of synaptosomes modulates alpha -Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II mRNA association to polysomes. *J Neurosci* 2000;20:RC76.
154. Vermassen E, Fissore RA, Nadif Kasri N, Vanderheyden V, Callewaert G, Missiaen L, et al. Regulation of the phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;319:888–893.
155. Jayaraman T, Ondrias K, Ondriasova E, Marks AR. Regulation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by tyrosine phosphorylation. *Science* 1996;272:1492–1494.
156. Coronado R, Morrissette J, Sukhareva M, Vaughan DM. Structure and function of ryanodine receptors. *Am J Physiol* 1994;266:C1485-504.
157. Furuichi T, Furutama D, Hakamata Y, Nakai J, Takeshima H, Mikoshiba K. Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are differentially expressed in rabbit brain. *J Neurosci* 1994;14:4794–4805.
158. Rios E, Brum G. Involvement of dihydropyridine receptors in excitation-contraction coupling in skeletal muscle. *Nature* 1987;325:717–720.
159. Huang C-H, Pedersen TH, Fraser JA. Reciprocal dihydropyridine and ryanodine receptor interactions in skeletal muscle activation. *J Muscle Res Cell Motil* 2011;32:171–202.
160. Pike GK, Abramson JJ, Salama G. Effects of tetracaine and procaine on skinned muscle fibres depend on free calcium. *J Muscle Res Cell Motil* 1989;10:337–349.
161. Takahashi S. Local anaesthetic bupivacaine alters function of sarcoplasmic reticulum and sarcolemmal vesicles from rabbit masseter muscle. *Pharmacol Toxicol* 1994;75:119–128.
162. Komai H, Lokuta AJ. Interaction of bupivacaine and tetracaine with the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel of skeletal and cardiac muscles. *Anesthesiology* 1999;90:835–843.
163. Shoshan-Barmatz V, Zchut S. The interaction of local anesthetics with the ryanodine receptor of the sarcoplasmic reticulum. *J Membr Biol* 1993;133:171–181.
164. Maemura Y. Effect of ropivacaine on Ca function of skinned skeletal muscle. *Masui* 2002;51:19–24.
165. Zink W, Missler G, Sinner B, Martin E, Fink, Rainer H A, Graf BM. Differential effects of bupivacaine and ropivacaine enantiomers on intracellular Ca²⁺ regulation in murine skeletal muscle fibers. *Anesthesiology* 2005;102:793–798.

166. Bossy-Wetzel E, Green DR. Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat Res* 1999;434:243–251.
167. Grey A de. The reductive hotspot hypothesis of mammalian aging: membrane metabolism magnifies mutant mitochondrial mischief. *Eur J Biochem* 2002;269:2003–2009.
168. Fridovich I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen? *Ann N Y Acad Sci* 1999;893:13–18.
169. Keller JN, Mattson MP. Roles of lipid peroxidation in modulation of cellular signaling pathways, cell dysfunction, and death in the nervous system. *Rev Neurosci* 1998;9:105–116.
170. Viner RI, Ferrington DA, Williams TD, Bigelow DJ, Schoneich C. Protein modification during biological aging: selective tyrosine nitration of the SERCA2a isoform of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase in skeletal muscle. *Biochem J* 1999;340 (Pt 3):657–669.
171. Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Bredt DS, Becker LC. Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:657–662.
172. Lu J, Xu SY, Zhang QG, Lei HY. Bupivacaine induces reactive oxygen species production via activation of the AMP-activated protein kinase-dependent pathway. *Pharmacology* 2011;87:121–129.
173. Tan Z, Dohi S, Chen J, Banno Y, Nozawa Y. Involvement of the mitogen-activated protein kinase family in tetracaine-induced PC12 cell death. *Anesthesiology* 2002;96:1191–1201.
174. Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca²⁺-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 1988;255:357–360.
175. Szabo I, Zoratti M. The giant channel of the inner mitochondrial membrane is inhibited by cyclosporin A. *J Biol Chem* 1991;266:3376–3379.
176. Hetz C, Vitte P-A, Bombrun A, Rostovtseva TK, Montessuit S, Hiver A, et al. Bax channel inhibitors prevent mitochondrion-mediated apoptosis and protect neurons in a model of global brain ischemia. *J Biol Chem* 2005;280:42960–42970.
177. Peixoto PM, Ryu S-Y, Bombrun A, Antonsson B, Kinnally KW. MAC inhibitors suppress mitochondrial apoptosis. *Biochem J* 2009;423:381–387.
178. Matlib MA, Zhou Z, Knight S, Ahmed S, Choi KM, Krause-Bauer J, et al. Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca²⁺ uptake into

- mitochondria in vitro and in situ in single cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1998;273:10223–10231.
179. Metterlein T, Hoffmann P, Spath R, Gruber M, Graf BM, Zink W. In vitro myotoxic effects of bupivacaine on rhabdomyosarcoma cells, immortalized and primary muscle cells. *Cancer cell international* 2015;15:75.
180. Calbiochem MM. Data Sheet 557440/Ru360; 2011.
181. Hanslick JL, Lau K, Noguchi KK, Olney JW, Zorumski CF, Mennerick S, et al. Dimethyl sulfoxide (DMSO) produces widespread apoptosis in the developing central nervous system. *Neurobiology of disease* 2009;34:1–10.
182. BD Pharmingen TM. Technical Data Sheet: FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I; 2008.
183. Herzenberg LA, Sweet RG. Fluorescence-activated cell sorting. *Sci Am* 1976;234:108–117.
184. Hofmann P, Metterlein T, Bollwein G, Gruber M, Plank C, Graf BM, et al. The myotoxic effect of bupivacaine and ropivacaine on myotubes in primary mouse cell culture and an immortalized cell line. *Anesth Analg* 2013;117:634–640.
185. Plank C, Hofmann P, Gruber M, Bollwein G, Graf BM, Zink W, et al. Modification of Bupivacaine-Induced Myotoxicity with Dantrolene and Caffeine In Vitro. *Anesth Analg* 2016;122:418–423.
186. Tang J, Wang G, Liu Y, Fu Y, Chi J, Zhu Y, et al. Cyclosporin A induces cardiomyocyte injury through calcium-sensing receptor-mediated calcium overload. *Die Pharmazie* 2011;66:52–57.
187. Chi J, Zhu Y, Fu Y, Liu Y, Zhang X, Han L, et al. Cyclosporin A induces apoptosis in H9c2 cardiomyoblast cells through calcium-sensing receptor-mediated activation of the ERK MAPK and p38 MAPK pathways. *Mol Cell Biochem* 2012;367:227–236.
188. Kaminska B, Figiel I, Pyrzynska B, Czajkowski R, Mosieniak G. Treatment of hippocampal neurons with cyclosporin A results in calcium overload and apoptosis which are independent on NMDA receptor activation. *Br J Pharmacol* 2001;133:997–1004.
189. Peixoto PM, Teijido O, Mirzalieva O, Dejean LM, Pavlov EV, Antonsson B, et al. MAC inhibitors antagonize the pro-apoptotic effects of tBid and disassemble Bax / Bak oligomers. *J Bioenerg Biomembr* 2017;49:65–74.

190. Yan H, Zhang D, Hao S, Li K, Hang C-H. Role of Mitochondrial Calcium Uniporter in Early Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Molecular neurobiology* 2015;52:1637–1647.
191. Wang C, Xie N, Wang Y, Li Y, Ge X, Wang M. Role of the Mitochondrial Calcium Uniporter in Rat Hippocampal Neuronal Death After Pilocarpine-Induced Status Epilepticus. *Neurochemical research* 2015;40:1739–1746.
192. Zhang L, Gao X, Yuan X, Dong H, Zhang Z, Wang S. Mitochondrial calcium uniporter opener spermine attenuates the cerebral protection of diazoxide through apoptosis in rats. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases : the official journal of National Stroke Association* 2014;23:829–835.
193. Motloch LJ, Reda S, Wolny M, Hoppe UC. UCP2 Modulates Cardioprotective Effects of Ru360 in Isolated Cardiomyocytes during Ischemia. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)* 2015;8:474–482.
194. Verlinde M, Hollmann MW, Stevens MF, Hermanns H, Werdehausen R, Lirk P. Local Anesthetic-Induced Neurotoxicity. *International journal of molecular sciences* 2016;17:339.
195. Cohen P. The search for physiological substrates of MAP and SAP kinases in mammalian cells. *Trends Cell Biol* 1997;7:353–361.
196. Canman CE, Kastan MB. Signal transduction. Three paths to stress relief. *Nature* 1996;384:213–214.
197. Lirk P, Haller I, Myers RR, Klimaschewski L, Kau Y-C, Hung Y-C, et al. Mitigation of direct neurotoxic effects of lidocaine and amitriptyline by inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in vitro and in vivo. *Anesthesiology* 2006;104:1266–1273.
198. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 2007;129:1261–1274.
199. Ma R, Wang X, Lu C, Li C, Cheng Y, Ding G, et al. Dexamethasone attenuated bupivacaine-induced neuron injury in vitro through a threonine-serine protein kinase B-dependent mechanism. *Neuroscience* 2010;167:329–342.
200. Lirk P, Haller I, Colvin HP, Frauscher S, Kirchmair L, Gerner P, et al. In vitro, lidocaine-induced axonal injury is prevented by peripheral inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase, but not by inhibiting caspase activity. *Anesth Analg* 2007;105:1657-64, table of contents.

201. Li R, Ma H, Zhang X, Li C, Xiong J, Lu T, et al. Impaired autophagosome clearance contributes to local anesthetic bupivacaine-induced myotoxicity in mouse myoblasts. *Anesthesiology* 2015;122:595–605.

9 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
>	größer als
°C	Grad Celsius
μM	Micromolar
AiF	Apoptose-induzierender Faktor
Apaf-1	Apoptotic protease activating factor 1
Aqua dest.	destilliertes Aqua
ATP	Adenosintriphosphat
BAK	Bcl-2 antagonist or killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell-lymphoma 2
BHCl	Bupivacain-Hydrochlorid
Ca ²⁺	Calcium
ca.	Cirka
CEE	Chicken Embryonal Extract
CsA	Cyclosporin A
cyt c	Cytochrom c
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FADD	Fas-Associated Protein with Death Domain
FKS	Fetales Kälberserum
GRP75	Glucose-Regulated-Protein 75
H	Stunde
HCl	Salzsäure
HS	Horse Serum
iMAC	Mitochondrial Apoptotic Inhibitor
IMM	Inner Mitochondrial Membrane
IP3R	Inositol-Triphosphat-Rezeptor
kDa	Kilodalton
MAC	Mitochondrial Apoptosis-induced Channel
MAM	Mitochondrien-assoziierte ER-Membran
MCU	Mitochondrial Ca ²⁺ -Uniporter
mHCX	Mitochondrial H ⁺ /Ca ²⁺ -Exchanger
Min	Minute
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mNCX	Mitochondrial Na ⁺ /Ca ²⁺ -Exchanger
mOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
mPTP	Mitochondrial Permeability Transition Pore
mV	Millivolt
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid

NaOH	Natriumhydroxid
o.g.	Oben genannt
OMM	Outer Mitochondrial Membrane
PBS	Phosphate Buffered Saline
pM-Zellen	Primäre Mausmuskelzellen
Ppm	Parts per million
ROS	Reactive Oxygen Species
RyR	Ryanodinrezeptor
s.	Siehe
s.u.	Siehe unten
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	Unter anderem
VADC	Voltage Dependet Anionen Channel
z.B.	Zum Beispiel

10 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1. Strukturchemischer Aufbau der Lokalanästhetika am Beispiel des Lokalanästhetikums Lidocain.....	2
Abbildung 1-2. Strukturformel des Lokalanästhetikums Bupivacain.	6
Abbildung 1-3. Vereinfachte Darstellung der mitochondrialen Apoptosekaskade (eigene Darstellung).	10
Abbildung 1-4. Schematische Darstellung des Ca^{2+} -Ionenstoffwechsels des Mitochondriums (eigene Darstellung).	14
Abbildung 1-5. Vereinfachte, schematische Darstellung der mOMP und des intrinsischen Apoptosewegs (eigene Darstellung).	16
Abbildung 4-1. Zellkulturen in Proliferationsphase unter dem Lichtmikroskop; A: vereinzelte C2C12-Zellen, B: vereinzelte primäre Mausmuskelzellen (400-fache Vergrößerung).	23
Abbildung 4-2. Konfluente C2C12-Zellen am Tag des Versuchsbeginns (200-fache Vergrößerung).	24
Abbildung 4-3. Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls der Vor- und Hauptversuche.	29
Abbildung 4-4. Auswertung der Durchflusszytometrie mittels FlowJow [®] am Beispiel von C2C12-Zellen bei Bupivacain 1750 ppm zum Inkubationszeitpunkt 0 mit CsA = 0 μM ...	35
Abbildung 5-1. Mikroskopische Betrachtung der Zellkulturen am Beispiel von C2C12-Zellen unter 1350 ppm Bupivacain (200-fache Vergrößerung).	37
Abbildung 5-2. Anteil Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und anschließender 24-stündiger Inkubationszeit in Proliferationsmedium.	38
Abbildung 5-3. Anteil Annexin ⁺ -Zellen an Gesamtpopulation bei pM-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und anschließender 24-stündiger Inkubationszeit in Proliferationsmedium.	40
Abbildung 5-4. Einfluss von DMSO den Anteil Annexin ⁺ -Zellen bei C2C12- und pM-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit DMSO und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium. A, B: bei C2C12-Zellen, C, D: bei pM-Zellen	42
Abbildung 5-5. Anteil Annexin ⁺ -Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und CsA (ohne Präinkubationszeit) und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.	43

Abbildung 6-1. Schematische Darstellung relevanter intrazellulärer Signalwege der Lokalanästhetika-induzierten Toxizität anhand der Neurotoxizität [1]..... 60

11 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1. Tabelle wichtiger Eigenschaften gebräuchlicher Lokalanästhetika (abgeändert nach Stüber und Dullendorf [7].....	3
Tabelle 4-1. Verdünnungsreihe der Bupivacain-Lösungen des Vorversuchs.	27
Tabelle 4-2. Verdünnungsreihe der Bupivacain-Lösungen des Hauptversuchs.....	30
Tabelle 4-3. Schema zur Herstellung der Cyclosporin A-Lösungen.....	31
Tabelle 4-4. Schema zur Herstellung der iMAC-Lösungen.	32
Tabelle 4-5. Schema zur Herstellung der Ru360-Lösungen.....	32
Tabelle 5-1. Anteile PI ⁺ /Annexin ⁻ - und PI ⁻ /Annexin ⁻ -Zellen an Gesamtpopulation bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und anschließender 24-stündiger Inkubationszeit in Proliferationsmedium.	39
Tabelle 5-2. Anteil PI ⁺ /Annexin ⁻ - und PI ⁻ / Annexin ⁻ - Zellen an Gesamtpopulation bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und anschließender 24-stündiger Inkubationszeit in Proliferationsmedium.	41
Tabelle 5-3. Anteil PI ⁻ /Annexin ⁻ -Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und CsA (ohne Präinkubation) und 24-stündiger Inkubation mit Proliferationsmedium.	44
Tabelle 5-4. Annexin ⁺ -Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und CsA und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.	45
Tabelle 5-5. Annexin ⁺ -Zellen bei pM-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und CsA und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.	46
Tabelle 5-6. Annexin ⁺ -Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und iMAC und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.	48
Tabelle 5-7. Annexin ⁺ -Zellen bei pM-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und iMAC und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.	49
Tabelle 5-8. Annexin ⁺ -Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und Ru360 und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.....	51
Tabelle 5-9. Annexin ⁺ -Zellen bei pM-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und Ru360 und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.	52
Tabelle 5-10. PI ⁺ /Annexin ⁻ -Zellen bei C2C12-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit Bupivacain und Ru360 und 24-stündiger Inkubation in Proliferationsmedium.....	53

12 Anhang

12.1 Danksagung

Mein Dank gilt PD Dr. med. Thomas Metterlein, der mir diese Arbeit ermöglichte. Ebenso möchte ich Prof. Dr. med. Bernhard M. Graf, MSc danken. Auch möchte ich herzlich bei Dr. med. Christoph Plank für seine wertvolle Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit bedanken. Ganz herzlich möchte ich auch dem Laborteam der Anästhesie unter der Leitung von Dr. rer. nat. Michael Gruber danken.

Ich danke im Besonderen meinen Eltern und meiner Familie für Ihre unermüdliche Unterstützung, nicht nur bei dieser Arbeit, und die Ermöglichung meines Medizinstudiums. Zuletzt möchte ich mich bei Tobias Roider bedanken, ohne den das alles nicht möglich gewesen wäre.

12.2 Ergänzende Angaben

Teile der vorliegenden Arbeit wurden 2013 im Rahmen des Hauptstatkongresses der Anästhesiologie und Intensivtherapie, Berlin anhand einer Posterpräsentation mit dem Titel: „Myotoxizität von Bupivacain in vitro – ambivalente Effekte von Cyclosporin A auf die Apoptoseinduktion“ präsentiert.

12.3 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides Statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- beziehungsweise Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich versichere an Eides Statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Heidelberg, 06.11.2017

Unterschrift