

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Wirkung von Simvastatin allein und in Kombination mit  
Daptomycin auf L6-Zellen *in vitro***

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Tuyet-Vi Sylvie Picker-Minh

aus Berlin

Datum der Promotion: 27.02.15

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>iv</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>5</b>
1.1 Myopathie und Rhabdomyolyse .....	5
1.2 Statine .....	7
1.2.1 Allgemeines .....	7
1.2.2 Struktur von Simvastatin .....	7
1.2.3 Pharmakokinetik von Simvastatin .....	8
1.2.4 Wirkmechanismus von Simvastatin.....	8
1.2.5 Pleiotrope Wirkung von Simvastatin.....	10
1.2.6 Klinische Bedeutung der Statine .....	11
1.2.7 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen.....	12
1.2.8 Mechanismus der Statin-assoziierten Muskeltoxizität .....	13
1.3 Daptomycin .....	15
1.3.1 Allgemeines .....	15
1.3.2 Struktur von Daptomycin.....	15
1.3.3 Wirkmechanismus und antibakterielles Spektrum.....	15
1.3.4 Pharmakokinetik.....	16
1.3.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen.....	16
1.4 L6-Zellen .....	18
1.5 Fragestellung.....	18
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.1 Apparative Ausstattung .....	20
2.2 Chemikalien.....	21
2.2.1 Kulturmedien und Pufferlösungen .....	21
2.2.2 Antikörper für die Immunhistochemie.....	22
2.2.3 Enzyme .....	22
2.2.4 Farbstoffe .....	22
2.3 Testsubstanzen (Simvastatin und Daptomycin) .....	22
2.3.1 Simvastatin, Kat. Nr.: 430-104-M050 (Fa. Alexis Biochemicals, San Diego, USA) .....	22
2.3.2 Daptomycin, Cubicin <sup>®</sup> , Novartis .....	23

2.4 Zelllinie L6 .....	23
2.5 Zellkultivierung .....	23
2.5.1 Ansatz und Supplementierung des Kulturmediums für die L6-Zellen.....	23
2.5.2 Zelldifferenzierung.....	24
2.6 Subkultivierung („Passagierung“) der Zellen .....	24
2.6.1 Prinzip der Subkultivierung .....	24
2.6.2 Durchführung der Subkultivierung.....	24
2.7 Kryokonservierung der Zelllinie .....	25
2.7.1 Durchführung der Kryokonservierung .....	25
2.7.2 Auftauen der kryokonservierten Zellen.....	26
2.8 Bestimmung der Zellzahl .....	26
2.8.1 Prinzip der Zellzahlbestimmung .....	26
2.8.2 Durchführung der Zellzahlbestimmung .....	26
2.9 Sterile Versuchsbedingungen.....	26
2.10 Lichtmikroskopie.....	27
2.10.1 Färbereagenzien .....	27
2.10.2 Probenvorbereitung für die Lichtmikroskopie .....	27
2.11 Zytotoxizitäts-Analyse .....	28
2.11.1 Prinzip des MTT-Zytotoxizitätstest .....	28
2.11.2 MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid.....	28
2.11.3 Herstellung der Lösungen .....	28
2.11.4 Versuchsdurchführung .....	29
2.11.5 Prinzip der Datenauswertung.....	31
2.12 Durchflusszytometrie .....	31
2.12.1 Durchflusszytometrische Untersuchung der Apoptose/Nekrose von L6-Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumiodidfärbung .....	32
2.12.2 Durchflusszytometrische Messung der Zellproliferation mit CFSE Farbstoff	35
2.13 Immunhistochemie .....	37
2.13.1 Prinzip der Immunhistochemie .....	37
2.13.2 Fixierung der Zellen durch Cytospin.....	37
2.13.3 Immunhistochemie .....	38
2.13.4 Fotografie und semiquantitative Auswertung .....	38
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>40</b>
3.1 Lichtmikroskopische Untersuchung der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Myozyten.....	40
3.1.1 Native Lichtmikroskopie ohne Färbung der Zellen .....	40

3.1.2 Lichtmikroskopie nach Färbung mit Hoechst 33258 (Bisbenzimid H 33258) und Propidiumiodid .....	41
3.2 Untersuchung der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Myozyten im MTT-Zytotoxizitätstest .....	46
3.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität der Infusionslösungen .....	46
3.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf die Apoptose/Nekrose-Reaktion von L6-Myozyten mit Annexin V und Propidiumiodid .....	51
3.4. Durchflusszytometrische Untersuchung der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf die Proliferation von L6-Myoblasten mit CFSE-Farbstoff .....	57
3.4 Immunhistologische Untersuchungen der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Zellen .....	59
3.4 Immunhistologische Untersuchungen der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Zellen .....	59
3.4.1. Rho-Protein .....	59
3.4.2 Caspase 3 .....	62
3.4.3. Vimentin .....	64
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>67</b>
4.1 Statin-induzierte Effekte auf Muskelzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	69
4.2 Daptomycin-induzierte Effekte auf Muskelzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	75
4.3 Effekte auf Muskelzellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> durch Kombination von Simvastatin und Daptomycin .....	80
4.4 Ausblick .....	83
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>95</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>98</b>
<b>Lebenslauf.....</b>	<b>99</b>
<b>Publikationen und Vorträge.....</b>	<b>100</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>102</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Univariate Varianzanalyse
ANV	Akutes Nierenversagen
ALT	Alanin-Aminotransferase
AST	Aspartat-Aminotransferase
ASP	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
$C_{\max}$	Maximalkonzentration
CFSE	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
Coenzym Q10	Ubichinon
CPK	Creatinphosphokinase
CRP	C-reaktives Protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
$EC_{50}$	50% effect concentration, mittlere effektive Konzentration
FPP	Farnesylpyrophosphat
FSC	forward scatter
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	Guaninnucleotidbindendes Protein
HDL	high-density Lipoprotein
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	low-density Lipoprotein
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

MeGlu	methylierter Glutaminsäurerest
MRSA	Methicillin-resistente Staphylokokken
MW	Mittelwert
NOEC	no observed effect concentration
OATP1	organic anion-transporting polypeptide 1
PI	Propidiumiodid
Ras-Protein	GTP-bindendes Protein, kleines G-Protein
Rho-Protein	Ras homologue, GTP-bindendes Protein, kleines G-Protein
SD	Standardabweichung
SSC	side scatter
VLDL	very-low-density Lipoprotein
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
4S	Scandinavian Simvastatin Survival Study

### Zusammenfassung

Statine inhibieren die Cholesterolsynthese und sind die Medikamentengruppe der ersten Wahl für die Behandlung einer Hypercholesterinämie. Fallberichte suggerieren eine verstärkte Muskelschädigung durch eine Kombination von Statinen mit dem Antibiotikum Daptomycin, welches bei Infektionen durch grampositive Erreger, einschließlich MRSA und VRE, eingesetzt wird.

Bislang existieren kaum Daten bezüglich einer gemeinsamen Wirkung von Statinen und Daptomycin auf das Muskelgewebe. In der vorliegenden In-vitro-Arbeit wurde daher modellhaft die alleinige und kombinierte Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf die Zellmorphologie, die Expression intrazellulärer Proteine und die Apoptose/Nekrose von murinen L6-Myozyten und auf die Proliferation von L6-Myoblasten analysiert.

Lichtmikroskopische Untersuchungen der L6-Myozyten mit Bisbenzimid H33258 und Propidiumiodid zeigten nach 72-stündiger Exposition gegenüber 10 µM Simvastatin (ca. 4,2 mg/l Medium) und/oder 300 mg Daptomycin/l Medium einen Verlust der Zelladhärenz und eine Karyo- und Zytolyse. Die Ergebnisse wiesen auf einen toxischen Effekt von Simvastatin und Daptomycin allein und auf eine verstärkte Zytotoxizität durch die Kombination beider Substanzen hin. Die zellschädigende Wirkung von Simvastatin und Daptomycin wurde durchflusszytometrisch mit Annexin V-FITC und Propidiumiodid-Färbung und im MTT-Zytotoxizitätstest bestätigt und konnte zusammenfassend als zeit- und konzentrationsabhängig charakterisiert werden. Eine Zytotoxizität wurde nach zehntägiger Exposition für therapeutische Konzentrationen beider Substanzen gezeigt. Ein additiver bis synergistischer Effekt mit Simvastatin bestand erst in einer supratherapeutischen Dosierung von 300 mg Daptomycin/l Medium.

Ein Anstieg der Caspase 3 in L6-Myozyten wurde immunhistochemisch nach 24-stündiger Exposition mit Simvastatin und/oder Daptomycin in keiner Versuchsreihe nachgewiesen. Simvastatin führte aber ab einer Konzentration von 1 µM nach 24-stündiger Exposition zu einer reduzierten Expression des kleinen G-Proteins Rho und des Zytoskelettproteins Vimentin in L6-Myozyten. Dies suggeriert übereinstimmend mit In-vitro-Arbeiten weiterer Autoren eine Dysprenylierung und eine Veränderung des Zytoskeletts als pathophysiologische Elemente der Muskelschädigung. Daptomycin allein und in Kombination mit Simvastatin hatte keine (zusätzliche) Wirkung. Dies

könnte auf einen alternativen Mechanismus der Muskelschädigung durch Daptomycin hinweisen.

Für L6-Myoblasten wurde eine Proliferationshemmung durch 10  $\mu$ M Simvastatin durchflusszytometrisch mit CFSE-Färbung identifiziert. Daptomycin in einer maximalen Konzentration von 300 mg/l Medium zeigte keine antiproliferative Wirkung und keinen adjuvanten Effekt in Kombination mit Simvastatin.

Zusammenfassend wurde in dieser In-vitro-Arbeit ein zytotoxischer Effekt für Simvastatin und Daptomycin allein und eine additive bis synergistische Zytotoxizität für die Kombination beider Substanzen identifiziert. Letztere bestand für Kombinationen mit Daptomycin in supratherapeutischen Dosierungen. Die Arbeit lieferte Hinweise darauf, dass der Zellschädigung jeweils unterschiedliche Mechanismen zugrundeliegen. Ein weitergehendes Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge der Muskelschädigung könnte dazu beitragen, das Risikoprofil besser zu charakterisieren und Ansatzpunkte für eine ursächliche Therapie zu identifizieren.



## Abstract

Statins inhibit the endogenous cholesterol synthesis and are the first-line treatment for hypercholesterolaemia. Case reports suggest an enhanced myotoxicity of statins in combination with daptomycin, an antibiotic used for the treatment of gram-positive bacteria including MRSA and VRE.

Data regarding the combined effects of statins and daptomycin on muscle cells are rare. This *in vitro* study examined the sole and common effect of simvastatin and daptomycin on cell morphology, intracellular protein expression, apoptosis/necrosis and proliferation of murine L6 myoblasts or myocytes respectively.

Microscopic analysis with bisbenzimidazole H33258 and propidium iodide after 72 h of exposure with 10  $\mu$ M simvastatin (= 4.2 mg/l) and/or 300 mg daptomycin/l medium revealed loss of cell adherence and karyo- and cytolysis of L6 myocytes. The results indicated a cytotoxicity of simvastatin and daptomycin alone, which was augmented by combination of both substances. Flow cytometry analysis with Annexin V-FITC and propidium iodide and MTT assay confirmed a concentration- and time-dependent cytotoxicity of both agents. After 10 days of exposure therapeutic concentrations of each substance elicited a cytopathic effect. An additive or mildly synergistic effect in combination with simvastatin was identified at supratherapeutic doses of 300 mg daptomycin/l medium.

Caspase 3 elevation was not detected with immunohistochemical staining after 24 h of incubation with simvastatin and/or daptomycin. However, simvastatin at a minimal concentration of 1  $\mu$ M reduced the expression of the small G-protein Rho and the cytoskeletal protein vimentin. Consistent with other *in vitro* studies, these results suggest dysprenylation and cytoskeletal disruption as pathogenetic elements of simvastatin myotoxicity. Daptomycin alone or combined with simvastatin showed no (additional) effect, implying that daptomycin may elicit a different pathomechanism.

In L6 myoblasts, simvastatin at a concentration of 10  $\mu$ M impaired proliferation after 24 h of exposure. Daptomycin alone did not exert an antiproliferative effect and had no additional influence in combination with simvastatin.

In summary, a cytotoxic effect of simvastatin and daptomycin alone and an additive or mildly synergistic cytotoxicity by combination of both substances were identified.

Augmented toxicity was demonstrated for combinations of simvastatin at therapeutic concentrations and daptomycin at dosages above the therapeutic range. This study implicated different underlying pathomechanisms of myopathy for simvastatin and daptomycin. Further understanding of the pathophysiologic mechanisms may improve risk evaluation and help to establish a therapeutic approach for the treatment of medication-induced myopathy.

## 1. Einleitung

### 1.1 Myopathie und Rhabdomyolyse

Das Skelett- und das Herzmuskelgewebe des Menschen zeigen eine lichtmikroskopisch nachweisbare, periodische Querstreifung und werden daher als quergestreifte Muskulatur bezeichnet. Erkrankungen der Muskulatur, die nicht neurogenen Ursprungs sind, werden unter dem Begriff der Myopathie (altgriechisch „mys“ - Muskel, „pathos“ - Leiden) zusammengefasst.

Einige Myopathien sind mit einer Rhabdomyolyse, d.h. einer Desintegration und Lyse quergestreifter Muskulatur, assoziiert (Keltz et al., 2013). Die Lyse des Muskelgewebes und die resultierende Freisetzung intrazellulärer Bestandteile der Myozyten, wie z.B. der Creatinphosphokinase (CPK), der Laktatdehydrogenase (LDH), des Myoglobins, der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Alanin-Aminotransferase (ALT) in die extrazelluläre Flüssigkeit und den Blutkreislauf kann unterschiedliche Auswirkungen haben.

Bei einem Teil der Betroffenen ist die Muskelschädigung asymptomatisch und verbleibt unbemerkt. Charakteristische, aber unspezifische Zeichen einer Myopathie sind Muskelschmerzen und eine muskuläre Schwäche. Ist die Atemhilfsmuskulatur in ausgeprägtem Maße von der Muskelschädigung betroffen, kann eine akute Ateminsuffizienz des Patienten resultieren. Potentiell lebensbedrohliche Komplikationen einer ausgeprägten Rhabdomyolyse entstehen außerdem durch eine hohe Freisetzung intrazellulärer Bestandteile der Muskelzellen, wie z.B. Kalium, Sulfat, Phosphat und Myoglobin. Dies kann zu einer metabolischen Azidose, zu Herzrhythmusstörungen durch eine Hyperkaliämie, zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung durch eine pathologische Aktivierung des Gerinnungssystems und zu einem akuten Nierenversagen durch Obstruktion von Nierentubuli mit Myoglobin führen. Das myoglobinurische Nierenversagen tritt bei ca. 16% der Patienten mit einer Rhabdomyolyse auf (Ward, 1988) und ist mit einer hohen Mortalität von 7 - 80% assoziiert (Brivet et al., 1996). Weitere Komplikationen einer ausgeprägten Muskelschädigung resultieren durch einen raschen Einstrom extrazellulärer Flüssigkeit in das lysierte Muskelgewebe, der zu einem hypocalciämischen oder einem hypovolämischen Schock führen kann.

Klinische Symptome einer Rhabdomyolyse und mögliche Komplikationen
<ul style="list-style-type: none"><li>▶ Myalgie und Muskelschwäche</li><li>▶ Akutes respiratorisches Versagen</li><li>▶ Akutes Nierenversagen (ANV)</li><li>▶ Disseminierte intravasale Gerinnung</li><li>▶ Metabolische Azidose</li><li>▶ Hyperkaliämie</li><li>▶ Hyperphosphatämie</li><li>▶ Herzrhythmusstörungen</li></ul>

**Tab. 1:** Klinische Symptome einer Rhabdomyolyse

Der sensitivste, laborchemische Parameter für die Diagnose einer Rhabdomyolyse ist eine erhöhte Creatinphosphokinase-Konzentration im Serum. Eine Serumkonzentration > 5000 U/l ist als Zeichen einer schwerwiegenden Muskelschädigung zu werten (Huerta-Alardín et al., 2005). Charakteristischerweise findet sich eine Erhöhung der Creatinphosphokinase auf über das Zehnfache des oberen Normwertes (Bellosta et al., 2012). Der CPK-Referenzwert für einen weiblichen Erwachsenen ist  $\leq 145$  U/l und für einen männlichen Erwachsenen  $\leq 170$  U/l gemäß der International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Weitere diagnostische Hinweise einer ausgeprägten Rhabdomyolyse sind eine Myoglobinämie und Myoglobinurie, eine Hyperkaliämie, Hyperphosphatämie, eine Hyperurikämie und eine erhöhte Serum-Kreatinin-Konzentration im Rahmen einer renalen Mitbeteiligung.

Eine Einteilungsmöglichkeit der verschiedenen Myopathien richtet sich nach der Pathogenese der Muskelschädigung. Es wird zwischen primären Myopathien, zu denen kongenitale Muskelerkrankungen wie z.B. Muskeldystrophien und mitochondriale Myopathien zu zählen sind, und sekundären Myopathien differenziert. Die sekundären Myopathien gliedern sich in Myopathien im Rahmen systemischer Erkrankungen und Myopathien mechanischen, toxischen und Medikamenten-induzierten Ursprungs. Bei den sekundären Myopathien lassen sich physikalische und nicht-physikalische Ursachen der Muskelschädigung unterscheiden. Als häufige physikalische Ursachen sind Traumata und Kompressionssyndrome zu nennen, relevante nicht-physikalische

Ursachen sind systemische Erkrankungen wie Stoffwechselstörungen, autoimmunologische und endokrinologische Erkrankungen sowie Toxine und Medikamente.

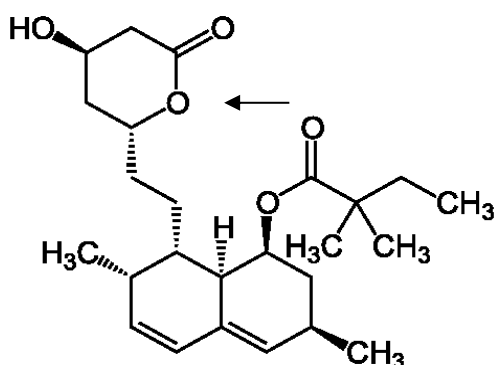
Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, das myotoxische Potential der Medikamente Simvastatin und Daptomycin bei alleiniger und kombinierter Gabe zu eruieren. Dazu wird die Wirkung der beiden Substanzen auf eine Muskelzelllinie *in vitro* bei alleiniger und kombinierter Exposition untersucht.

## 1.2 Statine

### 1.2.1 Allgemeines

Statine sind kompetitive Inhibitoren des Enzyms, 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase ( $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase), die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterinsynthese von  $\beta$ -HMG-CoA zu Mevalonat katalysiert. Durch diese Eigenschaft hemmen sie die Cholesterin-Biosynthese und sind weltweit die Medikamentengruppe der 1. Wahl für die Therapie einer Hypercholesterinämie. Aktuell sind sieben verschiedene Statine zur Therapie zugelassen. Es existieren lipophile Statine, wie z.B. Simvastatin und Atorvastatin, und hydrophile Statine, wie z.B. Pravastatin und Rosuvastatin. Im Folgenden sollen die Eigenschaften von Simvastatin etwas detaillierter beschrieben werden.

### 1.2.2 Struktur von Simvastatin



**Abb. 1:** Strukturformel von Simvastatin.

Simvastatin liegt als inaktive Laktoneform vor und wird *in vivo* zur pharmakologisch wirksamen Säureform hydrolysiert. Der schwarze Pfeil markiert die Laktongruppe, d.h. die Esterbindung zwischen der Hydroxyl- und der Carboxylgruppe.

### 1.2.3 Pharmakokinetik von Simvastatin

Simvastatin wird als pharmakologisch inaktives Lacton-Pro-Drug aus dem Gastrointestinaltrakt mit einer Absorptionsrate von ca. 60% resorbiert und durch verschiedene hepatische Transportproteine, hauptsächlich OATP1 (organic anion-transporting polypeptide 1), in die Leber aufgenommen. Die Metabolisierung von Simvastatin erfolgt durch das hepatische Enzym Cytochrom P450, vorwiegend durch das Isoenzym CYP3A4, unter Bildung verschiedener Metabolite. Simvastatin unterliegt einem hohen First-Pass-Effekt in der Leber. Die Bioverfügbarkeit der Substanz beträgt nur ca. 5%; im Plasma ist Simvastatin zu ca. 94-98% an Proteine gebunden (Bellosta et al., 2012; Todd et al., 1990). Die Spitzenkonzentration von Simvastatin im Plasma wird nach ca. 1,3 bis 2,4 Stunden erreicht (Bellosta et al., 2012), die Halbwertszeit der aktiven Metabolite beträgt ca. 1,9 Stunden (Williams et al., 2002). Die Simvastatin-Metabolite werden größtenteils über die Gallenflüssigkeit ausgeschieden, jedoch werden ca. 10 - 15% der Metabolite renal wieder resorbiert (Vickers et al., 1990).

*In vitro* ist eine spontane, nahezu vollständige Umwandlung der Lacton- in die offene Säureform des Simvastatins innerhalb von 24 Stunden in Serum-haltigem Zellkulturmedium beschrieben (Masters et al., 1995).

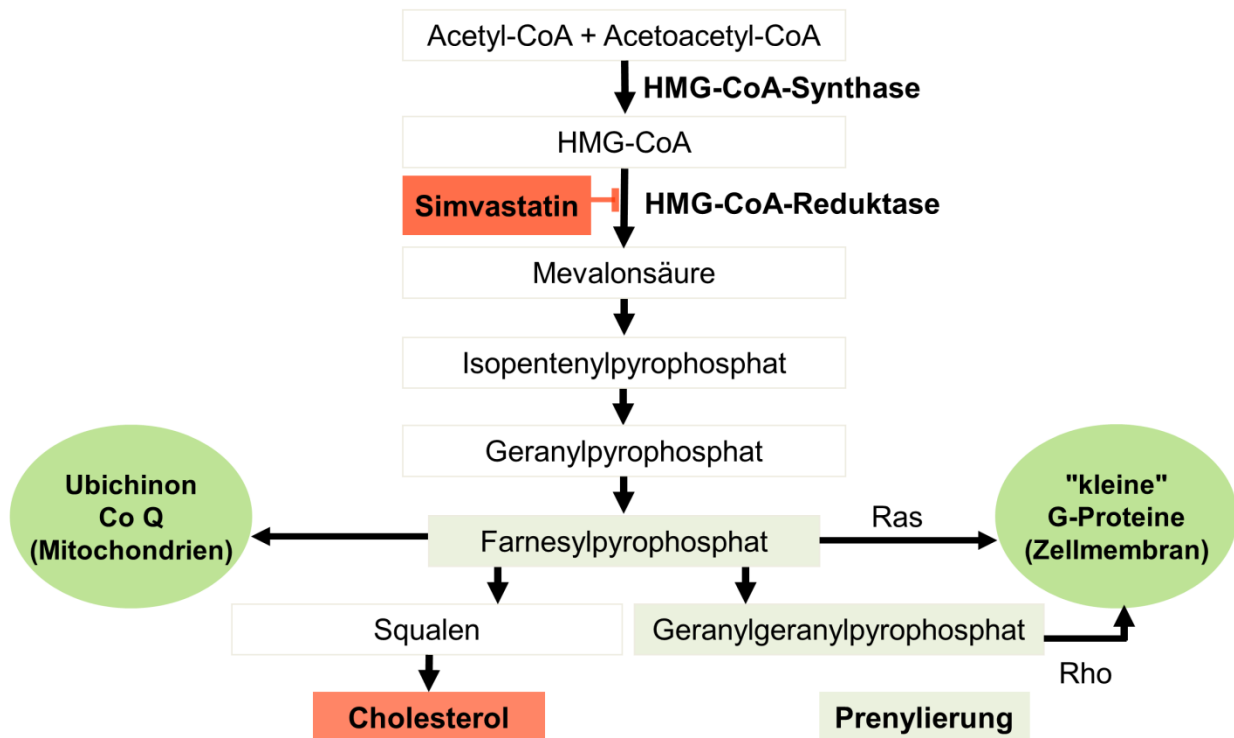
### 1.2.4 Wirkmechanismus von Simvastatin

Die aktiven Metabolite des Simvastatins inhibieren kompetitiv die  $\beta$ -HMG-CoA-Reduktase, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterolsynthese von  $\beta$ -Hydroxy- $\beta$ -Methylglutaryl-Coenzym-A (HMG-CoA) zu Mevalonat katalysiert (Abb. 2). Statine besitzen eine ca. dreifach höhere Affinität zu dem Enzym als das natürliche Substrat und reduzieren die Cholesterolsynthese - in Abhängigkeit von der Dosis und dem jeweiligen Statin - um ca. 10 - 60% (Istvan et al., 2001; Moghadasian, 1999).

Über einen weiteren Regulationsmechanismus verstärken Statine außerdem die Elimination des Cholesterols aus dem Plasma. Im Plasma ist Cholesterin an drei verschiedene Lipoproteine gebunden: das low-density Lipoprotein (LDL), das very-low-density Lipoprotein (VLDL) und das high-density Lipoprotein (HDL). Nahezu alle Zellen des Menschen exprimieren LDL-Rezeptoren, die das LDL-gebundene Cholesterin binden und durch Endocytose aufnehmen können. Da Statine die Cholesterolsynthese inhibieren und so einen intrazellulären Mangel von Cholesterin bewirken, kommt es

gegenregulatorisch zu einer erhöhten Transkription und Expression von LDL-Rezeptoren und folglich zu einer verstärkten Aufnahme von Cholesterol aus dem Plasma in die Zellen. Durch diesen Mechanismus ergibt sich eine weitere Senkung der Cholesterolkonzentration im Serum.

Neben der Cholesterol-senkenden Wirkung verringern Statine auch die Synthese weiterer nachfolgender Produkte des Substrates Mevalonat, wie der Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), und des Ubichinons (Abb. 2). Ubichinon (Coenzym Q10) ist ein Element der mitochondrialen Atmungskette eukaryoter Zellen, bei der durch oxidative Phosphorylierung Energie in Form von Adenosintri-phosphat (ATP) produziert wird. Die Isoprenoide FPP und GGPP werden in einer als Prenylierung bezeichneten Reaktion kovalent an kleine G-Proteine gebunden und vermitteln deren Bindung an die Zellmembran. Die Prenylierung ist entscheidend für die Funktion kleiner G-Proteine (GTPasen), wie zum Beispiel der Ras GTPase und der Rho GTPase, die als molekulare Schalter intrazellulärer Signalkaskaden fungieren. Die kleinen GTPasen erfüllen vielfältige Funktionen im menschlichen Organismus. Ras GTPasen spielen unter anderem eine Rolle in der Regulation der Zellapoptose und Zellproliferation, Rho-Proteine sind an der Zytoskelettbildung und Zelladhäsion beteiligt (Sathasivam, 2012). Die verminderte Produktion von Isoprenoiden durch Statine hat vielfältige Auswirkungen, die teilweise als ursächlich für die pleiotrope Wirkung von Statinen gesehen wird. Diese sind nachfolgend detaillierter beschrieben.



**Abb. 2:** Cholesterolsynthese und ihre Hemmung durch Simvastatin.

Simvastatin hemmt kompetitiv die HMG-CoA-Reduktase und reduziert so die Synthese von Cholesterol. Außerdem verringert Simvastatin auch die Bildung von Ubichinon, einem Element der mitochondrialen Atmungskette, und von Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat, zwei Isoprenoide, die die Bindung von Proteinen an die Zellmembran vermitteln. Die kovalente Bindung der Isoprenoide an die Proteine wird als Prenylierung der Proteine bezeichnet. Zwei wichtige Gruppen prenylierter Proteine sind die Ras- und die Rho-Proteine. Sie gehören zu den kleinen GTPasen (kleine G-Proteine), die Signaltransduktionsketten in vielen verschiedenen Zellen regulieren.

### 1.2.5 Pleiotrope Wirkung von Simvastatin

Unabhängig von ihrer lipidsenkenden Wirkung zeigen Statine weitere Eigenschaften, die als pleiotrope Effekte der Statine zusammengefasst werden und eine positive Wirkung in der Behandlung verschiedener Krankheitsbilder haben. Sie beruhen unter anderem auf einer Hemmung inflammatorischer oder oxidativer Prozesse in Endothelzellen, einer Stimulation der Stickstoffmonoxid-Synthese in Gefäßendothelzellen, einer Reduktion der Thrombozytenaggregation und einer Proliferationshemmung glatter Muskelzellen (Endres, 2005; Liao, 2002; Zhou et al., 2010). In einer großen Observationsstudie beim Menschen spiegelte sich die antiinflammatorische Wirkung von Statinen in der Reduktion eines Entzündungsmarkers, des C-reaktiven Proteins (CRP), im Serum der Patienten wider (Ridker et al., 2008).



Die diversen pleiotropen Wirkungen der Statine sind nicht gänzlich verstanden und diesbezügliche Studienergebnisse teilweise widersprüchlich. Eine breitere Anwendung der Statine, basierend auf ihren pleiotropen Wirkungen, wird daher aktuell kontrovers diskutiert (Mansi et al., 2013). Mehrere Studien weisen aber auf eine positive Wirkung von Statinen in der Behandlung der Herzinsuffizienz, des Vorhofflimmerns, der Aortenstenose, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung, des Prostata- und des Kolonkarzinoms, des Schlaganfalls, der intrakraniellen Hämorrhagie, der Multiplen Sklerose sowie der Glomerulonephritis und der Osteoporose hin (Amarenco et al., 2009; Blamoun et al., 2008; Cleland et al., 2009; Hatzigeorgiou et al., 2005; Katz et al., 2010; Naval et al., 2008; Novaro et al., 2001; Ozsoy et al., 2005; Poynter et al., 2005; Vollmer et al., 2004; Young-Xu et al., 2003).

### **1.2.6 Klinische Bedeutung der Statine**

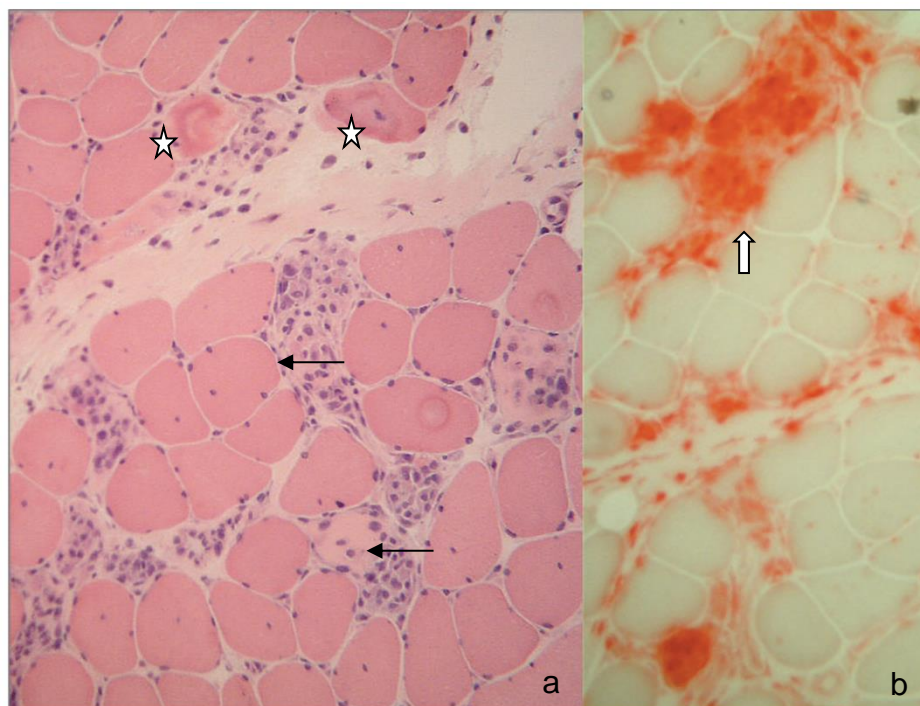
Statine sind die Medikamentengruppe der ersten Wahl für die Therapie der Hypercholesterinämie und es werden weltweit ca. 25 Millionen Patienten mit Statinen behandelt (Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults, 2001; Mitka, 2003). Sie haben einen hohen Stellenwert in der primären und sekundären Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen und schwerwiegender vaskulärer Ereignisse, wie der koronaren Herzerkrankung, des Myokardinfarktes und des ischämischen cerebralen Infarktes (Briel et al., 2004; Lardizabal et al., 2011; the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S), 1994). Ein günstiger Effekt in der Primärprävention kardiovaskulärer Ereignisse wurde sowohl für Patienten mit erhöhten LDL-Werten, als auch für Patienten mit Werten im durchschnittlichen Bereich gezeigt (Downs et al., 1998; Nakamura et al., 2006; Sever et al., 2003; Shepherd et al., 1995). Auch für die primäre Schlaganfallsprävention ergab sich in einer Metaanalyse von 65 Studien mit insgesamt 200.000 Patienten eine relative Risikoreduktion von 23 bis 25% durch Statine (Briel et al., 2004).

Die Risikominderung für große vaskuläre Ereignisse korreliert mit der Senkung des LDL-Spiegels. Eine Metaanalyse von 14 randomisierten Studien mit insgesamt ca. 90.000 Patienten zeigte, dass eine Reduktion der Serum-LDL-Konzentration um 1 mmol/l die Prävalenz vaskulärer Ereignisse um ca. 20% und die Koronar- und die Gesamtsterblichkeit um 20% bzw. 12% verminderte (Amarenco et al., 2009; Baigent et al., 2005). Im Gegensatz zu früheren Annahmen, verhält sich eine weitere Senkung des LDL-Spiegels auch unterhalb des früheren Zielwertes von 2,0 mmol/l proportional zur

Risikominderung. Für Patienten mit einem hohen kardiovaskulären Risiko wird daher aktuell eine Senkung unter 1,8 mmol/l empfohlen (Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH) Collaborative Group et al., 2010; Grundy, 2012).

### 1.2.7 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen

Die häufigste und schwerwiegendste Nebenwirkung der Statine ist eine Myopathie, deren Ausprägung von einer milden Myositis bis zu einer Rhabdomyolyse reichen kann. Histopathologisch betrachtet führen Statine zu einer nekrotisierenden Myopathie, welche die häufigste Manifestationsform einer exogen-toxischen Myopathie darstellt (Knop et al. 2004). Der mikroskopische Befund ist durch zahlreiche nekrotische Muskelfasern mit und ohne Phagozytose-Reaktion und durch de- und regenerierende Muskelfasern geprägt.



**Abb. 3:** Histologische Darstellung einer nekrotisierenden Myopathie mit Nachweis von entzündlichen Infiltraten. (a) Nach Färbung mit Hämatoxylin-Eosin zeigen sich entzündliche Infiltrate in der Muskulatur (schwarze Pfeile) sowie mehrere nekrotische Muskelfasern (Sterne). (b) Bei Färbung mit saurer Phosphatase zeigen sich deutlich die Bereiche mit verstärkter Makrophagen-Aktivität (weißer Pfeil) (modifiziert nach Knop et al. 2004).

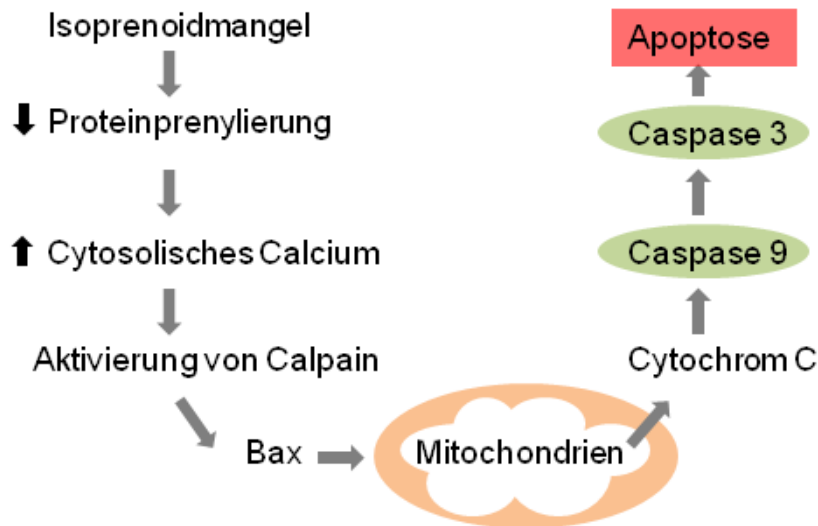
Diagnostisch findet sich bei einer Rhabdomyolyse charakteristischerweise eine mindestens zehnfache Erhöhung der Creatinphosphokinase (CPK) im Serum (Normwerte 45 bis 260 U/l) auf Werte über 10.000 U/l, ein erhöhtes Serumkreatinin sowie eine begleitende Myoglobinurie (Jamal et al., 2004). Im Allgemeinen ist eine CPK-Konzentration im Serum von über 5000 U/l als ein Indikator für eine schwerwiegende Muskelschädigung zu werten (Huerta-Alardín et al., 2005). Die Konzentrationskurve der Creatinphosphokinase im Serum zeigt einen charakteristischen Zeitverlauf, mit einem Anstieg innerhalb der ersten 12 Stunden nach Beginn der Muskelschädigung, einem Erreichen der Maximalwerte innerhalb von 1 bis 3 Tagen und einem Absinken innerhalb von 3 bis 5 Tagen nach Aussetzen der Noxe (Huerta-Alardín et al., 2005). Etwa 10 bis 50% der Patienten mit einer Rhabdomyolyse entwickeln ein akutes renales Versagen, das auf eine Freisetzung von Myoglobin mit konsekutiver Obstruktion der Nierentubuli zurückzuführen ist (Huerta-Alardín et al., 2005).

Weiterhin ist ein chronisches Myositis-Syndrom durch Statine mit einer Inzidenz von 0,1 bis 1% beschrieben. Es ist durch eine Myalgie, eine Muskelschwäche und histopathologische Zeichen einer Myopathie ohne eine Erhöhung der Creatinphosphokinase-Konzentration im Serum gekennzeichnet (Phillips et al., 2002). Als Risikofaktoren sind eine hohe Dosierung des Statins, ein erhöhtes Alter, ein weibliches Geschlecht, eine renale oder hepatische Insuffizienz, ein Diabetes mellitus oder Arzneimittelinteraktionen zu nennen.

### **1.2.8 Mechanismus der Statin-assoziierten Muskeltoxizität**

Der Pathomechanismus der Statin-induzierten Muskeltoxizität wird seit vielen Jahren kontrovers diskutiert. Es gibt verschiedene In-vitro-Studien, die auf einen Mangel an Isoprenoiden als Ursache der Statin-induzierten Apoptose von Skelettmuskelzellen und glatten Muskelzellen hinweisen (Gujjarro et al., 1998; Sacher et al., 2005; Vaklavas et al., 2009). Es wird vermutet, dass die Statin-induzierte Dysprenylierung von Proteinen über die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 eine Apoptosereaktion verursacht (Dirks et al., 2006; Johnson et al., 2004; Nakagawa et al., 1998; Sacher et al., 2005; Sathasivam, 2012). Sacher und Kollegen nahmen an, dass Statine eine intrinsische Apoptoseeinleitung verursachen (Sacher et al., 2005). Dieser Apoptosemechanismus umfasst die Calcium-vermittelte Aktivierung der cytosolischen Protease Calpain, die zur Translokation des proapoptotischen Proteins Bax in das Mitochondrium führt. Die

darauffolgende Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien löst über die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 die Apoptose aus (Abb. 4).



**Abb. 4:** Hypothetisches Schema der Statin-vermittelten Apoptose in Skelettmuskelzellen.

Statine verursachen eine verminderte Prenylierung bzw. eine Dysprenylierung von Proteinen. Dies führt über intrazelluläre Signalkaskaden zu einem Anstieg freier Calcium-Ionen im Cytosol, der die Protease Calpain aktiviert und die Translokation des proapoptotischen Proteins Bax in die Mitochondrien vermittelt. Die resultierende Freisetzung von Cytochrom C aktiviert die Caspasen 9 und 3 und leitet die Apoptose ein (modifiziert nach Dirks et al., 2006).

Eine alternative Theorie ist, dass die Dysprenylierung über eine gestörte intrazelluläre Signalkaskade einen Mangel an zellulären Wachstumsfaktoren verursacht und darüber den Zelltod vermittelt (Vaklavas et al., 2009).

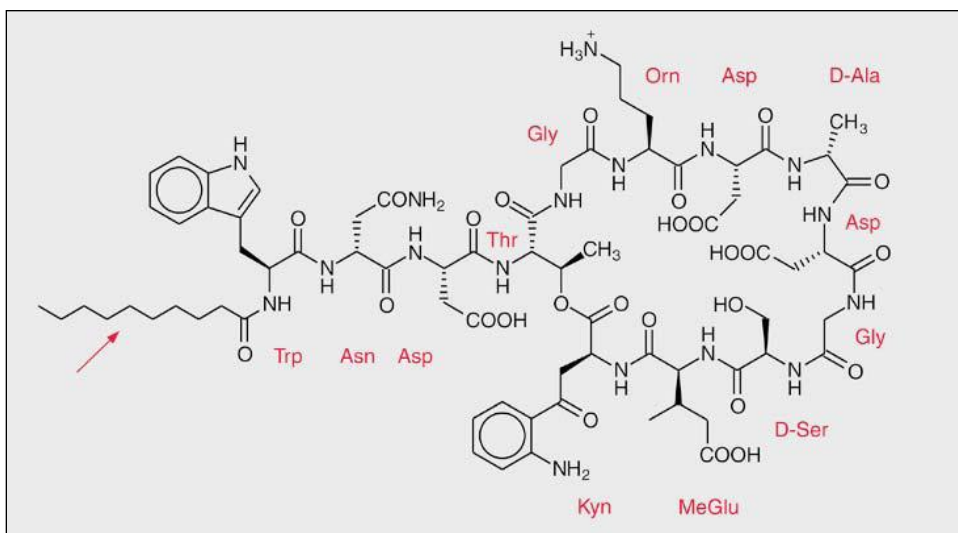
Weitere mögliche Ursachen der Statin-induzierten Myotoxizität, die kontrovers diskutiert werden, sind ein Mangel von Cholesterol in der Zellmembran, ein Mangel von Ubichinon (Coenzym Q 10), eine Dysregulation in der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase des Muskels sowie eine über autoimmunologische Mechanismen vermittelte Myotoxizität (Sathasivam, 2012).

## 1.3 Daptomycin

### 1.3.1 Allgemeines

Daptomycin (z.B. Cubicin® 350 mg oder 500 mg zur Herstellung einer Injektionslösung) ist ein Antibiotikum aus der Gruppe der zyklischen Lipopeptide. Es wirkt bakterizid gegenüber grampositiven Erregern, einschließlich Vancomycin- und Linezolid-resistenten Erregern und dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*. Daptomycin wird bei komplizierten Haut- und Weichteilinfektionen durch grampositive Erreger sowie bei Bakteriämie und Endokarditiden durch *Staphylococcus aureus* eingesetzt (Arbeit et al., 2004; Fowler et al., 2006).

### 1.3.2 Struktur von Daptomycin



**Abb. 5:** Strukturformel von Daptomycin.

Daptomycin ist ein zyklisches Lipopeptid aus 13 Aminosäuren und einer lipophilen Seitenkette mit einer Decansäure (Pfeil). Neben dem methylierten Glutaminsäurerest (MeGlu) verleihen drei Asparaginsäurereste (Asp) dem Molekül saure Eigenschaften. Diese Strukturanteile sind vermutlich für die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen und damit für die antibakterielle Aktivität von Daptomycin bedeutsam. Das N-terminale Ende ist mit einem n-Decanoylfettsäurerest verbunden (Pfeil). Dieser Bereich dringt in die Cytoplasmamembran der Bakterien ein und ist ebenfalls essentiell für die antibakterielle Wirkung (modifiziert nach Aktories et al., 2013).

### 1.3.3 Wirkmechanismus und antibakterielles Spektrum

Nach einer Calcium-Ionen-abhängigen Insertion der Daptomycin-Moleküle in das Zellinnere bindet Daptomycin irreversibel an die Bakterienzellmembran (Eisenstein, 2004) und bildet durch eine Oligopolymerisation mehrerer Daptomycinmoleküle

Transmembranporen. Der resultierende Kalium-Efflux aus der Bakterienzelle führt zu einer Depolarisation der Zellmembran, die einen bakteriziden Effekt bedingt (Alborn et al., 1991; Eisenstein, 2004; Silverman et al., 2003). Diese Wirkung besteht ausschließlich gegenüber grampositiven Bakterien, einschließlich Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSA) und Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE). Die Indikationen für die Gabe von Daptomycin sind daher komplizierte Haut- und Weichteilinfektionen durch grampositive Erreger sowie eine rechtsseitige Endokarditis oder eine Bakteriämie durch *Staphylococcus aureus* (Arbeit et al., 2004; Fowler et al., 2006).

### 1.3.4 Pharmakokinetik

Eine orale Applikationsform von Daptomycin existiert aufgrund seiner mangelhaften Bioverfügbarkeit nicht. Daptomycin wird daher ausschließlich als Pulver zur Herstellung einer Infusionslösung angeboten. Die empfohlene Dosierung für gesunde Erwachsene ohne eine relevante Nierenfunktionsstörung (Kreatinin-Clearance über 30 ml/min) beträgt 4 bis 6 mg pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden als Kurzinfusion über 30 Minuten. Je nach Indikation und Verlauf der Infektion ist eine Gesamttherapiedauer von 7 bis 14 Tagen üblich. Bei einer Halbwertszeit des Daptomyocins von ca. 8 bis 9 Stunden wird bei einer regulären Dosierung ca. ab dem dritten Behandlungstag ein Konzentrationsgleichgewicht erreicht. Das Verteilungsvolumen beträgt ca. 0,1 l/kg. Dabei reichert sich das Antibiotikum vorwiegend in gut vaskularisiertem Gewebe an und durchdringt kaum die Blut-Hirn- oder die Plazentaschranke (Fachinformation Cubicin® 2013). Die Elimination von Daptomycin erfolgt größtenteils unverändert renal, eine Metabolisierung über das hepatische Cytochrom P450-System ließ sich *in vitro* nicht bzw. nur minimal nachweisen. Die Plasma-Clearance liegt bei etwa 7 bis 9 ml/h/kg, die renale Clearance bei 4 bis 7 ml/h/kg (Fachinformation Cubicin® 2013).

### 1.3.5 Unerwünschte Arzneimittelwirkungen und Interaktionen

Daptomycin ist ein weitgehend gut verträgliches Antibiotikum. Häufige Nebenwirkungen sind gastrointestinale Beschwerden, wie z.B. Obstipation, Diarrhoe, Übelkeit und Erbrechen, sowie Kopfschmerzen (Arbeit et al., 2004; Fachinformation Cubicin® 2013). Allergische Hautreaktionen in Form einer Rötung an der Injektionsstelle (5,8%) oder einem generalisiertem Exanthem sind beschrieben. Als häufigere Nebenwirkung sind

außerdem eine Erhöhung der Lebertransaminasen und der CPK im Serum aufzuführen (Arbeit et al., 2004; LaPlante et al., 2004).

Frühe klinische Studien in den Achtziger Jahren zeigten eine potentielle Myotoxizität von Daptomycin, welches in einer Dosierung von 4 mg pro Kilogramm Körpergewicht alle 12 Stunden bei zwei von fünf Patienten zu muskulären Beschwerden führte (Tally et al., 1999). Eine tierexperimentelle Studie mit Hunden ergab den Hinweis, dass die Häufigkeit und Schwere der Myotoxizität weniger mit den Spitzenkonzentrationen von Daptomycin im Serum oder der Bioverfügbarkeit des Medikamentes zusammenhängt, sondern primär mit dem Dosisintervall korreliert (Oleson et al., 2000). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde die empfohlene Daptomycin-Dosierung auf 4 bis 6 mg pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden modifiziert und zeigte in den nachfolgenden klinischen Studien eine weitgehend gute Verträglichkeit (Arbeit et al., 2004). In den unterschiedlichen Studien wurde jedoch bei 2,8 bis 6,7% der mit Daptomycin behandelten Patienten eine Erhöhung der Creatinphosphokinase beschrieben (Arbeit et al., 2004; Fowler et al., 2006), dabei ist bei 25% der Patienten mit einem initial normwertigem Creatinphosphokinase-Spiegel ein Anstieg der CPK im Serum beobachtet worden (Fowler et al., 2006). Darüber hinaus sind einzelne Fälle einer Daptomycin-assoziierten Rhabdomyolyse bekannt (Berg et al., 2014; Echevarria et al., 2005; Edwards et al., 2006; Kazory et al., 2006; Papadopoulos et al., 2006; Patel et al., 2007; Sbrana et al., 2010).

Als zusätzlicher Risikofaktor einer Daptomycin-bedingten Muskelschädigung gilt eine gleichzeitige Therapie mit Arzneimitteln, welche die renale Filtration reduzieren (nicht-steroidale Antirheumatika, Cyclooxygenase-2-Hemmer), oder mit Substanzen, welche ebenfalls potentiell myotoxisch sind, wie Statinen (Fachinformation Cubicin® 2013). Es wird daher empfohlen, eine gleichzeitige Medikation mit Arzneimitteln, welche ihrerseits eine Myopathie auslösen können, nach Möglichkeit zu vermeiden. Bei einer notwendigen Komedikation wird auf regelmäßige Messungen der CPK im Serum hingewiesen (Fachinformation Cubicin® 2013). Eine Interaktion über das Cytochrom-P450-System ist für Daptomycin dagegen nicht zu erwarten (Fachinformation Cubicin® 2013).

### 1.4 L6-Zellen

Die L6-Zellen sind eine permanente Muskelzelllinie, die ursprünglich durch Yaffe aus Primärkulturen der Rattenmuskulatur isoliert wurden (Yaffe, 1968). Sie wachsen adhärent als Monolayer auf Kulturschalen. Die Zellen zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate und durch eine schnelle, insulinsensitive Differenzierung zu multinukleären, spindelförmigen Myotuben aus. Der Fibroblastenanteil der L6-Kulturen ist vernachlässigbar gering. Die Zelllinie eignet sich, um *in vitro* modellhaft die Reaktion von Muskelgewebe auf exogene Einflüsse zu untersuchen. Entsprechende Studien wurden vielfach publiziert (Itagaki et al., 2009; Kobayashi et al., 2007, 2008; Liu et al., 2011; Matzno et al., 1997, 2003; Morikawa et al., 2005).

### 1.5 Fragestellung

Unter einer Monotherapie mit Statinen tritt in ca. 0,1 bis 0,5% der Fälle eine Myopathie auf (Garnett, 1995), die unbehandelt in 0,04 bis 0,2% mit einem akuten renalen Versagen und lebensbedrohlichen Komplikationen assoziiert ist (Berland et al., 1991). Aufgrund von guten Studienergebnissen bzgl. der Prävention großer vaskulärer Ereignisse wurden Statine in den letzten Jahren für ein breiteres Patientenspektrum empfohlen und der LDL-Cholesterol-Zielwert bei Patienten mit einem hohem Risiko koronarer Herzerkrankungen gesenkt (Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH) Collaborative Group et al., 2010; Catapano et al., 2011; Grundy, 2012). Durch die breitere Anwendung von Statinen und die für den reduzierten LDL-Cholesterol-Zielwert notwendige Erhöhung der Statindosierung ist eine Zunahme der Inzidenz oder des Schweregrades der Muskelbeschwerden möglich und das Potential für Medikamenteninteraktionen erhöht. Eine Metaanalyse von 20 randomisiert-kontrollierten Studien zeigte, dass die schwerste Form der Statin-induzierten Myopathie, die Rhabdomyolyse, zu ca. 60% auf Arzneimittelinteraktionen zurückzuführen ist (Law et al., 2006; Tomaszewski et al., 2011). Medikamenteninteraktionen mit Statinen sind besonders vor dem Hintergrund einer langzeitigen Behandlung mit Statinen wahrscheinlich und die Kenntnis der Arzneimittelinteraktionen relevant. Die Interaktion von Statinen mit Arzneimitteln, die ebenfalls über das hepatische Cytochrom-P450-System verstoffwechselt werden, ist vielfach beschrieben. Gut dokumentiert ist auch eine erhöhte Myotoxizität durch



Kombination von Statinen mit Fibraten, besonders von Cerivastatin mit dem Fibrat Gemfibrozil (Law et al., 2006).

Zu vermuten wäre auch eine verstärkte Myotoxizität durch die Kombination von Statinen mit anderen myotoxischen Substanzen. Einzelne Fallberichte weisen auf einen verstärkten myotoxischen Effekt durch Kombination von Statinen mit dem Antibiotikum Daptomycin hin (Bland et al., 2011; Odero et al., 2009). Es wird daher empfohlen, eine gleichzeitige Medikation mit dem Antibiotikum Daptomycin nach Möglichkeit zu vermeiden (Fachinformation Cubicin® 2013; Sauermann et al., 2008). Daptomycin ist insbesondere durch seine bakterizide Wirkung gegenüber Vancomycin- und Linezolid-resistenten grampositiven Erregern, inklusive den Vancomycin-resistenten Enterokokken (VRE) und den Methicillin-resistenten Staphylokokken (MRSA) wichtig. Vor dem Hintergrund der zunehmenden Antibiotikaresistenz verschiedener Keime wird Daptomycin zunehmend in der Therapie komplizierter Wund- und Weichteilinfektionen und Endokarditiden oder einer Sepsis durch VRE bzw. MRSA angewandt (Arbeit et al., 2004; Fowler et al., 2006).

Die Wechselwirkungen von Daptomycin und Statinen sind hinsichtlich einer Muskelschädigung nicht geklärt und werden kontrovers diskutiert. In der vorliegenden Arbeit soll daher das myotoxische Potential von Simvastatin und Daptomycin - besonders im Hinblick auf ihre kombinierte Wirkung - überprüft werden. Dazu wurde die Wirkung der Substanzen allein und in Kombination auf L6-Zellen *in vitro* lichtmikroskopisch, im MTT-Zytotoxizitätstest, durchflusszytometrisch und immunhistologisch untersucht. Betrachtet wurde der Einfluss der Substanzen auf die Morphologie, die Proliferationsrate und die Apoptose- bzw. Nekrosereaktion der Zellen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Apparative Ausstattung

Für die Kultivierung und Untersuchung der L6-Zellen wurde folgende apparative Ausstattung verwendet:

- Laminar-Air-Flow-Kabine (Fa. Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland)
- Begasungsbrutschrank B5060 EK/CO mit elektronischer Regelung für CO<sub>2</sub> (37° C, 5% CO, 96% Luftfeuchtigkeit) (Fa. Heraeus Holding GmbH, Osterode, Deutschland)
- Lichtmikroskop (Fa. Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland)
- FACScan-Durchflusszytometer (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)
- Cellspin I (Fa. Tharmac, Waldsolms, Deutschland)
- Minifuge RF (Fa. Heraeus Holding GmbH, Osterode, Deutschland)
- Mikrotiter Shaker (Fa. Dynatech, England)
- Vortex-Schüttelgerät Reax 2000 (Fa. Heidolph, Schwabach, Deutschland )
- Ophys Microplate Reader, Modell: 1478 (Fa. Dynex, Chantilly, USA)
- Waage Typ A200S-\*D1 (Fa. Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland)
- Costar 20 – 200 µl 8-pette Multichannel Pipettors (Fa. Corning, Corning, USA)
- Octapette 25 - 200 µl (Fa. Corning, Corning, USA)
- Sterile Einmalpipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml) (Fa. BD Falcon, Heidelberg, Deutschland)
- Hämozytometer Neubauer, Kat.Nr.: 718605 (Fa. Brand GmbH, Wertheim, Deutschland)
- Einmalplastikkulturflaschen, 25 cm<sup>2</sup>, Kat.Nr.: 156367 (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
- Einmalplastikkulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup> , Kat.Nr.: 156499 (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland)

- Einmalplastikkulturflaschen, 75 cm<sup>2</sup>, Kat.Nr.: 83.1813.002 (Fa. Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
- Einmalpetrischalen Nunclon, 21,5 cm<sup>2</sup>, Kat.Nr.: 150326 (Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland)
- Deckgläschen, 22 mm Durchmesser, Kat.Nr.: 83.1840.001 (Fa. Sarstedt, Nürnberg, Deutschland)
- 96-Loch-Mikrotiterplatten, Kat.Nr.: 92696 (Fa. TPP, Trasadingen, Schweiz)
- sterile Zentrifugenröhrchen (5 ml, 12 ml) (Fa. Greiner Bio-One GmbH, Solingen, Deutschland)
- sterile Messzylinder (50 ml, 100 ml) und Bechergläser (20 ml, 50 ml, 100 ml, 500 ml) (Fa. Schott AG, Mainz, Deutschland)

## 2.2 Chemikalien

### 2.2.1 Kulturmedien und Pufferlösungen

Die folgenden Substanzen waren in den Kulturmedien bzw. Pufferlösungen enthalten:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 4,5 g/l D-Glukose, Kat.Nr.: F0445 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Glutamin (200mM), Kat.Nr.: K0280 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS), Kat.Nr.: S0125 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Pferdeserum (Donor Horse Serum), Kat.Nr.: S9133 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Insulin, bovin (100 mg/10 ml), Kat. Nr.: K3510 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Penicillin/ Streptomycin (10.000 U/ml/ 10.000µg/ml), Kat.Nr.: A 2212 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline, PBS), Calcium- und Magnesium-haltig, Kat.Nr.: L1815 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)
- Tris-Puffer, Kat.Nr.: 108382 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Natriumchlorid, Kat.Nr.: 106404 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Dimethylsulfat (DMSO), Kat.Nr.: 102952 (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland)

- FACSFlow Sheath Fluid, Kat.Nr.: 342003 (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

## 2.2.2 Antikörper für die Immunhistochemie

Nachfolgend sind die Antikörper tabellarisch aufgeführt, die in den immunhistochemischen Versuchen verwendet wurden:

Antikörper	Katalognummer	Hersteller
Anti-Caspase 3 (Anti-ACTIVE Caspase-3 pAb)	G7481	Fa. Promega, Mannheim, Deutschland
Anti-Vimentin (Monoclonaler Anti-Vimentin V9)	V6630	Fa. Sigma, Saint-Louis, Missouri, USA
Anti-Rho-Protein (Purified Mouse Anti-Rho)	610990	Fa. BD Transduction laboratories, USA

## 2.2.3 Enzyme

Im Rahmen der Zellkultivierung und der Versuche verwendete Enzyme waren:

- Trypsin/EDTA, 0,05%/0,02% in PBS, Calcium- und Magnesium-frei, Kat.Nr.: L2153 (Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland)

## 2.2.4 Farbstoffe

Nachfolgend sind die verwendeten Farbstoffe tabellarisch aufgeführt:

Farbstoff	Katalognummer	Hersteller
HOECHST (Bisbenzimid H 33258)	861405	Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland
Propidiumiodid	556463	Fa. BD Pharmingen, Kentucky, USA
Propidiumiodid	P3566	Fa. Invitrogen, San Diego, USA
FITC Annexin V	556419	Fa. BD Pharmingen, Kentucky, USA
Thiazolylblau Tetrazoliumbromid (MTT)	M5655	Fa. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

## 2.3 Testsubstanzen (Simvastatin und Daptomycin)

### 2.3.1 Simvastatin, Kat. Nr.: 430-104-M050 (Fa. Alexis Biochemicals, San Diego, USA)

Simvastatin-Lacton wurde als Pulver bezogen und bei - 20° C für maximal 1 Jahr oder bis zum Ablauf des Mindesthaltbarkeitsdatums trocken und lichtgeschützt aufbewahrt. Zur Herstellung der Stammlösung wurde Simvastatin in einer Konzentration von 4,18 mg/ml in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst. Diese 10 mM Stammlösung von

Simvastatin wurde bei - 20° C aufbewahrt und innerhalb von 3 Monaten verwendet. Unmittelbar vor den Versuchen wurden die entsprechenden Volumina der Stammlösung unter sterilen Bedingungen mit Zellkulturmedium zu den zu untersuchenden Endkonzentrationen verdünnt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationsangaben von Simvastatin beziehen sich auf die eingesetzte, nicht-hydrolysierte Lacton-Form.

### **2.3.2 Daptomycin, Cubicin<sup>®</sup>, Novartis**

Daptomycin (Cubicin<sup>®</sup>) wurde von Novartis als Pulver zur Herstellung einer Injektionslösung erworben. Daptomycin wurde trocken, bei ca. 4° C gekühlt und lichtgeschützt maximal bis zu seinem Mindesthaltbarkeitsdatum aufbewahrt. Unmittelbar vor dem Experiment wurde Daptomycin unter sterilen Bedingungen in einer Konzentration von 1000 mg/l in Zellkulturmedium gelöst. Um die zu untersuchenden Endkonzentrationen herzustellen, wurden die entsprechenden Volumina dieser Stammlösung zu dem Zellkulturmedium hinzugefügt.

### **2.4 Zelllinie L6**

In der Arbeit wurde eine etablierte, kontinuierliche Zelllinie von L6-Zellen verwendet. Diese von der Ratte abstammende Muskelzelllinie wurde von der Firma Promochem erworben. Für die experimentellen Arbeiten wurden Zellen der Passagen 5 bis 30 eingesetzt. Die Zellen wurden kontinuierlich für In-vitro-Analysen verwendet oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

### **2.5 Zellkultivierung**

#### **2.5.1 Ansatz und Supplementierung des Kulturmediums für die L6-Zellen**

Als Wachstumsmedium für die Kultivierung der L6-Zelllinie wurde DMEM (nach Dulbecco modifiziertes Eagle's Minimum Essential Medium) mit 4,5 g/l Glucose verwendet. Es wurde mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% L-Glutamin ergänzt. Die Zusatzstoffe dienen als Nährstoffe und fördern das Wachstum der Zellen. Zur Reduktion des Infektionsrisikos wurde das Zellkulturmedium außerdem mit 0,5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml/ 10.000 µg/ml) pro 100 ml Medium versetzt. Nach dem Anbruch wurde das Medium bei 4 – 8° C gelagert und innerhalb von 14 Tagen verbraucht.

### **2.5.2 Zelldifferenzierung**

Um die Differenzierung der L6-Myoblasten zu Myozyten zu induzieren, wurde nach dem Erreichen einer hohen Konfluenz der Zellen das Zellkulturmedium gewechselt und nachfolgend das vielfach beschriebene Differenzierungsmedium verwandt (Benigni et al., 2000; Matzno et al., 1997). Dieses bestand aus DMEM mit 4,5 g/l Glucose, welches mit 1% Pferdeserum, 100 µl Insulin pro 100 ml Medium sowie 0,5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 U/ml/ 10.000 µg/ml) pro 100 ml Medium versetzt war. Neu angesetztes Medium wurde innerhalb von spätestens 14 Tagen verbraucht. Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt. Das Zellwachstum und die Sterilität wurden regelmäßig mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Carl Zeiss AG) kontrolliert. Nur bei einer höheren Konfluenz der Zellen war eine Zelldifferenzierung und Fusion zu länglichen Myotuben zu beobachten.

### **2.6 Subkultivierung („Passagierung“) der Zellen**

Bei der Kultivierung von Zellen ist bei Erreichen einer hohen Zelldichte eine Umverteilung auf mehrere Kulturansätze (Subkultivierung, „Passagierung“) notwendig. Dadurch wird ein Zelltod durch einen Substratmangel im Zellkulturmedium bzw. durch einen Mangel an Oberfläche für die adhären wachsenden Zellen verhindert und Zellen für weitere Versuchsansätze gewonnen.

#### **2.6.1 Prinzip der Subkultivierung**

Die in den Zellkulturflaschen adhären L6-Zellen wurden mit Hilfe der Protease Trypsin gelöst und auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt.

#### **2.6.2 Durchführung der Subkultivierung**

Das Zellkulturmedium wurde mit einer sterilen Pipette entfernt. Anschließend wurde jede 75 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche mit 10 ml PBS-Lösung beschickt und geschwenkt, um Spuren des Zellkulturmediums zu entfernen („Waschung der Zellen“). Das PBS wurde mit einer neuen sterilen Pipette entfernt. Diese Waschung der Zellen wurde insgesamt 3 Mal in gleicher Weise durchgeführt, um das im Kulturmedium enthaltene bovine Serum und Calcium zu entfernen, welche die Wirkung der im nächsten Schritt verwandten Protease (Trypsin) vermindern können. Nachfolgend wurden 3 ml einer Trypsin-/EDTA-Lösung (Trypsin/EDTA, 0,05%/0,02% in PBS, Calcium- und Magnesium-frei) mit einer

sterilen Pipette in jede Zellkulturflasche gegeben und über der gesamten Zellschicht verteilt. Die Kulturflaschen wurden dann für 3 Minuten in einem Brutschrank bei 37° C inkubiert, um die Wirkung des Trypsins zu verstärken. Nach dieser Zeit waren eine Abrundung und ein Ablösen eines Teils der Zellen zu beobachten. Direkt nach der Entnahme aus dem Brutschrank wurden jeder Kulturflasche 4 ml Zellkulturmedium zugefügt, um die proteolytische Wirkung des Trypsins durch das im Kulturmedium enthaltene bovine Serum zu beenden und eine enzymatische Schädigung der Zellen zu verhindern. Durch vorsichtiges Schwenken der Zellkulturflasche lösten sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche und noch bestehende Zellverbände wurden durch langsames Auf- und Abpipettieren mit einer Pasteur-Pipette gelöst. Um das Trypsin aus der Zellsuspension zu entfernen, wurde die Zellsuspension anschließend in einer Zentrifuge bei 2000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und das Zellpellet in 2 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Die Entfernung des Trypsins aus der Zellsuspension ist wichtig, da restliche Spuren der Protease das Wachstum der Zellen nach der Subkultivierung beeinträchtigen können. Die Zellsuspension wurde auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt (in der Regel 1:4), mit neuem Kulturmedium versehen und kultiviert.

## **2.7 Kryokonservierung der Zelllinie**

Durch das Einfrieren von Anteilen der L6-Zellen wurde ein Zellvorrat in der eingesetzten Passage erhalten und das Risiko eines Zellverlustes durch eine Kontamination reduziert.

### **2.7.1 Durchführung der Kryokonservierung**

Zuerst wurden die Zellen lichtmikroskopisch bzgl. einer eventuellen Kontamination überprüft. Die anschließenden Versuchsschritte sind identisch zu der Durchführung der Subkultivierung und sind dort ausführlich dargestellt (siehe 2.6.2). Nach dem Waschen, Trypsinieren und Zentrifugieren der Zellsuspension, wurde das Zellpellet in 6 ml Kulturmedium mit einem 10-prozentigen Zusatz von DMSO resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde auf mehrere Kryoröhrchen verteilt und für 24 Stunden bei - 80° C in einer Kryobox gelagert. Die gefrorenen L6-Zellen wurden unter Verwendung einer Schutzbrille und Handschuhen nach 24 Stunden der Box entnommen und schnell in flüssigen Stickstoff überführt.

## 2.7.2 Auftauen der kryokonservierten Zellen

Die gefrorenen Zellen wurden in den Kryoröhrchen über ca. 5 Minuten in warmem Wasser aufgetaut, in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und in 4 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension für 10 Minuten bei 2000 U/Minute zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Das Zellpellet wurde schließlich in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert und auf die Zellkulturflaschen verteilt.

## 2.8 Bestimmung der Zellzahl

### 2.8.1 Prinzip der Zellzahlbestimmung

Um gleich bleibende Zellzahlen für die Untersuchungen zu erhalten, wurden vor jedem Experiment die Zellen in einer Zählkammer nach Neubauer mikroskopisch ausgezählt.

### 2.8.2 Durchführung der Zellzahlbestimmung

Die Zählkammer wurde zuerst so aufgebaut, dass Interferenzstreifen („Newtonsche Ringe“) sichtbar waren. Die zu zählenden Zellen wurden mittels Trypsin gelöst und eine homogene Zellsuspension hergestellt. Jeweils 10 µl der Lösung wurden am oberen und unteren Kammerrand aufgetragen. Unter Verwendung eines Zehnerobjektives wurden in jeder Kammer jeweils 4x4 Quadrate ausgezählt und der Mittelwert der Zellzahlen berechnet. Durch eine Multiplikation dieses Ergebnisses mit  $10^4$  wurde die Zellzahl/ml Lösung erhalten. Bei einer zu hohen Zelldichte war die genaue Bestimmung der Zellzahl durch Überlagerung einzelner Zellen nicht möglich. Diese Zellsuspensionen wurden dann zunächst mit Medium verdünnt und der entsprechende Verdünnungsfaktor in die unten dargestellte Berechnung miteinbezogen. Die Zellzahl wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellen}/\mu\text{l} = \frac{\text{Gesamtzahl der Zellen}}{\text{ausgewertete Fläche [mm}^2\text{]} \cdot \text{Kammertiefe [mm]} \cdot \text{Verdünnung}}$$

## 2.9 Sterile Versuchsbedingungen

Sterile Arbeitsbedingungen sind eine Voraussetzung für den Erhalt einer keimfreien Zellkultur. Die Kultivierung der L6-Zellen wurde daher in einem separaten Raum



durchgeführt, der mit einer Luftfilteranlage ausgestattet und nur für Zellkulturarbeiten verwendet wurde. Die Arbeiten an den Zellen wurden unter einer Reinraumwerkbank (Laminar-Air-Flow-Kabine) durchgeführt, deren Arbeitsfläche vor und nach jedem Gebrauch bzw. bei Bedarf zwischen den Arbeitsschritten mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert wurde. Des Weiteren wurde die Arbeitsfläche in regelmäßigen Abständen mit UV-Licht bestrahlt. Vor den Zellkulturarbeiten wurden die Hände gewaschen und desinfiziert. Bei den Arbeiten wurden Einmal-Handschuhe verwendet, die mit 70-prozentigem Ethanol desinfiziert wurden. Es wurde ein sauberer, geschlossener Schutzkittel getragen.

### **2.10 Lichtmikroskopie**

#### **2.10.1 Färbereagenzien**

Für die lichtmikroskopischen Versuche wurden die Farbstoffe Hoechst 33258 (Bisbenzimid H33258) und Propidiumiodid verwendet.

##### **2.10.1.1 HOECHST 33258 (Fa. Sigma, Steinheim, Deutschland)**

Der Farbstoff Hoechst 33258 wurde als Pulver von der Firma Sigma bezogen. Er wurde lichtgeschützt, trocken und bei  $< 25^{\circ} \text{C}$  maximal bis zu seinem Mindesthaltbarkeitsdatum aufbewahrt. Für die Herstellung der Stammlösung wurde das Pulver in destilliertem Wasser in einer Konzentration von 10 mg/ml gelöst. Die fertige Färbelösung wurde in einem mit Alufolie umwickelten Zentrifugenröhrchen lichtgeschützt abgefüllt und bei  $7^{\circ} \text{C}$  lichtgeschützt gelagert. Ca. 10 Minuten vor der Verwendung wurde die Färbelösung aus dem Kühlschrank entnommen, geschwenkt und bis zur Verwendung bei Zimmertemperatur gelagert.

##### **2.10.1.2 Propidiumiodid (P3566, Fa. Invitrogen)**

Propidiumiodid wurde als fertige Lösung (1 mg/ml in Wasser gelöst) von Invitrogen bezogen und bei ca.  $6^{\circ} \text{C}$  lichtgeschützt aufbewahrt.

#### **2.10.2 Probenvorbereitung für die Lichtmikroskopie**

Für die lichtmikroskopischen Versuche wurden die Zellen auf Zellkulturplatten kultiviert und nach 72 Stunden Inkubation mit Simvastatin und Daptomycin in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Das Zellkulturmedium wurde zu Beginn entfernt, die Zellen

mit PBS-Lösung gespült und mit 2 µg/ml Hoechst 33258 in PBS-Lösung für 15 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Währenddessen wurde die Stammlösung von Propidiumiodid (1 mg/ml = 1,5 mM) in abgedunkelter Umgebung 1:3000 in 2xSSC-Lösung zu einer Konzentration von 500 nM verdünnt. Die Zellen wurden dann mit 2xSSC Lösung zweimalig gespült und nachfolgend für 3 Minuten in abgedunkelter Umgebung mit der verdünnten Propidiumiodidlösung (300 µl pro 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche) inkubiert. Die Zellen wurden dann 3 Mal mit 2xSSC-Lösung gewaschen und direkt fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

### **2.11 Zytotoxizitäts-Analyse**

#### **2.11.1 Prinzip des MTT-Zytotoxizitätstest**

Der MTT-Test beruht darauf, dass der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT, Thiazolylblau) von vitalen Zellen zu dem blauen Formazan reduziert wird. Die Extinktion von Formazan kann photometrisch gemessen werden und lässt auf die Menge vitaler Zellen in einer Zellpopulation rückschließen. Die genaue Durchführung des 10-Tages-Protokolls wird nachfolgend beschrieben.

#### **2.11.2 MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid)**

MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid), auch Thiazolylblau genannt, ist ein gelbes Tetrazolium-Salz, welches von vitalen Zellen enzymatisch zu dunkelblauem Formazan reduziert wird. Die dunkelblauen, hydrophoben Kristalle werden nachfolgend in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, sodass eine homogene Färbung des Wellinhalts erreicht wird, die photometrisch bei 570 nm messbar ist.

#### **2.11.3 Herstellung der Lösungen**

Die Testsubstanzen Simvastatin und Daptomycin wurden in den entsprechenden Konzentrationen für jede Versuchsreihe in Kulturmedium gelöst. Für die MTT-Stammlösung wurden 5 mg MTT in 1 ml PBS (Calcium und Magnesium-haltig) gelöst. Für das MTT-Medium wurden 5 ml MTT-Stammlösung (5 mg/ml) mit 45 ml Zellkulturmedium gemischt.

#### **2.11.4 Versuchsdurchführung**

Der Zytotoxizitätstest wurde nach einem MTT-Zytotoxizitätsprotokoll mit zehn Tagen Inkubation durchgeführt. Die L6-Myozyten wurden in 96-Well-Platten eingesät, über zehn Tage verschiedenen Konzentrationen von Simvastatin und Daptomycin ausgesetzt und anschließend die Menge der vitalen Zellen mit Hilfe des Farbstoffes MTT indirekt photometrisch bestimmt.

1. Tag: Die L6-Zellen wurden wie bei der Subkultivierung (siehe ausführliche Darstellung unter 2.6.2) zunächst trypsiniert, zentrifugiert und in dem jeweiligen Testmedium resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in einer Neubauer-Kammer gezählt und Zellsuspensionen mit einer Konzentration von  $5 \times 10^4$  Zellen pro ml Kulturmedium hergestellt. Die Wells der Multititer-Platte wurden mit einer Mehrkanal-Mikropipette mit jeweils 50  $\mu$ l Zellsuspension beschickt, sodass pro Well durchschnittlich ca. 2500 L6-Zellen vorlagen. Die freien Wells an den Rändern der Multiwell-Platten wurden jeweils mit 200  $\mu$ l Kulturmedium beschickt (Blanks, Abb. 6). Es folgte eine 2-stündige Inkubation der Multiwell-Platten im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 96% Luftfeuchtigkeit. Nach der Inkubationszeit wurde mikroskopisch überprüft, ob die Zellen am Boden der Wells adhärent waren. Die Wells wurden dann mit den jeweiligen Testsubstanz-Lösungen so auf 200  $\mu$ l Volumen aufgefüllt, dass die zu untersuchenden Zielkonzentrationen erreicht wurden. Als Negativkontrolle wurde eine Probe mit Kulturmedium mit 0,05% DMSO auf jeder Platte mitgeführt (Kontrollmedium, Abb. 6). Anschließend folgte die erneute Inkubation der Multiwell-Platten im Brutschrank.

3. Tag:

Nach mikroskopischer Prüfung bzgl. einer Kontamination der Mikrowell-Platten wurde das Medium vorsichtig abdekantiert und die Platten auf weichem, sterilem Zellstoff ausgeklopft. Alle Wells wurden nach dem dargestellten Schema erneut mit den Kontroll- und Testlösungen beschickt und wieder im Brutschrank inkubiert.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	K	S0,5	S1,0	S3,0	D100	D300	D500	D+S0,5	D+S1,0	D+S3,0	B
C	B	K	S0,5	S1,0	S3,0	D100	D300	D500	D+S0,5	D+S1,0	D+S3,0	B
D	B	K	S0,5	S1,0	S3,0	D100	D300	D500	D+S0,5	D+S1,0	D+S3,0	B
E	B	K	S0,5	S1,0	S3,0	D100	D300	D500	D+S0,5	D+S1,0	D+S3,0	B
F	B	K	S0,5	S1,0	S3,0	D100	D300	D500	D+S0,5	D+S1,0	D+S3,0	B
G	B	K	S0,5	S1,0	S3,0	D100	D300	D500	D+S0,5	D+S1,0	D+S3,0	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

**Abb. 6:** Pipettierschema für die 96-Well-Platte im MTT-Zytotoxizitätstest. Die Zellen wurden mit Simvastatin bzw. Daptomycin in verschiedenen Konzentrationen bzw. einer Kombinationen von beiden Substanzen inkubiert. Als Kontrolle dienten Zellansätze, die nur mit Kulturmedium inkubiert wurden (B= Blankokontrolle) bzw. mit Kulturmedium mit 0,05% DMSO versetzt waren (K= Kontrollmedium). B= Blankokontrolle; K= Kontrollmedium; S0,5= 0,5 µM Simvastatin; S1,0= 1,0 µM Simvastatin; S3,0= 3,0 µM Simvastatin; D100= 100 mg Daptomycin/l Medium; D300= 300 mg Daptomycin/l Medium; D 500= 500 mg Daptomycin/l Medium; D+S0,5= 300 mg Daptomycin/l Medium + 0,5 µM Simvastatin; D+S1,0= 300 mg Daptomycin/l Medium + 1,0 µM Simvastatin; D+S3,0= 300 mg Daptomycin/l Medium + 3,0 µM Simvastatin.

6. Tag:

Am sechsten Tag wurde das für den dritten Tag beschriebene Procedere wiederholt.

10. Tag:

Das Medium in den Multiwell-Platten wurde vorsichtig abdekantiert und in alle Wells 100 µl vorgewärmtes MTT-Medium (5 ml MTT-Stammlösung mit 5 mg MTT/ml und 45 ml Zellkulturmedium) pipettiert. Anschließend folgte die erneute Inkubation der Platten für 3 h im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 96% Luftfeuchtigkeit. Danach wurden die Mikrotiter-Platten bei 2500 rcf kurz zentrifugiert und das Medium anschließend abdekantiert. In jedes Well wurden 100 µl reines DMSO pipettiert, um die Formazankristalle zu lösen. Die Platten wurden für 10 Minuten auf dem Mikrotiter-Shaker geschüttelt und anschließend die Extinktion bei 570 nm photometrisch gemessen.

### 2.11.5 Prinzip der Datenauswertung

Die Photometrie beruht darauf, dass jede Substanz elektromagnetische Strahlung bestimmter Wellenlänge absorbiert und dadurch abschwächt. Durch die Messung der Abnahme der Lichtintensität einer bestimmten Wellenlänge kann nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz auf die Konzentration der Substanz im Lichtstrahl rückgeschlossen werden. In dieser Versuchsreihe wurde die Extinktion (optische Dichte) von Lichtstrahlen der Wellenlänge 570 nm für jede Probe der Multiwell-Platte mit einem Photometer gemessen, da Formazan ein Absorptionsmaximum bei ca. 570 nm aufweist. Eine hohe Extinktion lässt auf eine hohe Formazan-Konzentration in der Probe und damit auf eine große Anzahl vitaler Zellen in der Probe schließen. Bei der Auswertung wurde der Mittelwert der optischen Dichte in den „Blanks“ auf einer Multititer-Platte von der optischen Dichte der behandelten Proben subtrahiert, um die Eigenextinktion von Kulturmedium und DMSO zu entfernen. Im Anschluss wurden eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) und ein Post-hoc-t-Test nach Bonferroni durchgeführt. Als statistisches Signifikanzniveau wurde stets  $p \leq 0,05$  gewählt.

### 2.12 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine quantitative Analyse von Einzelzellen in Zellsuspensionen aufgrund von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Hierbei passieren Einzelzellen in einem Flüssigkeitsstrom den Lichtstrahl eines Lasers und erzeugen dabei Streulicht. Sind außerdem Epitope an der Oberfläche oder im Inneren einer Zelle mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, so emittieren diese während der Passage durch den Laser Licht einer bestimmten Wellenlänge. Mit Hilfe von Filtern und Spiegeln werden alle reflektierten und emittierten Lichtstrahlen so getrennt, dass nur bestimmte Wellenlängen von den jeweiligen Detektoren erfasst werden. Dadurch können die Zellgröße, die Zellgranularität und verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe analysiert werden. Jeder Fluoreszenzfarbstoff (Fluorochrom) hat sein spezifisches Emissionsspektrum. Propidiumiodid hat ein Emissionsmaximum bei ca. 617 nm (rot) und Annexin-FITC bei ca. 520 nm (grün). Da die Lichtmenge einer Wellenlänge zu der Anzahl der markierten Epitope proportional ist, ist eine quantitative Analyse der Anzahl eines bestimmten Epitopes in einer Zellpopulation möglich. Die elektrischen Impulse werden digitalisiert und auf einem Rechner gespeichert. Bei den Versuchen in dieser Arbeit wurden aus

jeder Probe 10.000 Zellen gemessen. Die weitere Bearbeitung und Auswertung der Rohdaten wurde mit der Auswertungssoftware WinList<sup>®</sup> durchgeführt.

## **2.12.1 Durchflusszytometrische Untersuchung der Apoptose/Nekrose von L6-Zellen mit Annexin V-FITC und Propidiumiodidfärbung**

### **2.12.1.1 Markierung apoptotischer Zellen mit Annexin V-FITC**

Annexin V-FITC ist ein Calcium-Ionen abhängiger, Phosphat-bindender Farbstoff mit einer hohen Affinität für das Zellmembranmolekül Phosphatidylserin. FITC (Fluorescein Isothiocyanat) ist der fluoreszierende Bestandteil des Moleküls mit einem Emissionsmaximum bei ca. 520 nm. In frühen Phasen der Zellapoptose finden Umbauprozesse an der Zellmembran statt, welche u. a. eine Translokation des Phosphatidylserins von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran an die Zelloberfläche umfassen. *In vivo* kommt es hierdurch zu einer Bindung von Makrophagen an das nun exponierte Phosphatidylserin mit resultierender Phagozytose der apoptotischen Zellen. Bei unseren In-vitro-Versuchen wird die Messung der Fluoreszenz des Annexin V-FITC, welches am Phosphatidylserin der Außenmembran apoptotischer Zellen gebunden wird, zur quantitativen Erfassung apoptotischer Zellen in einer Zellsuspension genutzt. Schreitet die Zellapoptose/-nekrose voran, kann Annexin V durch die poröse Zellmembran eindringen und auch an das intrazelluläre Phosphatidylserin binden. Mit einer alleinigen Annexin V-Färbung lassen sich frühe von späten Phasen der Apoptose daher nicht unterscheiden.

### **2.12.1.2 Markierung nekrotischer Zellen mit Propidiumiodid**

Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender, DNA-interkalierender Farbstoff mit einem Emissionsmaximum bei ca. 617 nm. Er dringt ausschließlich durch die poröse Zellmembran nekrotischer Zellen ein. Die Messung der Fluoreszenz Propidiumiodid-markierter Zellen dient daher zur quantitativen Erfassung nekrotischer Zellen in einer Zellsuspension. Durch die Doppelfärbung einer Zellsuspension mit Annexin und Propidiumiodid können Zellen in frühen Phasen der Apoptose von solchen mit poröser Zellmembran, d.h. solchen in späten Phasen der Apoptose bzw. nekrotischen Zellen, differenziert werden. Zellen, die positiv mit Annexin V-FITC und negativ mit PI markiert sind, befinden sich in einem frühen Stadium der Apoptose. Doppelt positive Zellen sind

entweder im Endstadium der Apoptose oder nekrotisch. Doppelt negative Zellen sind vital und zeigen keine messbare Apoptose oder Nekrose.

### **2.12.1.3 Probenvorbereitung bei der Annexin V – Propidiumiodid- Färbung**

Nach 72 h Inkubation mit den jeweiligen Substanzen wurde das Zellkulturmedium in sterile, unterschiedlich markierte 12 ml-Zentrifugen-Röhrchen umgefüllt (Schritt 1). Die am Boden der Zellkulturflasche adhärenen Zellen wurden mit 10 ml PBS-Lösung gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin-/EDTA-Lösung je Kulturflasche (Trypsin/EDTA, 0,05%/0,02% in PBS, Calcium- und Magnesium-frei) für 3 Minuten bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach dem Entfernen der Trypsin/EDTA-Lösung wurde die Enzymreaktion durch Zufügen von 4 ml Kulturmedium pro Zellkulturflasche gestoppt und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml Pasteur-Pipette resuspendiert und in sterile Zentrifugenröhrchen überführt. Diese Proben wurden zu dem initial abgenommenen, korrelierenden Zellkulturmedium aus Schritt 1 pipettiert. Es folgte eine zweimalige Zentrifugation der Zellsuspensionen (1000 rpm/4°/4 min), jeweils mit nachfolgender Waschung mit kalter PBS-Lösung. Der Überstand wurde dabei vorsichtig mit einer Pasteur-Pipette abgenommen. Die Zellen wurden nachfolgend in Annexin-Binding-Buffer in einer Konzentration von ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/ml resuspendiert. 100 µl dieser Lösung wurden in 5 ml FACScan Röhrchen überführt. Jedes FACScan Röhrchen wurde erst mit 5 µl Annexin V-FITC und nachfolgend in abgedunkelter Umgebung mit 10 µl einer 50 µg/ml Propidiumiodid-Lösung versetzt. Das Antikörper-Zellsuspensions-Gemisch wurde mittels Vortex kurz gemischt und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur abgedunkelt inkubiert. Nachfolgend wurden 400 µl des Annexin Binding Buffer in jedes Röhrchen gegeben und die Proben zügig durchflusszytometrisch gemessen.

### **2.12.1.4 Durchführung der Messung**

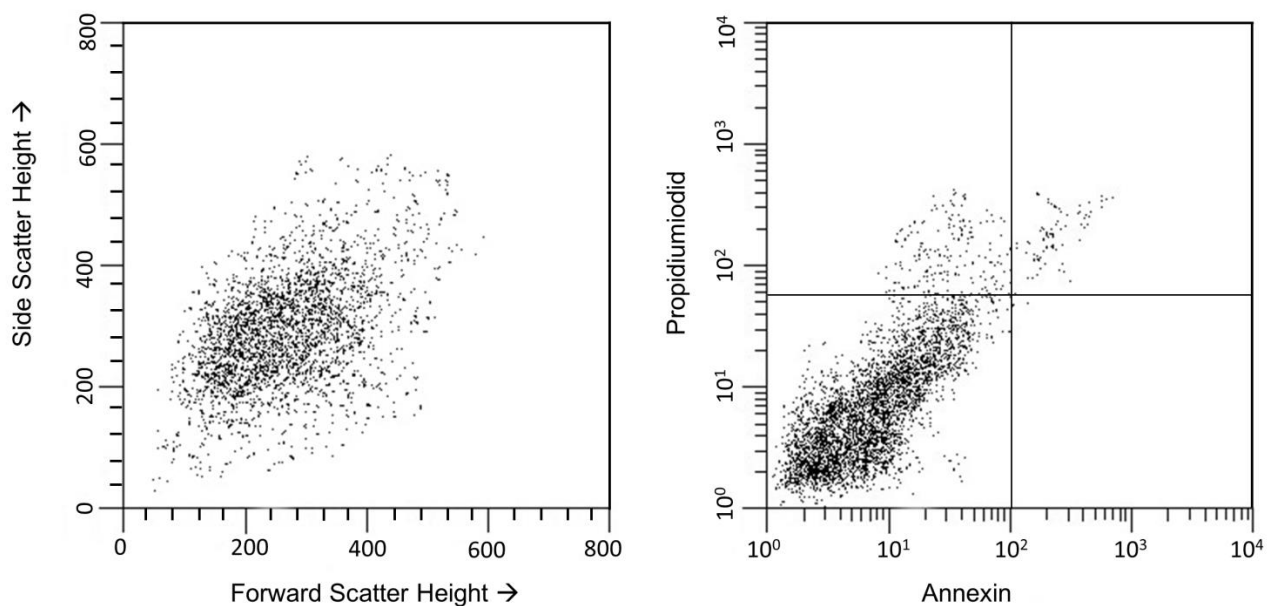
Das verwendete Durchflusszytometer (FACScan, Fa. Becton Dickinson) wurde in regelmäßigen Abständen mit fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln (Typ Calibrate<sup>®</sup>, Becton Dickinson) geeicht. Vor jeder Versuchsreihe wurde eine Blankokontrolle, d. h. eine Zellsuspension unmarkierter Zellen, gemessen, um die „Autofluoreszenz“ der Zellen zu bestimmen. Die Probenmessungen wurden dann mit der Blankokontrolle verglichen. Bei jeder Messung wurden 10.000 Zellen ausgewertet. Um eine gleichmäßige Zellverteilung zu erhalten, wurden die Proben vor jeder Messung wenige

Sekunden resuspendiert. Die Messdaten wurden mit dem Programm FASTFILE 38 (Becton Dickinson) auf einen Computer übertragen und anschließend mit der Auswertungssoftware WinList analysiert.

### 2.12.1.5 Auswertung mit WinList

Es wurden zwei Histogramme zur Auswertung ausgewählt:

1. In dem ersten Histogramm (a) wurden der forward scatter (FSC) (X-Achse) und der side scatter (SSC) (Y-Achse) gegeneinander aufgetragen. Der FSC ist ein Maß für die Zellgröße, während der SSC die Zellgranularität widerspiegelt (Abb. 7a).
2. In dem zweiten Histogramm (b) wurde die Fluoreszenz von Annexin V-FITC bei 520 nm auf der X-Achse gegenüber der Fluoreszenz von Propidiumiodid bei 617 nm auf der Y-Achse aufgetragen (Abb. 7b).



**Abb. 7:** Auswertung der Durchflusszytometrie mit Annexin und Propidiumiodid.

Linkes Histogramm (a): Darstellung der intrinsischen Merkmale der L6-Moyzyten im forward scatter und side scatter. Rechtes Histogramm (b): Darstellung der Fluoreszenz von Annexin auf der x-Achse und Propidiumiodid auf der y-Achse.

### 2.12.1.6 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Messungen wurde mit dem Statistikprogramm SPSS® („Statistical Package for the Social Sciences“, SPSS Inc.) durchgeführt. Durch eine univariate Varianzanalyse (ANOVA) wurden die jeweiligen Dosierungen von Simvastatin und Daptomycin als beeinflussende Faktoren untersucht. Ob die Zunahme der nekrotischen



Zellen bei einer Inkubation mit beiden Substanzen gegenüber der unbehandelten Kontrolle bzw. gegenüber einer anderen Dosierung der Substanzen signifikant war, wurde mit dem Post-Hoc-t-Test nach Bonferroni untersucht. Als statistisches Signifikanzniveau wurde stets  $p < 0,05$  gewählt. Statistisch signifikante Ergebnisse wurden in der Arbeit mit einem \* markiert.

### **2.12.2 Durchflusszytometrische Messung der Zellproliferation mit CFSE Farbstoff**

Durch Markierung von Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE (Carboxyfluorescein-succinimidylester) kann die Proliferationsrate von Einzelzellen in einer Zellsuspension quantitativ bestimmt werden. CFSE diffundiert passiv durch Zellmembranen, wird im Cytoplasma durch unspezifische Esterasen gespalten und bindet in der Folge kovalent an Arginin- und Lysinreste intrazellulärer Proteine. Der Fluoreszenzfarbstoff verbleibt dadurch im Cytoplasma der Zelle und wird bei einer Zellteilung zu 50% auf die Tochterzellen verteilt. Durch die Messung der Fluoreszenz markierter Zellen lässt sich daher auf die Anzahl stattgefundenen Zellteilungen seit Beginn der Markierung rückschließen. Eine geringe Fluoreszenz einer Zelle bedeutet entsprechend eine hohe Proliferationsrate der Mutterzellen. CFSE wird durch Licht der Wellenlänge von ca. 488 nm angeregt und emittiert Licht einer Wellenlänge von ca. 517 nm.

#### **2.12.2.1 Vorbereitung der Stammkonzentration von CFSE**

50  $\mu\text{mol}$  CFSE in Pulverform (Promokine) wurden in 18  $\mu\text{L}$  reinem DMSO gelöst um eine 5 mM CFSE-Stammlösung herzustellen. Die Lösung wurde kurz mittels Vortex gemischt und dann lichtgeschützt bei  $< 20^\circ \text{C}$  aufbewahrt und konnte über die nächsten 6 Monate verwendet werden. Für die Herstellung einer 2  $\mu\text{M}$  CFSE-Lösung zur Durchführung der Experimente wurde die CFSE Stammlösung mit PBS verdünnt. Diese Arbeitslösung wurde am gleichen Tag verworfen.

#### **2.12.2.2 Fluoreszenzmarkierung der Zellen mit CFSE**

Nach dem Entfernen des Zellkulturmediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS gespült und anschließend für ca. 3 Minuten mit 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung (0,05%/ 0,02%) pro Kulturflasche im Brutschrank inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit Hilfe einer 5 ml Pipette vereinzelt, resuspendiert und in sterile 12 ml-Röhrchen überführt. Die

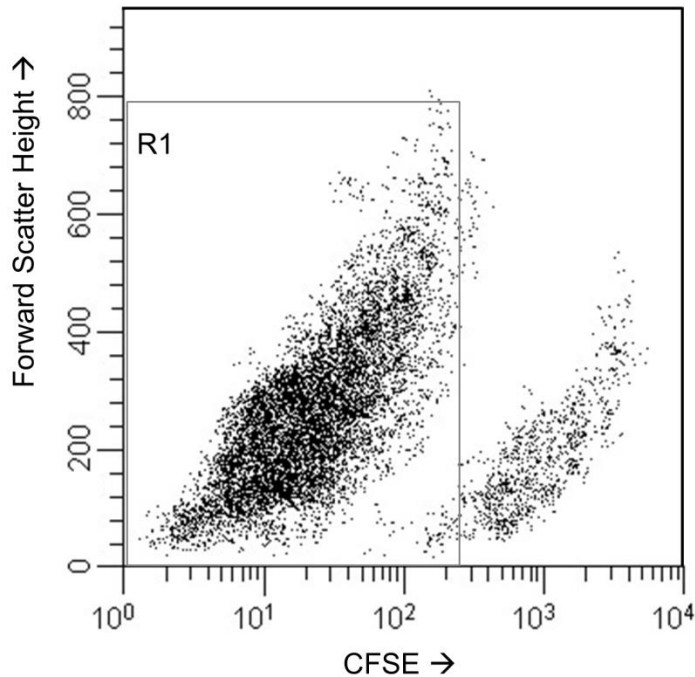
Proben wurden danach zweimalig zentrifugiert (1000 rpm/4°/4 min) und anschließend jeweils mit kaltem PBS resuspendiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und das Pellet in vorgewärmter PBS-Lösung von 37° C auf eine Zellzahl von 500 µl/10 x 10<sup>6</sup> Zellen resuspendiert. Das Volumen der Probenlösungen wurde durch Hinzufügen einer 2 µM CFSE-Lösung verdoppelt und die Proben dunkel für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Da CFSE lichtempfindlich ist, wurden sämtlich Arbeitsschritte der Färbung abgedunkelt durchgeführt. Um überschüssiges, unkonjugiertes CFSE zu entfernen wurden die gefärbten Zellen anschließend drei Mal mit Standardmedium gewaschen und dann für 24 h im Brutschrank bei 37° C in Zellkulturmedium inkubiert. Nach diesen 24 h wurden die Zellen jeweils mit einer 0,05-prozentigen DMSO-Lösung, einer 10 µM Simvastatin-Lösung, einer Lösung mit 300 mg Daptomycin/l Medium bzw. der Kombination von 10 µM Simvastatin und 300 mg Daptomycin/l Medium versetzt und für weitere 24 h im Brutschrank bei 37° C inkubiert.

### **2.12.2.3 Vorbereitung der Proben für die Messung**

Nach 24 h Inkubation mit den Substanzen wurde das Zellkulturmedium abdekantiert und die Zellen mit 10 ml PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit je 2 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%)-Lösung pro Kulturflasche im Brutschrank für 3 Minuten inkubiert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt und die Zellen anschließend mit Hilfe einer 5 ml Pipette mechanisch abgelöst, vereinzelt und resuspendiert und in 12 ml sterile Röhrchen überführt. Die Proben wurden danach 2-malig mit kaltem PBS gewaschen (1000 rpm/4°/4 min) und der Überstand anschließend mit einer Pasteur-Pipette abpipettiert. Die Zellen wurden in PBS überführt und anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

### **2.12.2.4 Durchflusszytometrische Messung und Auswertung mit WinList**

Die durchflusszytometrische Messung und Auswertung mit WinList erfolgte wie unter 2.12.1.4 beschrieben. Gemessen wurde die Fluoreszenz von CFSE bei 517 nm. Bei der Auswertung mit WinList wurden in einer Region R1 die Zellen mit einer niedrigen Fluoreszenz von CFSE markiert und ihr prozentualer Anteil an der Gesamtzahl der Zellen ermittelt (Abb. 8).



**Abb. 8:** Auswertung der Durchflusszytometrie mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester. In einem Histogramm wurde die Fluoreszenz von CFSE auf der x-Achse gegenüber der Forward Scatter Height auf der y-Achse aufgetragen. In der Region R1 wurde die Zellpopulation mit einer niedrigen Fluoreszenz von CFSE ausgewählt.

## 2.13 Immunhistochemie

### 2.13.1 Prinzip der Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode, die durch Kopplung zweier Antikörper ermöglicht, Oberflächenantigene und intrazelluläre Proteine nachzuweisen. Der primäre Antikörper bindet spezifisch an ein Epitop der Zellen. Der mit einem Fluorochrom gekoppelte, sekundäre Antikörper bindet spezifisch an den primären Antikörper und kann fluoreszenzmikroskopisch dargestellt werden. Dies ermöglicht eine indirekte Darstellung und semiquantitative Messung eines Epitops in verschiedenen Zellen.

### 2.13.2 Fixierung der Zellen durch Cytospin

Nach der Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin wurden die Zellen gemäß dem Schema der Subkultivierung durch eine Trypsinierung von dem Boden der Kulturflaschen gelöst und für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen-frei) resuspendiert und mit dem Cellspin-Gerät auf Objektträger aufgetragen. Dabei wurde versucht, eine möglichst gleichmäßige

Verteilung der Zellen auf dem Objektträger ohne Überlappungen oder Anhäufungen zu erreichen. Anschließend folgte die Trocknung der Zellen bei Raumtemperatur für ca. 120 min und die nachfolgende Fixierung in einem 10-minütigen Acetonbad.

### **2.13.3 Immunhistochemie**

In einem schrittweisen Prozess wurden die verschiedenen Proteine gefärbt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen der Antikörper wurden die Objektträger mit 0,5-prozentigem bovinem Serumalbumin (in PBS-Lösung) über 15 min inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Spülen mit PBS über zehn Minuten, um überschüssiges Serumalbumin zu entfernen. Nach der Trocknung der Objektträger bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit dem primären Antikörper (in einer Konzentration von 1:20 bis 1:250) für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS zur Entfernung des überschüssigen primären Antikörpers, folgte eine 60-minütige Inkubation mit dem 2. Antikörper bei Raumtemperatur. Abschließend wurde der überschüssige sekundäre Antikörper durch zweimaliges Spülen mit PBS über 10 min entfernt und die Proben mit einem Tropfen 0,1% p-Phenylendiamin in Glycerin und PBS vor einer Austrocknung und Auskristallisierung geschützt. Die Proben wurden mit einem Deckglas geschützt und zeitnah fotografiert, um eine Abnahme der Leuchtintensität zu vermeiden.

### **2.13.4 Fotografie und semiquantitative Auswertung**

Das Fotografieren der Proben erfolgte verblindet, d. h., dass die Testsubstanz und die Substanzkonzentration während des Fotografierens nicht bekannt waren. Dazu wurden die Proben von einer zweiten Person verdeckt angereicht und die Zuordnung der Bilder zu der Testsubstanz und Konzentration erfolgte nach der Auswertung. Die semiquantitative Auswertung wurde mit dem Programm Scion Image (Scion Image Corporation, Frederick, Maryland, USA) durchgeführt, welches für jedes Bild ein Farbbild und ein Graustufenbild erstellt. Aus letzterem wurde ein invertiertes Schwarz-Weiß-Bild erzeugt, dessen schwarze Punkte den fluoreszierenden Punkten des ursprünglichen Farbbildes entsprechen. Bei jedem Bild wurde die Fluoreszenz in einer definierten, konstanten Kreisfläche gemessen. Es wurde darauf geachtet, bei jedem Bild eine annähernd gleiche Anzahl an Zellen auszuwerten und Artefakte, starkes Hintergrundleuchten oder überlappende möglichst auszuschließen. Die Fluoreszenz der

Testfläche im Verhältnis zum Schwarzwert wurde mit der folgenden Formel prozentual ausgerechnet:

$$\text{Fluoreszenz (\%)} = \frac{\text{Messwert} \times 100}{\text{Gesamtfläche}}$$

### **3. Ergebnisse**

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von Simvastatin und Daptomycin bei alleiniger und kombinierter Gabe auf L6-Muskelzellen untersucht. Dazu wurden zunächst die morphologischen Veränderungen der L6-Zellen nach Exposition gegenüber den Substanzen lichtmikroskopisch untersucht. Nachfolgend wurde die Viabilität der L6-Zellen nach Exposition gegenüber den Substanzen im MTT-Zytotoxizitätstest bestimmt und in durchflusszytometrischen Untersuchungen die Zellapoptose/-nekrose von L6-Myozyten und die Proliferationsrate von L6-Myoblasten analysiert. Außerdem wurde der Einfluss der Substanzen auf einige intrazelluläre Proteine, die die Zellstruktur und wichtige intrazelluläre Signalkaskaden vermitteln, immunhistochemisch gemessen.

#### **3.1 Lichtmikroskopische Untersuchung der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Myozyten**

Die durch Simvastatin und/oder Daptomycin induzierten morphologischen Veränderungen der L6-Myozyten wurden nach 72-stündiger Inkubation der Zellen mit den Substanzen in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Die Zellen wurden nativ und nach Färbung mit Bisbenzimid H33258 und Propidiumiodid bei 40-facher Vergrößerung untersucht und fotografisch dokumentiert. Diese Versuche wurden mit dem Ziel durchgeführt, einen ersten visuellen Eindruck der Wirkung der Substanzen auf L6-Myozyten *in vitro* zu erhalten. Es wurden zwei verschiedene Konzentrationen von Simvastatin, 0,5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ , eine Lösung von 300 mg Daptomycin/l Medium sowie die Kombination von 300 mg Daptomycin/l Medium und 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin untersucht. Da die verwendeten Simvastatin- und Daptomycinlösungen 0,05% DMSO beinhalten, war auch im Zellkulturmedium des Kontrollansatzes DMSO in der gleichen Konzentration enthalten.

##### **3.1.1 Native Lichtmikroskopie ohne Färbung der Zellen**

Die L6-Myozyten, die in reinem Zellkulturmedium ohne Zusatz von Substanzen bzw. in Kulturmedium mit 0,05% DMSO kultiviert wurden, stellten sich in einem frühen Differenzierungsstadium dar, zeigten aber bereits die für Muskelzellen typische

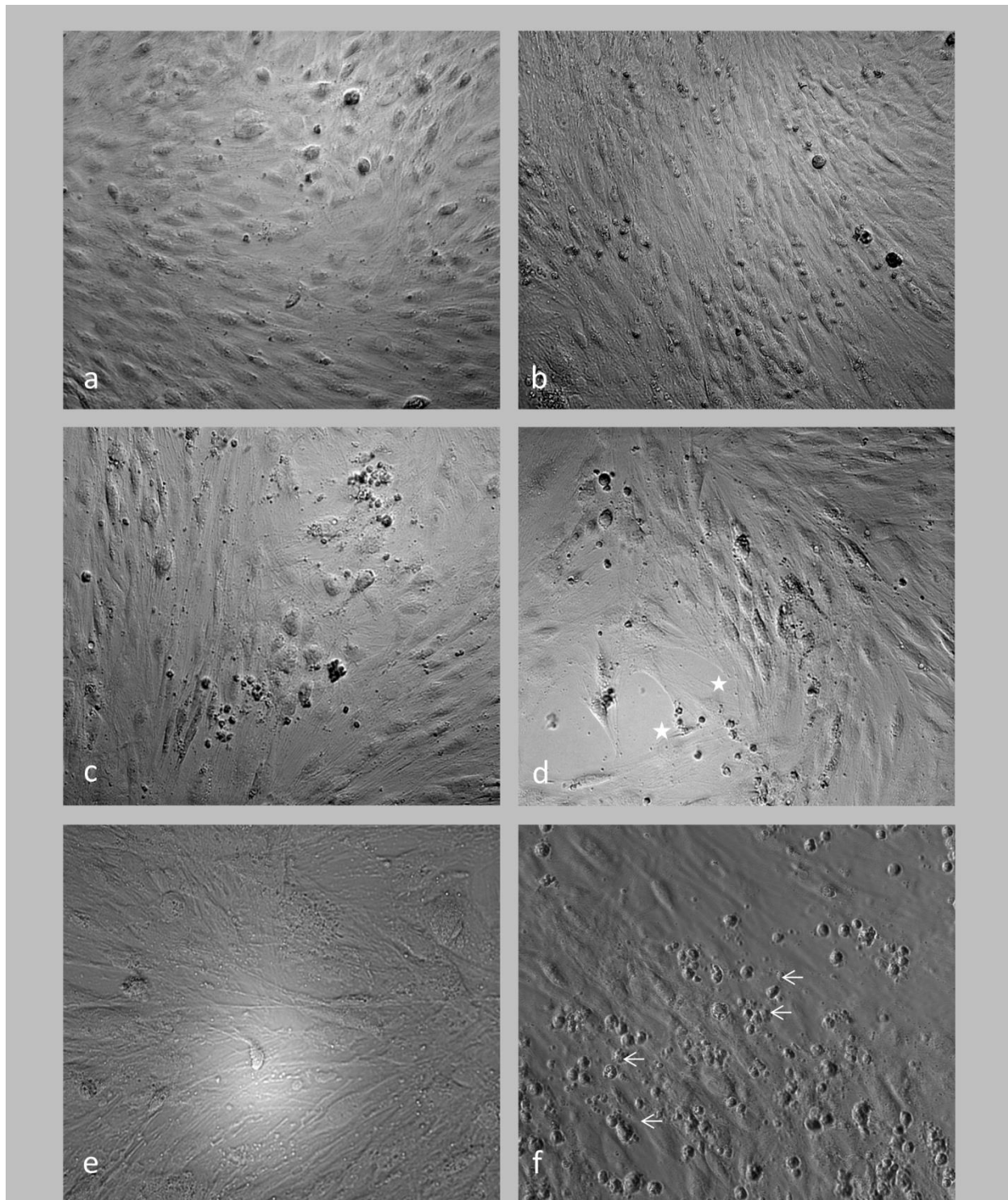
spindelförmige und multinukleäre Morphologie. Ein Unterschied zwischen der Inkubation in reinem Zellkulturmedium und der in Zellkulturmedium mit 0,05% DMSO war nicht sichtbar. Die L6-Myozyten wuchsen als Monolayer adhärent am Boden der Zellkulturplatte und bildeten dichte Zell-Zell-Kontakte und einen geschlossenen Zellverband aus (Negativkontrolle). Nach 72-stündiger Exposition mit einer Lösung mit 300 mg Daptomycin/l Medium war im Vergleich zu der Negativkontrolle eine Abnahme der Zelldichte des adhärenen Zellverbandes und ein höherer Anteil abgelöster, im Kulturmedium flottierender, abgerundeter Myozyten zu verzeichnen. Nach Inkubation in einer Simvastatin-Lösung von 0,5  $\mu\text{M}$  war kein eindeutiger Unterschied im Vergleich zu der Negativkontrolle sichtbar. Die Zellkörper imponierten aber etwas schlanker und einige Myozyten waren aus dem Zellverband herausgelöst. Nach Inkubation mit einer 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin-Lösung war eine deutliche Zellschädigung mit partiellen Lücken im Zellverband zu beobachten. Die Cytoplasma-Ausläufer der adhärenen Zellen stellten sich teilweise verschlankt dar. Nach gleichzeitiger Exposition mit 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin und 300 mg Daptomycin/l Medium imponierte der zytotoxische Effekt am stärksten ausgeprägt mit vielen aus dem Zellverband gelösten, abgerundeten Zellen in der Kulturlösung (Abb. 8).

### **3.1.2 Lichtmikroskopie nach Färbung mit Hoechst 33258 (Bisbenzimid H 33258) und Propidiumiodid**

Die L6-Myozyten wurden außerdem lichtmikroskopisch nach Doppelfärbung mit Hoechst 33258 und Propidiumiodid unter 40-facher Vergrößerung untersucht. Der Farbstoff Hoechst 33258 interagiert mit zellulärer DNA und wird in der Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung von Zellkernen verwendet. Er wird von Licht einer Wellenlänge von ca. 350 nm angeregt und emittiert Licht im blauen Spektrum bei ca. 450 nm. Propidiumiodid ist ebenfalls ein DNA-Interkalator, wird aber ausschließlich von sterbenden bzw. toten Zellen aufgenommen und ist daher ein Marker einer Zellnekrose. Es wird von Licht einer Wellenlänge von ca. 550 nm angeregt und emittiert Licht im roten Spektrum von ca. 617 nm. Im Kontrollansatz (Negativkontrolle), bei dem die Zellen mit einer 0,01%-DMSO-Lösung für 72 Stunden inkubiert wurden, färbten sich nur sehr wenige Zellkerne mit Propidiumiodid an, d.h. die Anzahl nekrotischer Zellen war gering. Mit Hoechst 33258-Färbung stellten sich die Zellkerne weitgehend unimorph mit rundlich-ovaler Form dar (Abb. 9). Die Exposition mit einer 0,5  $\mu\text{M}$  Simvastatin-

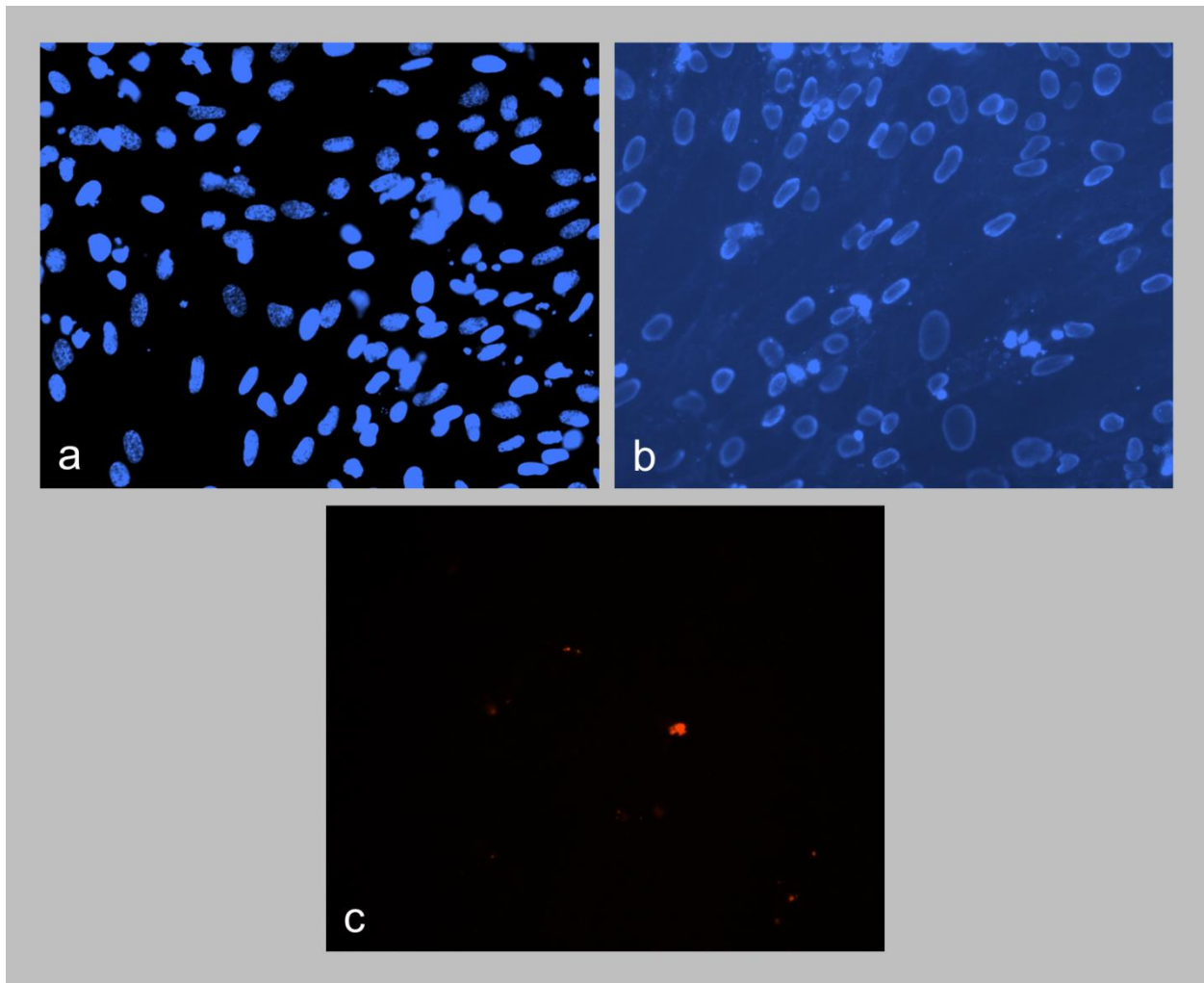
Lösung bewirkte keine eindeutigen Unterschiede im Vergleich zu der Negativkontrolle; es präsentierten sich nur wenige Propidiumiodid-positive Zellfragmente. Nach Inkubation in einer Lösung mit 300 mg Daptomycin/l Medium war der Zellverband der adhären Myozyten noch relativ dicht, allerdings war eine Zunahme fragmentierter und Propidiumiodid-positiver Zellkerne und ein vermehrtes Ablösen der Zellen zu verzeichnen. Nach einer Exposition mit 10  $\mu$ M Simvastatin zeigten sich ein rarefizierter Verband adhärenter Zellen und eine deutliche Zunahme Propidiumiodid-positiver polymorpher Zell- und Zellkernfragmente im Vergleich zu der Negativkontrolle. Die Fragmentierung der Zellkerne stellte sich auch nach Färbung mit Hoechst 33258 dar. Dieser Effekt war nach gleichzeitiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Simvastatin und 300 mg Daptomycin/l Medium am stärksten ausgeprägt (Abb. 10).



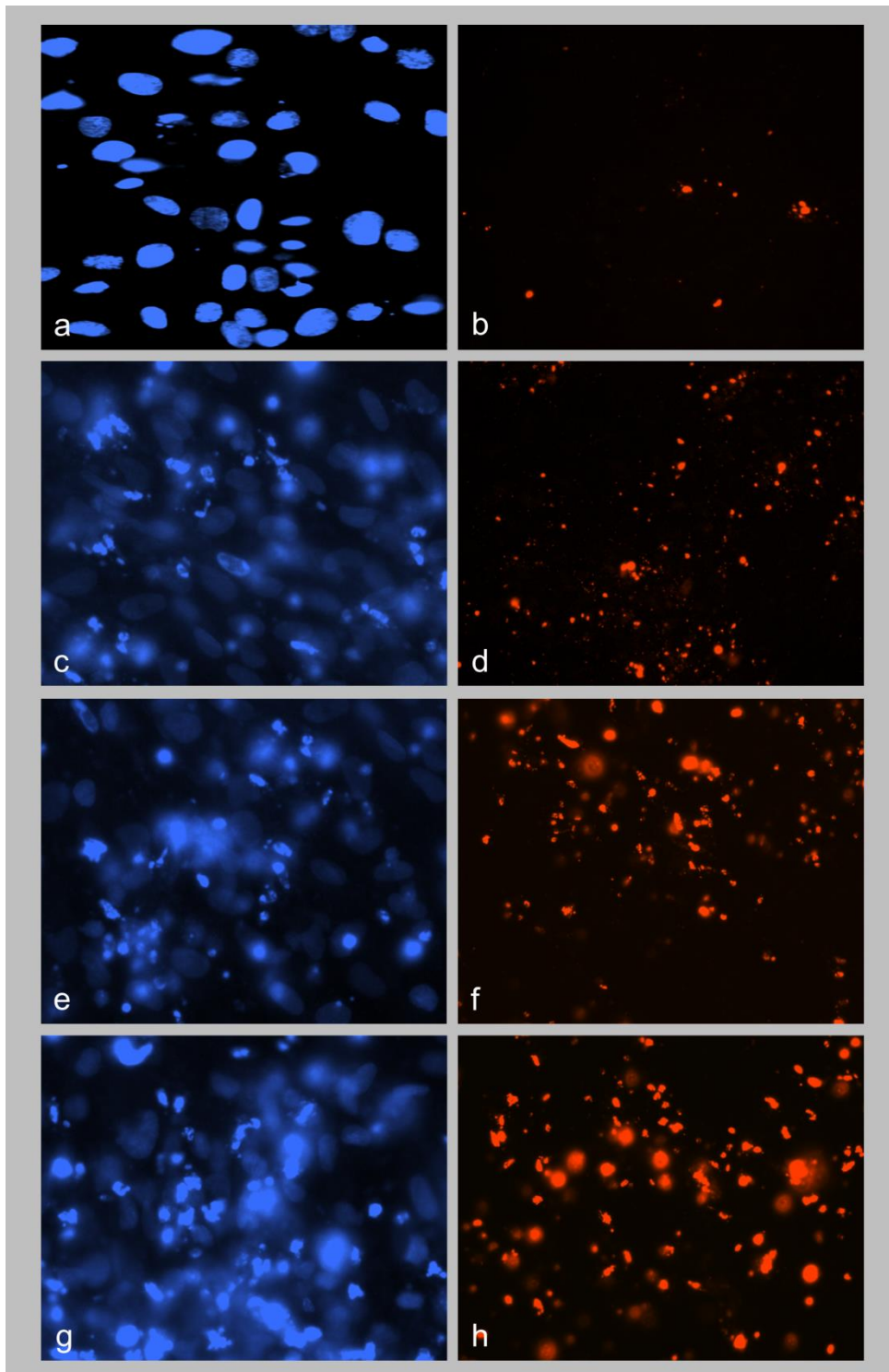


**Abb. 9:** Lichtmikroskopische Aufnahme von L6-Myozyten nach 72 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin im Vergleich zu einer Negativkontrolle.

(a) Negativkontrolle (NK) (b) 0,5 µM Simvastatin: Zellkörper etwas schlanker im Vergleich zur NK (c) 300 mg Daptomycin/l Medium: Zellverband etwas rarefiziert im Vergleich zur NK. (d) 10 µM Simvastatin: deutliche Lücken im Zellverband (★). (e) 10 µM Simvastatin: dargestellt sind schlanke Cytoplasma-Ausläufer. (f) Inkubation mit 10 µM Simvastatin und 300 mg Daptomycin/l Medium: Zunahme nicht-adhärenter, abgerundeter Zellen (Pfeile ←).



**Abb. 10:** Lichtmikroskopische Aufnahme von L6-Myozyten nach Färbung mit Hoechst 33258 (Bisbenzimid H 33258) und Propidiumiodid. (a) und (b) Darstellung weitgehend isomorpher, rundlicher Zellkerne mit Hoechst 33258 (Bisbenzimid H 33258). (c) Darstellung weniger Propidiumiodid-positiver Zellen bzw. Zellfragmente.



**Abb. 11:** Lichtmikroskopische Aufnahme von L6-Myozyten mit Hoechst 33258 (Bisbenzimid H 33258) und Propidiumiodid nach Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin über 72 h. (a) und (b): 0,5  $\mu$ M Simvastatin; (c) und (d): 300 mg Daptomycin/l Medium; (e) und (f): 10  $\mu$ M Simvastatin; (g) und (h): 10  $\mu$ M Simvastatin + 300 mg Daptomycin/l Medium.

### **3.2 Untersuchung der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Myozyten im MTT-Zytotoxizitätstest**

Die zytotoxische Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Myozyten wurde in der vorliegenden Arbeit mit dem Zytotoxizitätstest mit MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromid) weiter charakterisiert. Als statistisches Signifikanzniveau wurde stets  $p \leq 0,05$  gewählt. Im Rahmen von Vorversuchen wurde die Zytotoxizitätsanalyse zunächst für jede Substanz allein durchgeführt, um die zytotoxischen Konzentrationsbereiche für jede Substanz zu identifizieren. Diese Konzentrationsbereiche wurden dann nachfolgend weitergehend untersucht. Für Simvastatin wurde die NOEC (no observed effect concentration) ermittelt, d.h. diejenige Konzentration, bei der gerade noch kein zytotoxischer Effekt zu beobachten war, sowie die EC 50%, d.h. diejenige Konzentration, bei der die Extinktion im Vergleich zu der Negativkontrolle auf 50% gesunken ist. Für Daptomycin wurde ebenfalls eine NOEC ermittelt. Die EC 50% konnte im untersuchten Konzentrationsbereich nicht bestimmt werden, da auch bei der maximalen verwendeten Konzentration von 1000 mg Daptomycin/l Medium nur eine Reduktion der Extinktion um ca. ein Drittel bewirkt wurde.

#### **3.2.1 Bestimmung der Zytotoxizität der Infusionslösungen**

Es wurden verschiedene Konzentrationen von Simvastatin zwischen 0,01 und 30  $\mu\text{M}$ , verschiedene Konzentrationen von Daptomycin zwischen 1,6 und 500 mg/l Medium sowie die Kombination von 300 mg Daptomycin/l Medium und Simvastatin-Konzentrationen von 0,5 bis 3  $\mu\text{M}$  untersucht. Da die verwendeten Simvastatin- und Daptomycinlösungen 0,05% DMSO enthielten, wurde auch das Zellkulturmedium des Kontrollansatzes mit 0,05% DMSO versetzt. Es wurde das Protokoll des MTT-Zytotoxizitätstests über 10 Tage mit einer Anfangszellzahl von 2500 Zellen pro Well angewandt. Die L6-Myozyten zeigten bei dieser Einsaatdichte ein gutes Adhärenzverhalten und ließen sich problemlos anzüchten.

Für Simvastatin lag diejenige Konzentration, bei der die Extinktion im Vergleich zur Kontrolle noch nicht signifikant gesunken war (NOEC) bei ca. 0,1  $\mu\text{M}$ . Die EC 50% betrug 1  $\mu\text{M}$ . Im untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 0,01 und 30  $\mu\text{M}$  zeigte

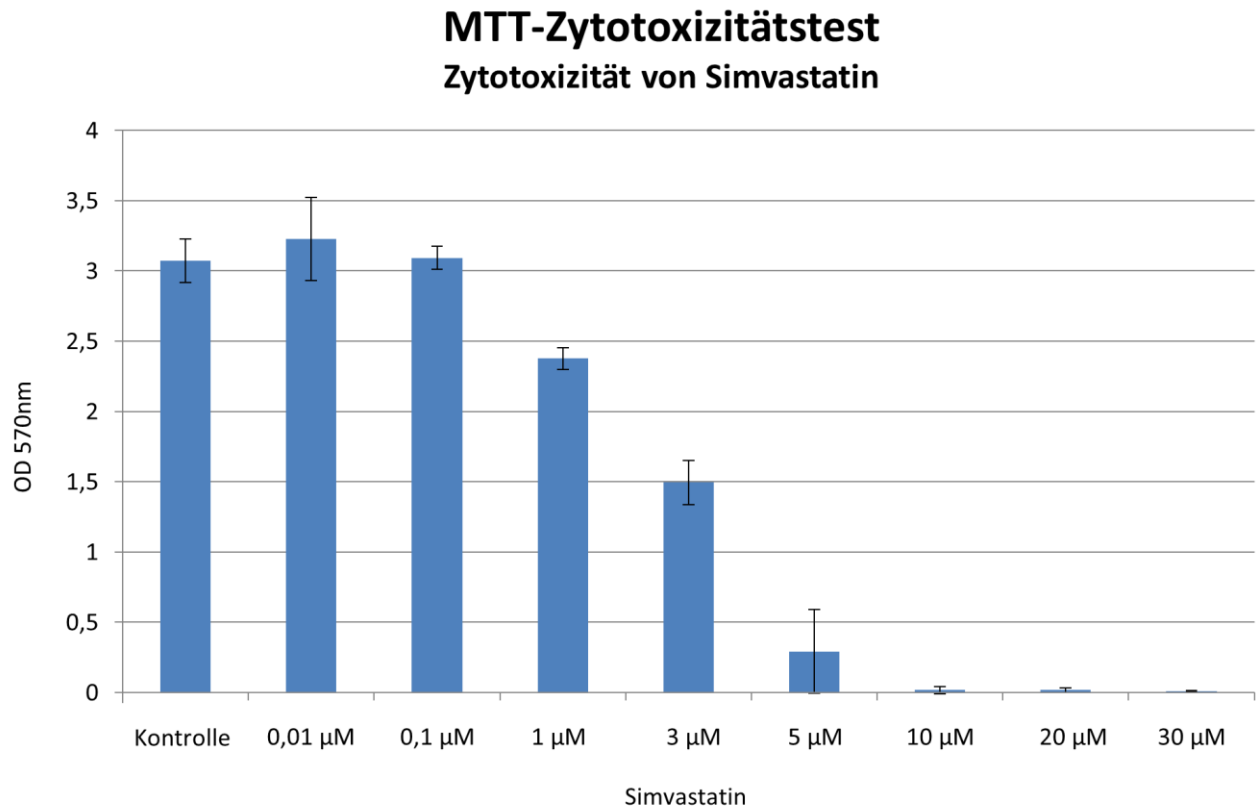
sich eine Hemmung der Viabilität der L6-Myozyten durch Simvastatin, die mit der Höhe der Simvastatin-Konzentration korrelierte (Abb. 12, Tab. 2).

In der Versuchsreihe mit Daptomycin in einem Konzentrationsbereich zwischen 1,6 und 500 mg/l Medium zeigte sich eine geringfügige Zunahme des hemmenden Effekts mit steigender Daptomycin-Konzentration. Die Konzentration Daptomyocins, bei der die Extinktion im Vergleich zum Kontrollansatz gerade noch nicht signifikant gesunken war, betrug 1,6 mg/l, die  $EC_{50}$  wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht erreicht. Insgesamt war der hemmende Effekt von Daptomycin im untersuchten Konzentrationsbereich eher gering. Bei der im Rahmen der Vorversuche verwendeten maximalen Konzentration von 500 mg Daptomycin/l Medium wurde eine Reduktion der Extinktion um ca. ein Drittel gemessen (Abb. 13, Tab. 3).

Nachdem die zytotoxischen Konzentrationsbereiche von Simvastatin und Daptomycin identifiziert waren, wurden in den weiterfolgenden Versuchen die drei verschiedenen Simvastatin-Konzentrationen, 0,5  $\mu$ M, 1  $\mu$ M und 3  $\mu$ M, jeweils mit 300 mg Daptomycin/l Medium kombiniert. Als statistisches Signifikanzniveau wurde stets  $p \leq 0,05$  gewählt.

Die kombinierte Gabe beider Substanzen führte zu einem hemmenden Effekt, welcher mit steigender Simvastatin-Konzentration zunahm und im Vergleich zur alleinigen Simvastatin-Inkubation gleicher Konzentration ohne Daptomycin signifikant größer war. Dabei war die durch Komedikation von Daptomycin bewirkte Zunahme der Zytotoxizität im Bereich der niedrigeren Simvastatin-Konzentrationen, 0,5  $\mu$ M und 1  $\mu$ M, größer als bei einer Simvastatin-Konzentration von 3  $\mu$ M.

Im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit 300 mg Daptomycin/l Medium, war die Zunahme der Zytotoxizität durch die Kombination mit einer 1  $\mu$ M und 3  $\mu$ M Simvastatinlösung signifikant größer. Bei der niedrigsten Simvastatin-Konzentration von 0,5  $\mu$ M Simvastatin war der Unterschied zwischen der alleinigen Gabe von Daptomycin und der Kombination mit Simvastatin nicht signifikant (Abb. 13, Tab. 4).



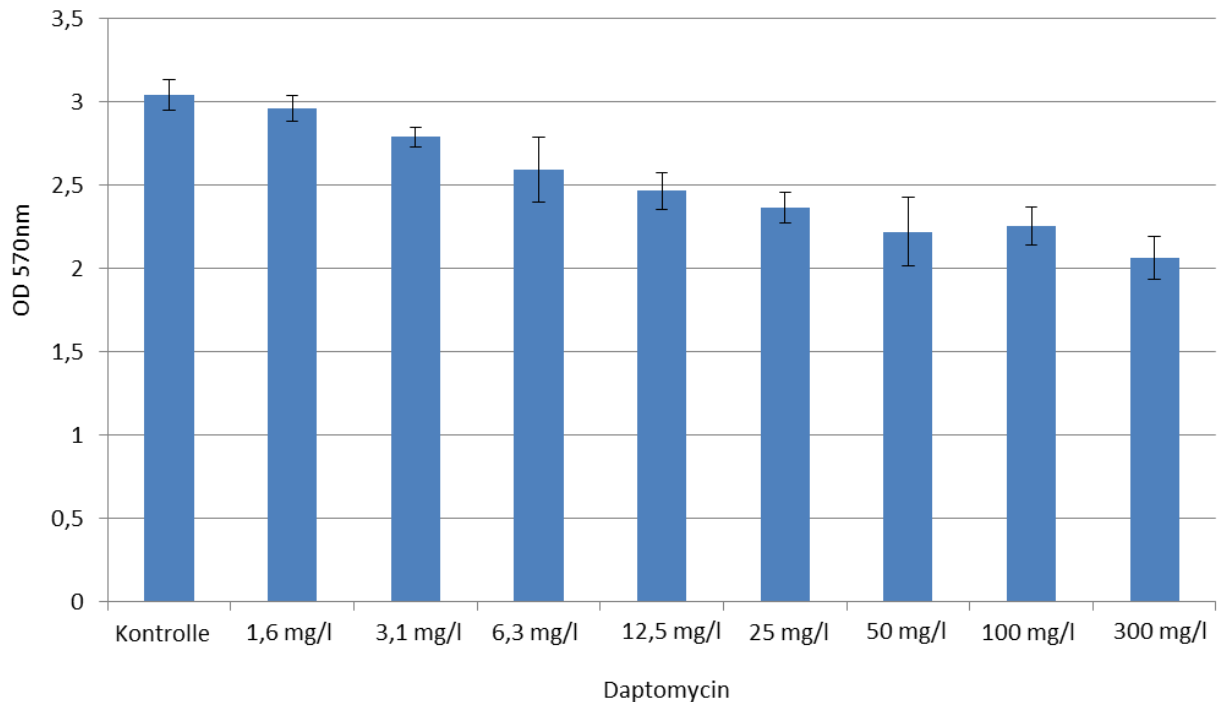
**Abb. 12:** MTT-Zytotoxizitätstest mit Simvastatin. Effekt einer 10-tägigen Inkubation von L6-Myozyten mit Simvastatin in einer Konzentration von 0,01 bis 30 µM im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Extinktion bei 570 nm (n = 12).

Simvastatin [µM]	MW	SD
-	3,07	± 0,15
<b>0,01</b>	3,23	± 0,30
<b>0,1</b>	3,09	± 0,08
<b>1</b>	2,38*	± 0,08
<b>3</b>	1,49*	± 0,16
<b>5</b>	0,29*	± 0,30
<b>10</b>	0,02*	± 0,03
<b>20</b>	0,02*	± 0,02
<b>30</b>	0,01*	± 0,00

**Tab. 2:** MTT-Zytotoxizitätstest mit Simvastatin über 10 d. Inkubation mit Simvastatin in einer Konzentration von 0,01 bis 30 µM. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und die Standardabweichungen (SD) der Extinktion bei 570 nm (n = 12, Univariate Varianzanalyse, Post-hoc-Test nach Bonferroni, \*p ≤ 0,05 behandelte Probe vs. Kontrolle).

## MTT-Zytotoxizitätstest

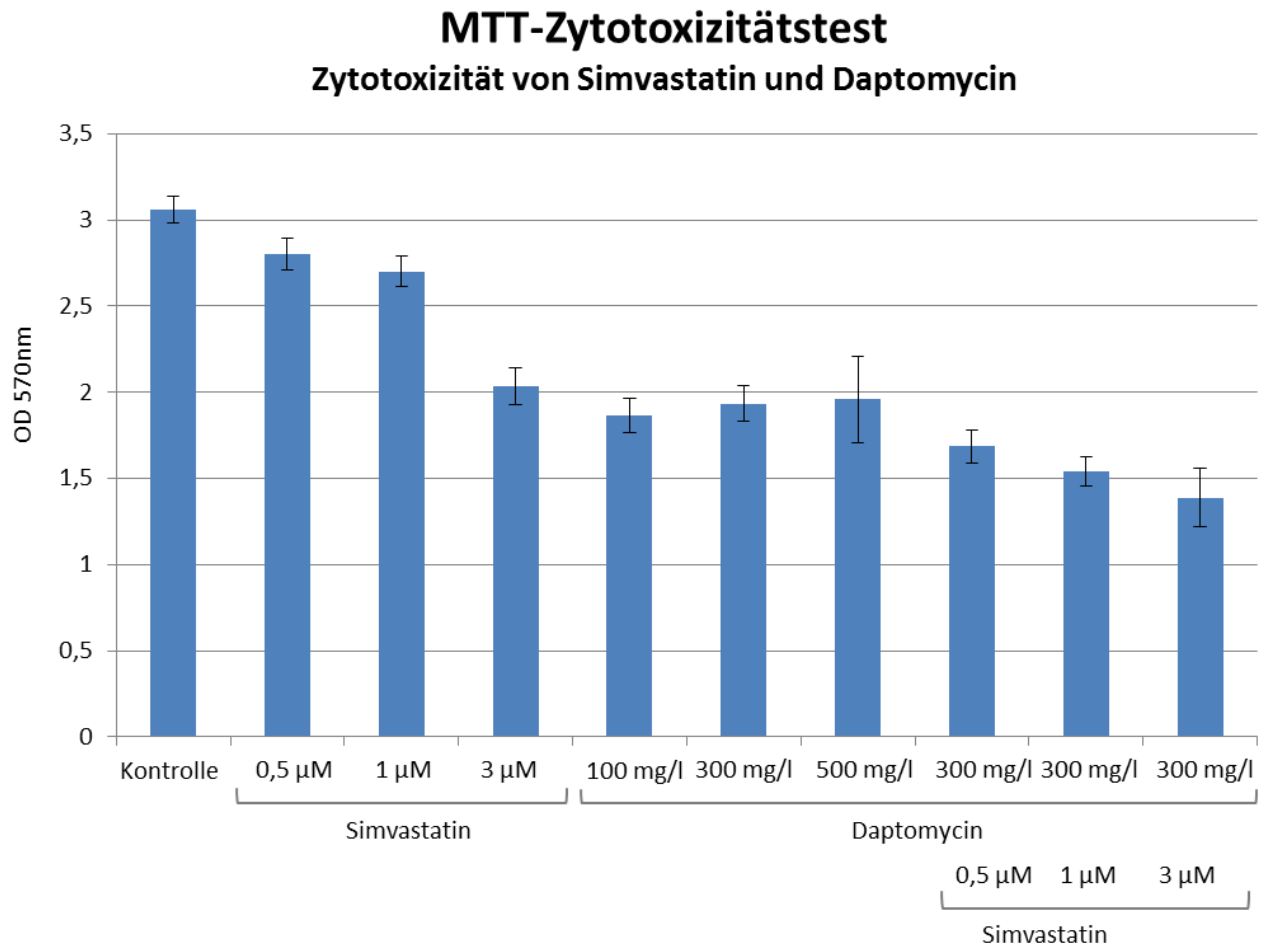
### Zytotoxizität von Daptomycin



**Abb. 13:** MTT-Zytotoxizitätstest mit Daptomycin. Effekt einer 10-tägigen Inkubation von L6- Myozyten mit Daptomycin in Konzentrationen von 1,6 bis 300 mg/l im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Extinktion bei 570 nm (n = 12).

Daptomycin [mg/l]	MW	SD
-	3,04	± 0,09
<b>1,6</b>	2,96	± 0,08
<b>3,1</b>	2,79*	± 0,06
<b>6,3</b>	2,59*	± 0,19
<b>12,5</b>	2,46*	± 0,11
<b>25</b>	2,36*	± 0,09
<b>50</b>	2,22*	± 0,21
<b>100</b>	2,25*	± 0,11
<b>300</b>	2,06*	± 0,13

**Tab. 3:** MTT-Zytotoxizitätstest mit Daptomycin über 10 d. Inkubation in Konzentrationen von 1,6 bis 300 mg/l Medium. Dargestellt sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Extinktion bei 570 nm (n = 12, Univariate Varianzanalyse, Post-hoc-Test nach Bonferroni, \*p ≤ 0,05 behandelte Probe vs. Kontrolle).



**Abb. 14:** MTT-Zytotoxizitätstest mit Simvastatin und Daptomycin. Effekt einer 10-tägigen Inkubation von L6-Myozyten mit Simvastatin in Konzentrationen von 0,5 bis 3 µM, Daptomycin in Konzentrationen von 100 bis 500 mg/l bzw. der Kombination von 300 mg Daptomycin/l Medium und Simvastatin in Konzentrationen von 0,5 bis 3 µM im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der Extinktion bei 570 nm (n = 24).



Simvastatin [ $\mu\text{M}$ ]	Daptomycin [mg/l]	MW	SD
-	-	3,03	$\pm 0,06$
<b>0,5</b>	-	2,85*	$\pm 0,07$
<b>1</b>	-	2,76*	$\pm 0,08$
<b>3</b>	-	1,90*	$\pm 0,08$
-	<b>100</b>	1,80*	$\pm 0,05$
-	<b>300</b>	1,93*	$\pm 0,10$
-	<b>500</b>	1,96*	$\pm 0,25$
<b>0,5</b>	<b>300</b>	1,69*	$\pm 0,10$
<b>1</b>	<b>300</b>	1,54*	$\pm 0,08$
<b>3</b>	<b>300</b>	1,39*	$\pm 0,17$

**Tab. 4:** MTT-Zytotoxizitätstest mit Simvastatin und Daptomycin über 10 d. Untersuchung der L6-Myozyten nach Exposition mit Simvastatin in einer Konzentrationen zwischen 0,5 und 3  $\mu\text{M}$ , Daptomycin in einer Konzentration zwischen 100 und 500 mg/l bzw. der Kombination von 300 mg Daptomycin/l Medium und Simvastatin in Konzentrationen zwischen 0,5 und 3  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Extinktion bei 570 nm ( $n = 24$ , Univariate Varianzanalyse, Post-hoc-Test nach Bonferroni, \* $p \leq 0,05$  behandelte Probe vs. Kontrolle).

### 3.3 Durchflusszytometrische Untersuchung der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf die Apoptose/Nekrose-Reaktion von L6-Myozyten mit Annexin V und Propidiumiodid

Um die im MTT-Test erhobenen Zytotoxizitätspotentiale von Simvastatin und Daptomycin, insbesondere die Zytotoxizität durch Kombination beider Substanzen im Vergleich zur Gabe einer Substanz allein, zu reevaluieren wurde im Folgenden die Wirkung der beiden Substanzen auf L6-Myozyten *in vitro* durchflusszytometrisch mit Doppelfärbung durch die Fluoreszenzfarbstoffe Annexin V und Propidiumiodid untersucht. In diesen Versuchen wurden verschiedene Konzentrationen von Simvastatin zwischen 3 und 10  $\mu\text{M}$ , eine Daptomycin-Konzentration von 300 mg/l Medium sowie die Kombination dieser Daptomycin- mit allen Simvastatin-Konzentrationen untersucht. Da die verwendeten Simvastatin- und Daptomycinlösungen 0,05% DMSO beinhalten, wurde auch das Zellkulturmedium des Kontrollansatzes mit 0,05% DMSO versetzt. Zuvor wurde im Rahmen der Vorversuche ein durchflusszytometrisch messbarer zytotoxischer Effekt von DMSO bis zu einer

Konzentration von 0,1% im Vergleich zu reinem Zellkulturmedium ausgeschlossen. Die Zellen wurden für 72 Stunden mit den Substanzen inkubiert. Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte unter Verwendung des Programmes „WinList“. Dabei wurde so ausgewertet, dass Annexin V- und Propidiumiodid- positive Zellen (doppelt positive Zellen) als nekrotische Zellen und doppelt negative Zellen als vitale Zellen gewertet wurden. Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Programmes „SPSS“ mit dem „Univariate General Linear Model“ sowie dem nachfolgenden Post-Hoc-t-Test nach Bonferroni durchgeführt. Als statistisches Signifikanzniveau wurde stets  $p < 0,05$  gewählt.

Bei einer Probenmessung wurden jeweils 10.000 L6-Myozyten im Durchflusszytometer untersucht. Da die Daten eine gute Übereinstimmung zeigten, konnten sie gepoolt werden ( $n = 42$ ). In den durchflusszytometrischen Untersuchungen unter den gewählten Versuchsbedingungen waren die Annexin-positiven Zellen ebenfalls Propidiumiodid-positiv. Es wurde daher in der Auswertung dieser Versuchsreihe zwischen Zellen, die Annexin- und Propidiumiodid-negativ waren, und Zellen, die Annexin- und Propidiumiodid-positiv waren, differenziert.

Im Vergleich zu der Negativkontrolle wurde der Anteil der Annexin- und Propidiumiodid-negativen Zellen durch die Inkubation mit Simvastatin verringert. Das heißt, der Anteil vitaler Zellen in der Zellpopulation nahm nach Exposition gegenüber Simvastatin ab. Nach 72-stündiger Exposition zeigte sich bereits bei einer Simvastatin-Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  eine signifikante Reduktion vitaler Zellen. Dieser Effekt korrelierte mit der Höhe der Simvastatin-Konzentration (Abb. 14, Tab. 5).

Nach Exposition gegenüber einer Lösung mit 300 mg Daptomycin/l Medium verzeichneten wir eine Reduktion der Zellvitalität, die in ihrem Ausmaß mit derjenigen nach Inkubation mit einer 3  $\mu\text{M}$  Lösung von Simvastatin vergleichbar war (Abb. 14, Tab. 5).

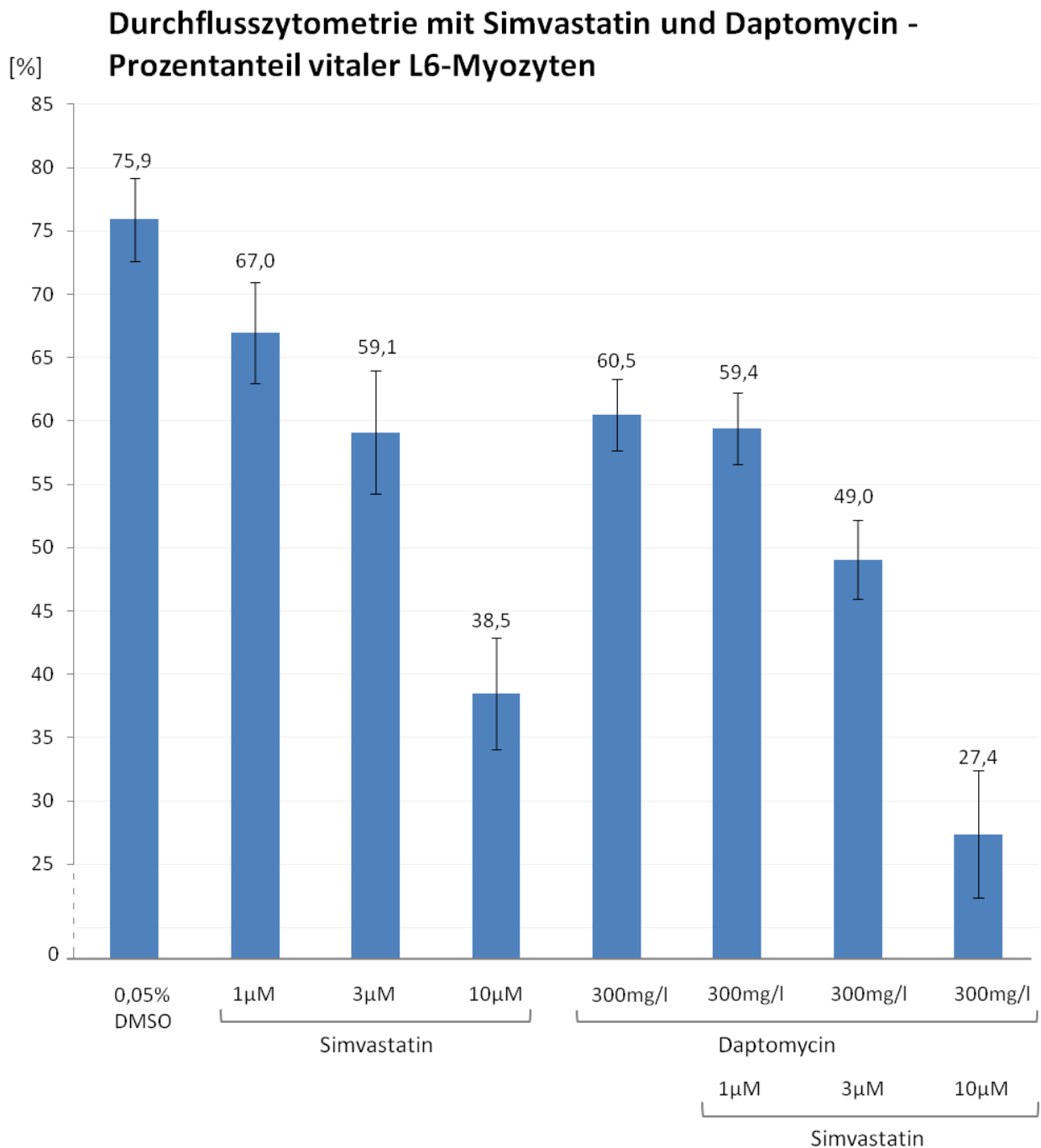
Die Kombination von 300 mg Daptomycin/l Medium mit den jeweiligen Simvastatin-Konzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zeigte ebenfalls eine Reduktion der Annexin V- und Propidiumiodid-negativen Zellen. Das Ausmaß der Reduktion vitaler Zellen korrelierte hierbei mit der Höhe der Simvastatin-Konzentration. Die Reduktion der Zellvitalität war im Vergleich zum Kontrollansatz stets signifikant.

Es wurde eine Post-Hoc-Analyse nach Bonferroni durchgeführt, um die Zytotoxizität durch Simvastatin allein mit der Zytotoxizität durch Kombination mit Daptomycin zu

vergleichen: es zeigte sich für alle drei untersuchten Simvastatin-Konzentrationen jeweils ein signifikanter Zuwachs der Zytotoxizität durch die zusätzliche Gabe von Daptomycin (Abb. 14, Tab. 5).

Ebenso wurde der zytotoxische Effekt durch Inkubation mit 300 mg Daptomycin/l Medium allein mit derjenigen durch Kombination dieser Daptomycin-Lösung mit einer Simvastatin-Lösung im Konzentrationsbereich zwischen 1 und 10  $\mu\text{M}$  verglichen. Hierbei zeigte sich, dass durch einen Zusatz von 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin kein signifikanter Anstieg der Zytotoxizität erreicht wurde. Bei einem Zusatz von 3  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin war der Unterschied signifikant (Abb. 14, Tab. 5).

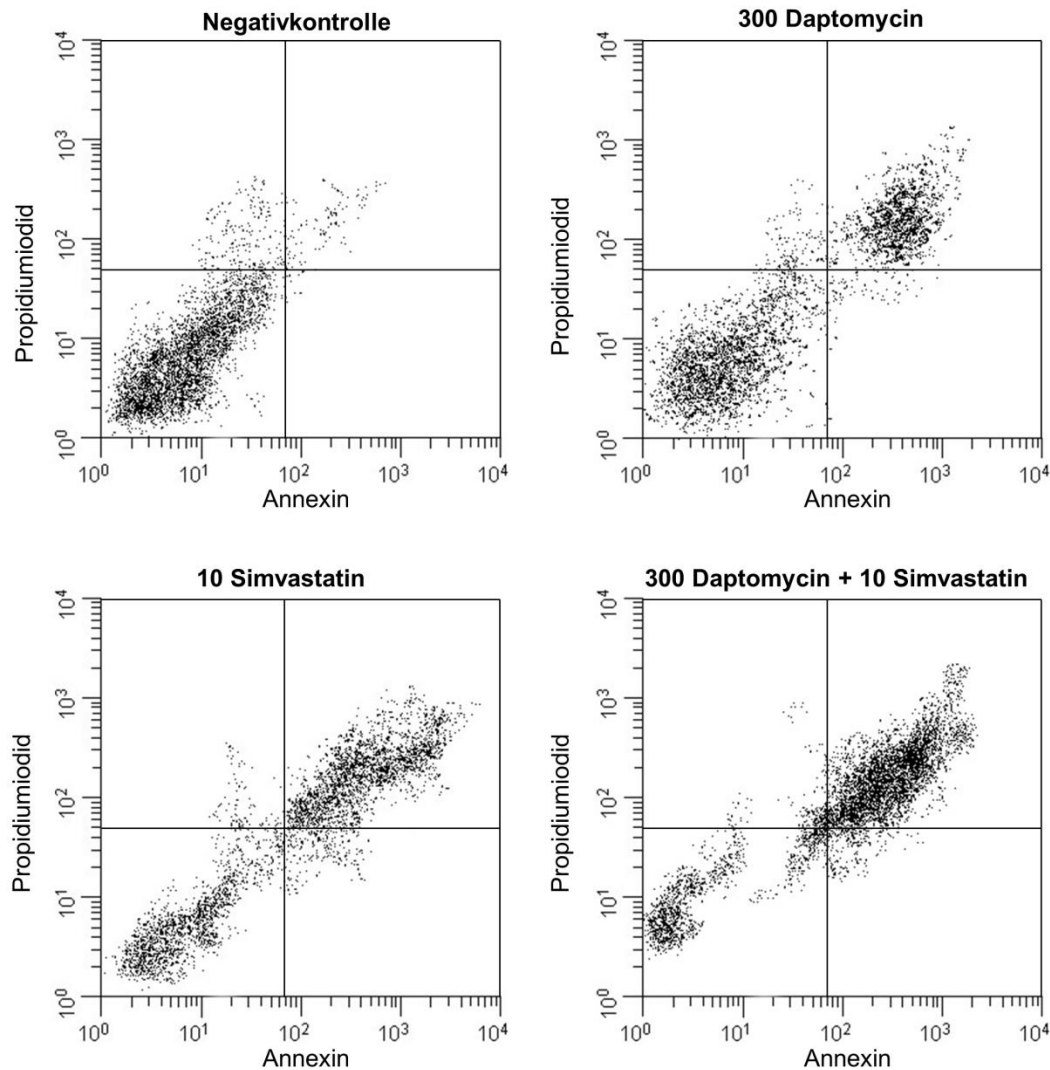
Diese Ergebnisse stimmen weitgehend mit den Ergebnissen aus dem MTT-Test dieser Arbeit überein. Bei letzterem zeigte sich allerdings ein geringfügig signifikanter Unterschied zwischen der Inkubation mit 300 mg Daptomycin/l Medium allein im Vergleich zu einer Inkubation mit 300 mg Daptomycin/l Medium und 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin. Im MTT-Zytotoxizitätstest wurden die Substanzen allerdings über 10 Tage inkubiert, vor der durchflusszytometrischen Analyse betrug die Expositionsdauer nur 72 Stunden.



**Abb. 15:** Durchflusszytometrische Untersuchung der L6-Myozyten mit Annexin V und Propidiumiodid nach 72-stündiger Exposition mit Simvastatin und Daptomycin. Inkubation mit Simvastatin in Konzentrationen von 1 bis 10 µM, Daptomycin in einer Konzentration von 300 mg/l Medium bzw. der Kombination von 300 mg Daptomycin/l Medium mit Simvastatin in Konzentrationen von 1 bis 10 µM im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der vitalen Zellen, die Annexin- und Propidiumiodid-negativ waren (n = 42).

Simvastatin [ $\mu\text{M}$ ]	Daptomycin [mg/l]	MW	SD
-	-	75,90	$\pm 3,27$
<b>1</b>	-	66,98*	$\pm 4,01$
<b>3</b>	-	59,10*	$\pm 4,87$
<b>10</b>	-	38,50*	$\pm 4,39$
-	<b>300</b>	60,48*	$\pm 2,81$
<b>1</b>	<b>300</b>	59,38*	$\pm 2,82$
<b>3</b>	<b>300</b>	49,05*	$\pm 3,13$
<b>10</b>	<b>300</b>	27,38*	$\pm 5,06$

**Tab. 5:** Durchflusszytometrie mit Annexin V und Propidiumiodid – Prozentanteil vitaler L6-Myozyten nach 72 h Inkubation mit Simvastatin und Daptomycin. Ergebnisse nach Inkubation mit verschiedenen Simvastatin-Konzentrationen (1 bis 10  $\mu\text{M}$ ), Daptomycin (300 mg/l Medium) bzw. der Kombination von Daptomycin (300 mg/l Medium) mit Simvastatin in Konzentrationen von 1 bis 10  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Dargestellt sind Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der Zellen, die Annexin- und Propidiumiodid-negativ waren in Prozent (n = 42, Univariate Varianzanalyse, Post-hoc-Test nach Bonferroni, \*p  $\leq$  0,05 behandelte Probe vs. Kontrolle).



**Abb. 16:** Ausgewählte Histogramme der Durchflusszytometrie mit Annexin V und Propidiumiodid. Beispielhaft dargestellt sind 4 Histogramme der durchflusszytometrischen Versuche nach 72-stündiger Exposition mit Simvastatin und Daptomycin. Die Fluoreszenz von Annexin auf der x-Achse ist der Fluoreszenz von Propidiumiodid auf der y-Achse gegenübergestellt. Vier Areale in jedem Histogramm unterteilen die Zellen in Zellpopulationen unterschiedlicher Fluoreszenzintensität. Das am Koordinatenursprung gelegene Areal enthält Annexin- und Propidiumiodid-negative Zellen, d.h. vitale Zellen. 300 Daptomycin = 300 mg Daptomycin/l Medium; 10 Simvastatin = 10  $\mu$ M Simvastatin.

### 3.4. Durchflusszytometrische Untersuchung der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf die Proliferation von L6-Myoblasten mit CFSE-Farbstoff

Neben den durchflusszytometrischen Untersuchungen mit differenzierten Myozyten wurde die Beeinflussung der Proliferationsrate von L6-Myoblasten durch Simvastatin und Daptomycin durchflusszytometrisch mit Hilfe des Farbstoffes CFSE untersucht.

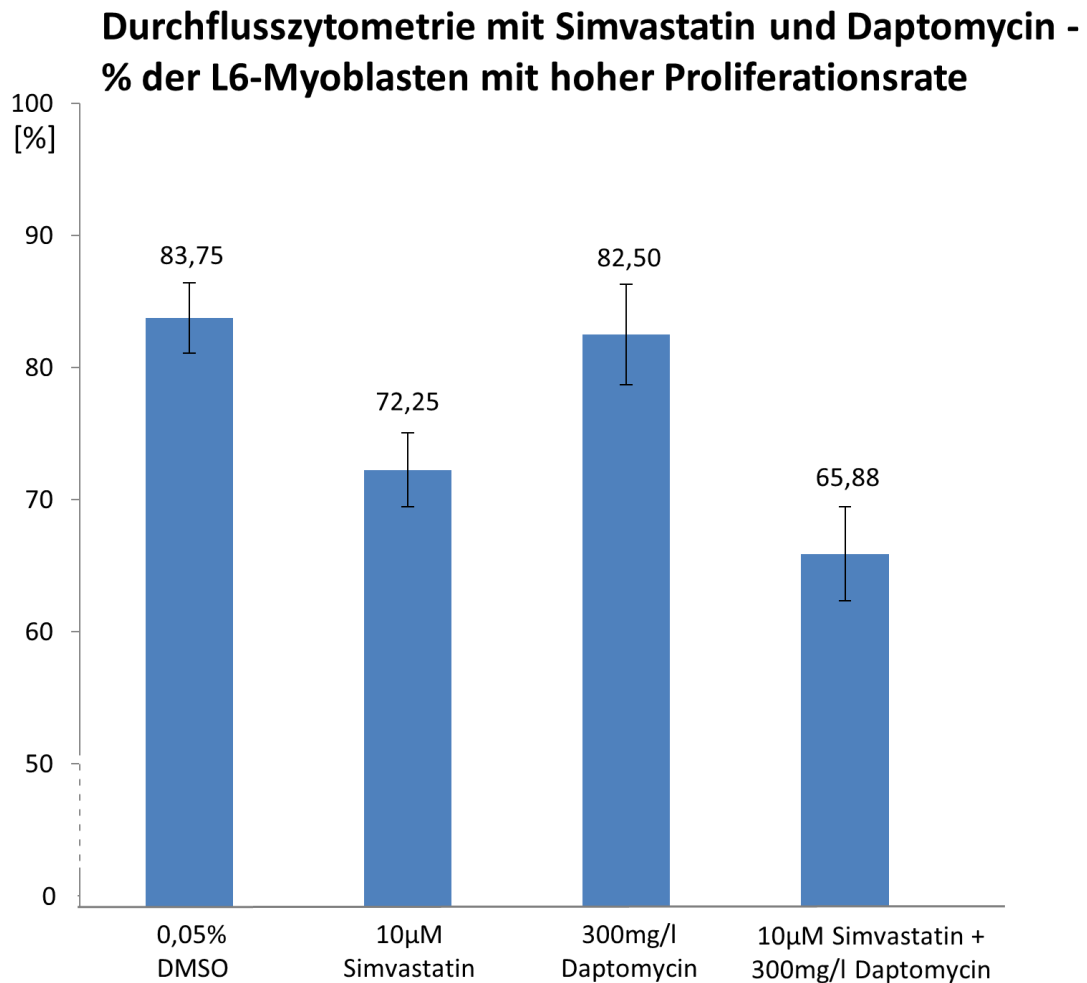
Der Farbstoff wird durch Licht einer Wellenlänge von ca. 488 nm angeregt und emittiert Licht einer Wellenlänge von ca. 517 nm. CFSE wird bei einer Zellteilung auf die Tochterzellen verteilt, sodass die Konzentration von CFSE in einer Zelle negativ mit der Proliferationsrate der Zellpopulation korreliert.

In diesen Versuchen zeigte sich kein Unterschied in der Proliferationsrate der Zellen nach Exposition mit einer Lösung mit 300 mg Daptomycin/l Medium über 24 h im Vergleich zu einer Negativkontrolle. Dagegen wurde eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate der L6-Myoblasten nach 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu$ M Simvastatin im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle gemessen. Die Proliferationsrate war ebenfalls signifikant niedriger im Vergleich zur Exposition mit 300 mg Daptomycin/l Medium (Abb. 15, Tab. 6).

Die Inkubation mit einer Lösung mit 10  $\mu$ M Simvastatin und 300 mg Daptomycin/l Medium bewirkte eine Reduktion der Proliferationsrate, die im Vergleich zur Negativkontrolle und zur alleinigen Inkubation mit Daptomycin signifikant war, aber nicht signifikant unterschiedlich im Vergleich zu der Exposition gegenüber 10  $\mu$ M Simvastatin allein (Abb. 15, Tab. 6).

Simvastatin [ $\mu$ M]	Daptomycin [mg/l]	MW	SD
-	-	83,75	$\pm$ 2,67
<b>10</b>	-	72,25*	$\pm$ 2,82
-	<b>300</b>	82,50	$\pm$ 3,82
<b>10</b>	<b>300</b>	65,88	$\pm$ 3,56

**Tab. 6:** Durchflusszytometrie mit CFSE - Prozentanteil der L6-Myoblasten mit einer hohen Proliferationsrate nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin. Ergebnisse nach 24 h Inkubation mit 10  $\mu$ M Simvastatin und/oder 300 mg Daptomycin/l Medium im Vergleich zu einer Negativkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) der L6-Myoblasten mit einer hohen Proliferationsrate in Prozent (n = 8, Univariate Varianzanalyse, Post-hoc-Test nach Bonferroni, \*p  $\leq$  0,05 behandelte Probe vs. Kontrolle).



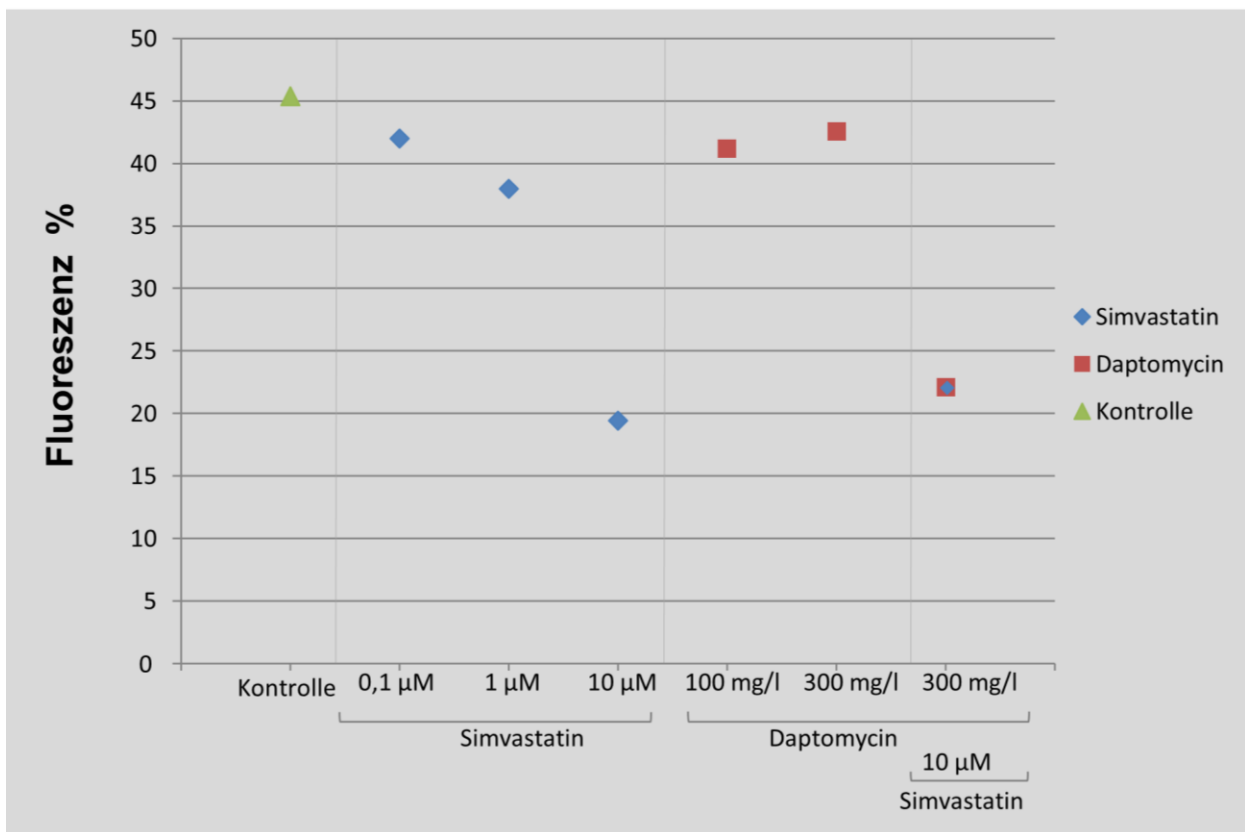
**Abb. 17:** Durchflusszytometrische Untersuchung der Proliferationsrate von L6-Myoblasten mit CFSE nach 24-stündiger Exposition mit Simvastatin und/oder Daptomycin. Inkubation mit 10 µM Simvastatin und/oder 300 mg Daptomycin/l Medium im Vergleich zur Negativkontrolle mit 0,05% DMSO. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen des Prozentanteils der Zellen mit einer hohen Proliferationsrate (n = 8).



### 3.4 Immunhistologische Untersuchungen der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Zellen

Die Effekte von Simvastatin und Daptomycin, allein und in Kombination, auf verschiedene intrazelluläre Proteine, die die Zellstruktur, die Apoptosereaktion und weitere intrazelluläre Signalkaskaden vermitteln, wurden mit immunhistologischen Untersuchungen semiquantitativ bestimmt.

#### 3.4.1. Rho-Protein



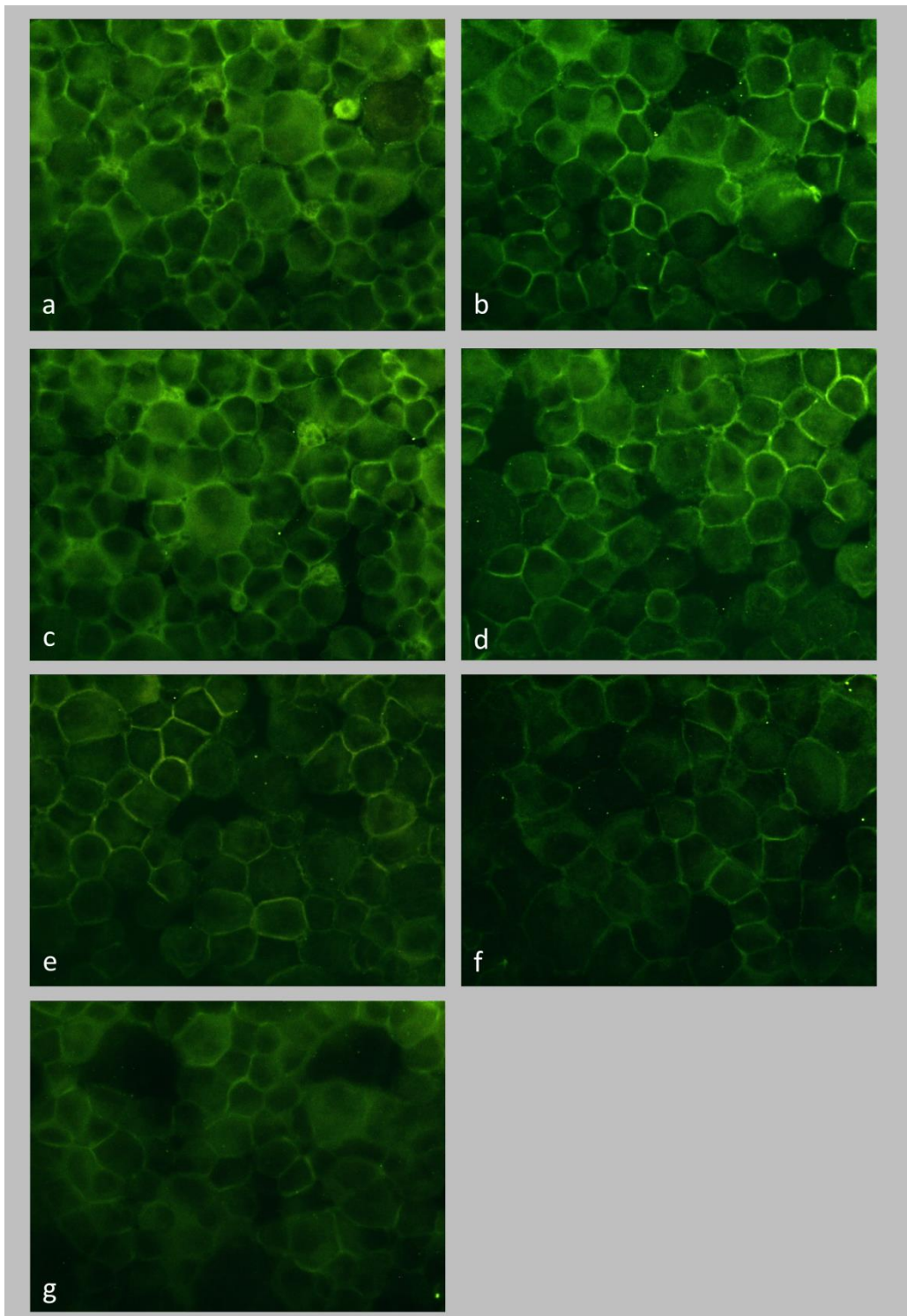
**Abb. 18:** Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen Rho-Protein. Abgebildet ist der Median der Fluoreszenz nach 24-stündiger Inkubation der L6-Myozyten mit Simvastatin und/oder Daptomycin in verschiedenen Konzentrationen und einer Negativkontrolle mit 0,05% DMSO (n = 5).

Simvastatin [ $\mu\text{M}$ ]	Daptomycin [mg/l]	MD	SD
-	-	45,37	$\pm 8,43$
<b>0,1</b>	-	41,99	$\pm 9,73$
<b>1</b>	-	37,97	$\pm 4,44$
<b>10</b>	-	19,45	$\pm 4,71$
-	<b>100</b>	41,14	$\pm 5,30$
-	<b>300</b>	42,55	$\pm 4,40$
<b>10</b>	<b>300</b>	22,08	$\pm 7,27$

**Tab. 7:** Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen Rho-Protein nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und Daptomycin. Dargestellt sind Median (MD) und Standardabweichungen (SD) der Fluoreszenz der Zellen in Prozent nach Inkubation mit Simvastatin und Daptomycin in verschiedenen Konzentrationen und einer Negativkontrolle mit 0,05% DMSO.

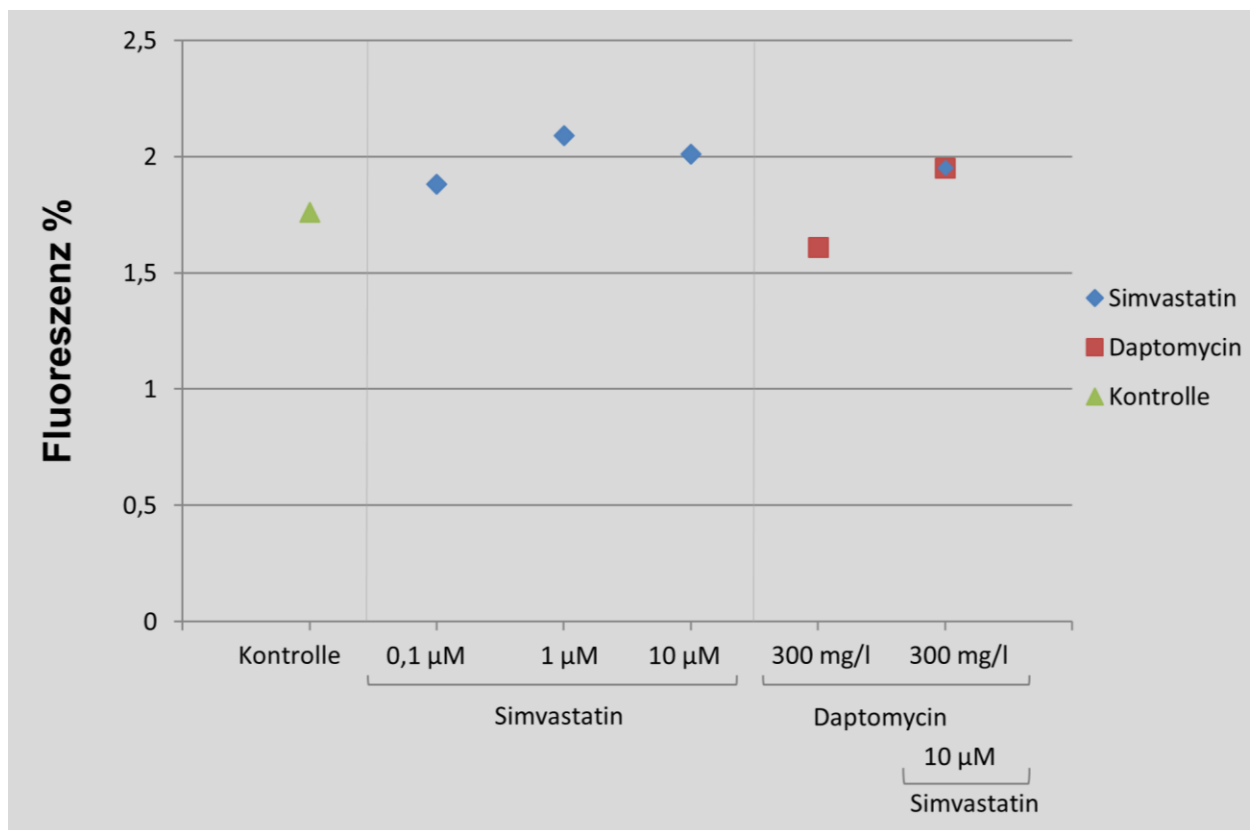
Es wurde die Wirkung von Simvastatin und Daptomycin nach 24-stündiger Inkubation auf die Expression von Rho-Protein in L6-Myozyten immunhistochemisch untersucht. Wie in Abbildung 16, 17 und Tabelle 7 dargestellt, zeigte sich für Simvastatin im untersuchten Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  eine konzentrationsabhängige Reduktion der Fluoreszenz des Anti-Rho-Antikörpers. Dies bedeutet, dass die Expression von Rho-Protein in L6-Myozyten im untersuchten Konzentrationsbereich mit steigender Simvastatin-Konzentration abnahm. Bei einer Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  Simvastatin war der Unterschied zur Negativkontrolle nach 24 Stunden Inkubation noch nicht eindeutig, aber nach Exposition gegenüber 1 bzw. 10  $\mu\text{M}$  im Vergleich zur Kontrolle signifikant.

Für Daptomycin wurde in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 300 mg Daptomycin/l Medium keine Veränderung der Fluoreszenz im Vergleich zu der Kontrolle gemessen. Ebenso bewirkt die Zugabe von Daptomycin in einer Konzentration von 300 mg/l Medium zu einer 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin-Lösung keine Veränderung der Fluoreszenz im Vergleich zur alleinigen Exposition mit 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin (Abb. 16, Abb. 17, Tab. 7).



**Abb. 19:** Bilder der immunhistologischen Analysen der L6-Myozyten nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin und Färbung mit einem Antikörper gegen Rho-Protein. (a) Negativkontrolle (b) 100 mg Daptomycin/l Medium (c) 300 mg Daptomycin/l Medium (d) 0,1  $\mu$ M Simvastatin (e) 1  $\mu$ M Simvastatin (f) 10  $\mu$ M Simvastatin (g) 10  $\mu$ M Simvastatin + 300 mg Daptomycin/l Medium.

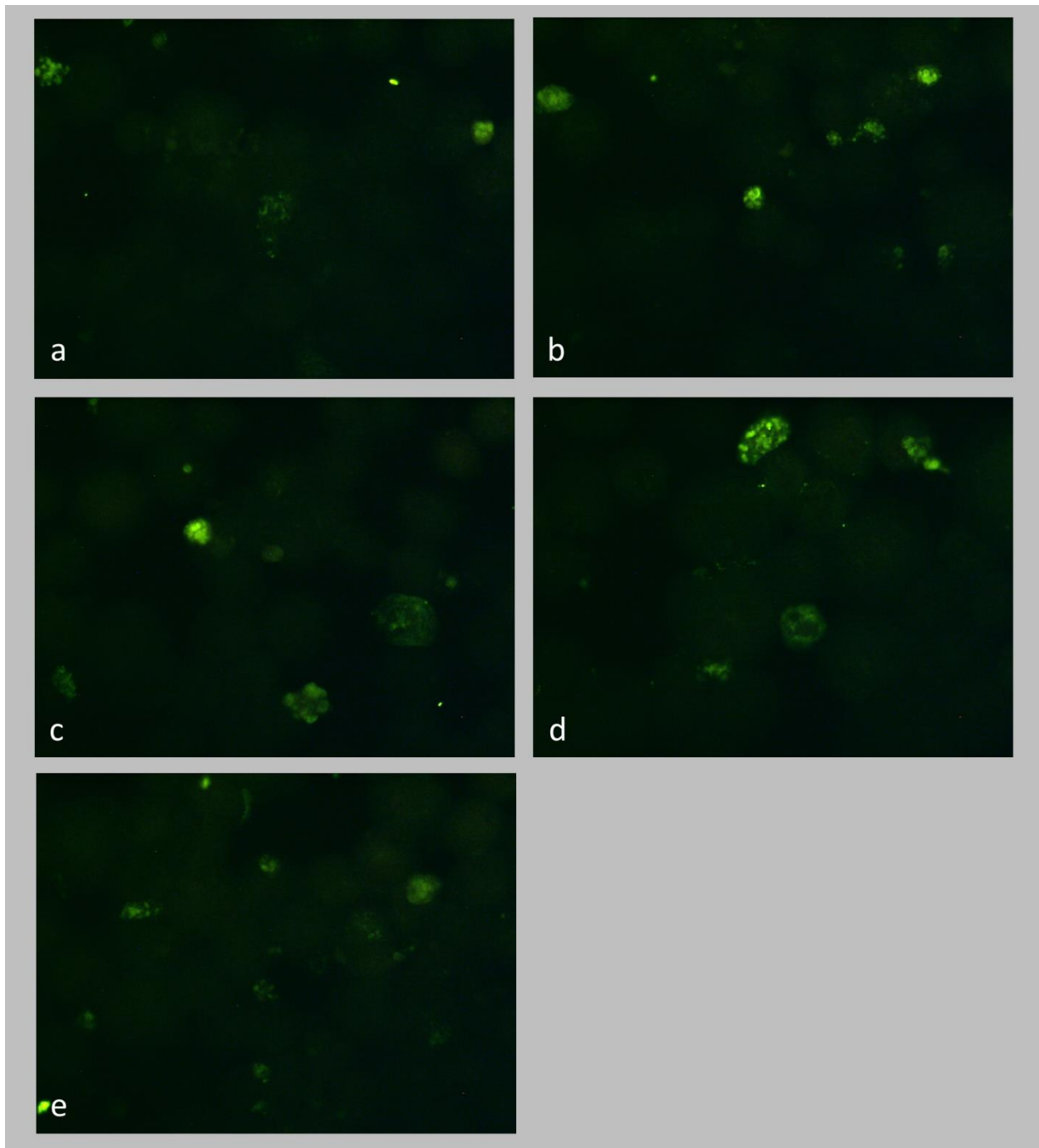
## 3.4.2 Caspase 3



**Abb. 20:** Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3. Abgebildet ist der Median der Fluoreszenz nach 24-stündiger Inkubation der L6-Myozyten mit Simvastatin und/oder Daptomycin in verschiedenen Konzentrationen und einer Negativkontrolle mit 0,05% DMSO (n = 5).

Simvastatin [µM]	Daptomycin [mg/l]	MD	SD
-	-	1,76	± 1,09
<b>0,1</b>	-	1,88	± 0,90
<b>1</b>	-	2,09	± 0,92
<b>10</b>	-	2,01	± 0,98
-	<b>300</b>	1,61	± 0,57
<b>10</b>	<b>300</b>	1,95	± 0,80

**Tab. 8:** Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3 nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin. Dargestellt sind Median (MD) und Standardabweichungen (SD) der Fluoreszenz der Zellen in Prozent nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin in verschiedenen Konzentrationen und einer Negativkontrolle mit 0,05% DMSO.

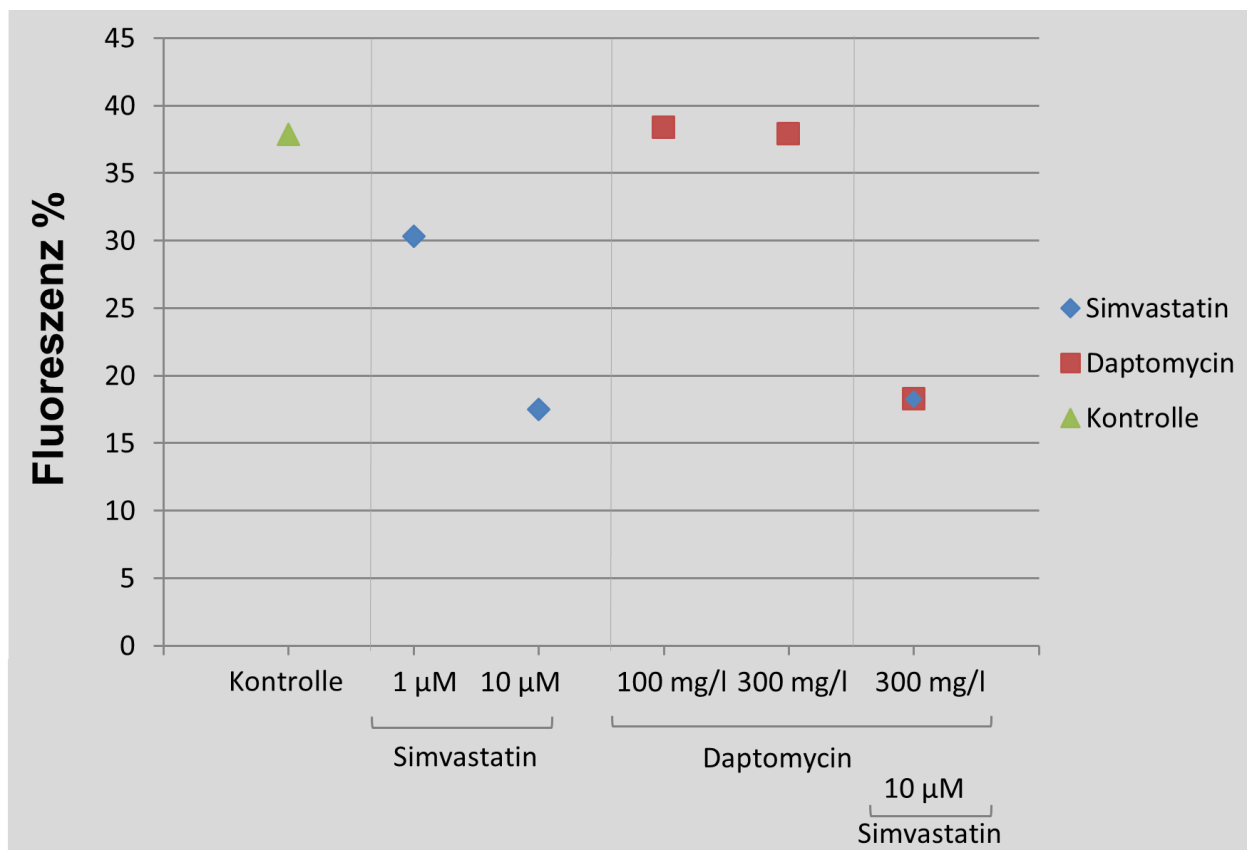


**Abb. 21:** Bilder der immunhistologischen Untersuchungen der L6-Myozyten nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin und Färbung mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3. (a) Negativkontrolle (b) 300 mg Daptomycin/l Medium (c) 1  $\mu$ M Simvastatin (d) 10  $\mu$ M Simvastatin (e) 10  $\mu$ M Simvastatin + 300 mg Daptomycin/l Medium.

Es wurde die Wirkung von Simvastatin und Daptomycin nach 24-stündiger Inkubation auf die Expression von Caspase 3 in L6-Myozyten immunhistochemisch untersucht. Wie in Abbildung 18, 19 und Tabelle 8 dargestellt, zeigte sich für Simvastatin im

untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 0,1 und 10  $\mu\text{M}$  und für Daptomycin in einer Konzentration von 300 mg/l Medium kein Unterschied in der Fluoreszenz des Antikörpers gegen Caspase 3. Auch die Kombination von 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin und 300 mg Daptomycin/l Medium führte nach 24 h nicht zu einer veränderten Fluoreszenz im Vergleich zu einer Negativkontrolle (Abb 18., Abb. 19. und Tab. 8).

### 3.4.3. Vimentin



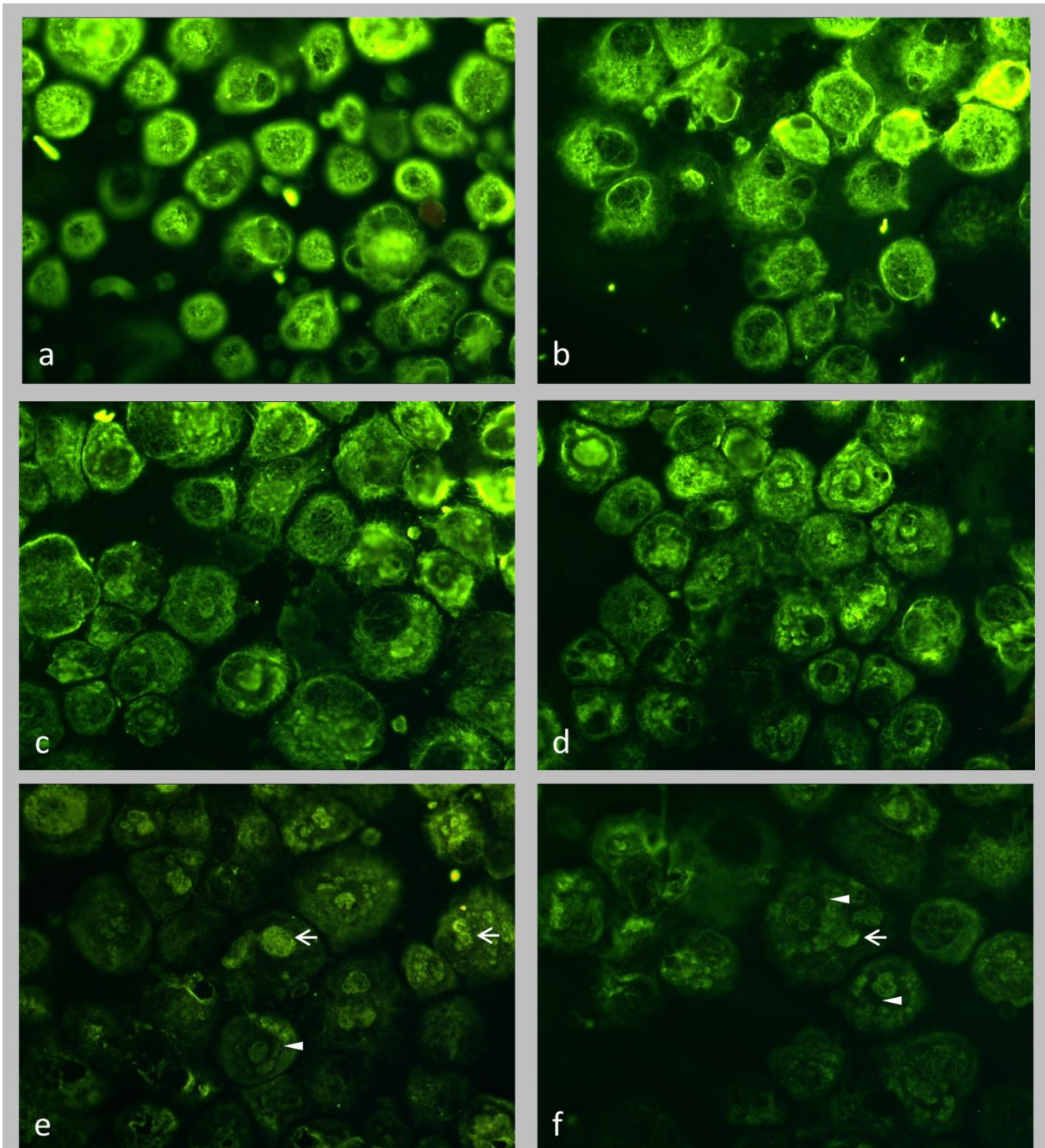
**Abb. 22:** Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen Vimentin. Abgebildet ist der Median der Fluoreszenz nach 24-stündiger Inkubation der L6-Myozyten mit Simvastatin und/oder Daptomycin in verschiedenen Konzentrationen und einer Negativkontrolle mit 0,05% DMSO (n = 5).

Simvastatin [ $\mu\text{M}$ ]	Daptomycin [mg/l]	MD	SD
-	-	37,86	$\pm 2,93$
<b>1</b>	-	30,31	$\pm 1,74$
<b>10</b>	-	17,49	$\pm 3,76$
-	<b>100</b>	38,41	$\pm 2,62$
-	<b>300</b>	37,90	$\pm 4,08$
<b>10</b>	<b>300</b>	18,31	$\pm 4,39$

**Tab. 9:** Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen Vimentin nach 24 h Inkubation der L6-Myozyten mit Simvastatin und/oder Daptomycin. Dargestellt sind Median (MD) und Standardabweichungen (SD) der Fluoreszenz der Zellen in Prozent nach Inkubation mit Simvastatin und Daptomycin in verschiedenen Konzentrationen und einer Negativkontrolle mit 0,05% DMSO.

Es wurde die Wirkung von Simvastatin und Daptomycin nach 24-stündiger Inkubation auf die Expression von Vimentin in L6-Myozyten immunhistochemisch untersucht. Wie in Abbildung 20 und 21 und Tabelle 9 dargestellt, zeigte sich für Simvastatin im untersuchten Konzentrationsbereich von 1 bis 10  $\mu\text{M}$  eine konzentrationsabhängige Reduktion der Fluoreszenz des Anti-Vimentin-Antikörpers. Dies bedeutet, dass die Expression von Vimentin in L6-Myozyten im untersuchten Konzentrationsbereich mit steigender Simvastatin-Konzentration abnahm. Nach 24 Stunden Inkubation war der Unterschied zur Negativkontrolle bei einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin bereits signifikant. Nach Exposition gegenüber 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin stellte sich außerdem in einigen Zellen immunhistochemisch eine Kondensation des sonst netzartig abgebildeten Vimentins dar (Abb. 21. e und f).

Für Daptomycin in einem Konzentrationsbereich von 100 bis 300 mg Daptomycin/l Medium wurde keine Veränderung der Fluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle gemessen. Ebenso bewirkt die Zugabe von Daptomycin in einer Konzentration von 300 mg/l Medium zu einer 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin-Lösung keine Veränderung der Fluoreszenz im Vergleich zur alleinigen Exposition mit 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin (Abb. 20, Abb. 21, Tab. 9).



**Abb. 23:** Bilder der immunhistologischen Analysen der L6-Myozyten nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin und Färbung mit einem Antikörper gegen das Intermediärfilament Vimentin. (a) Negativkontrolle (b) 100 mg Daptomycin/l Medium (c) 300 mg Daptomycin/l Medium (d) 1 µM Simvastatin (e) 10 µM Simvastatin (f) 10 µM Simvastatin + 300 mg Daptomycin/l Medium. Vor allem bei (e) und (f) sichtbare Kondensierung von Vimentin ( ← ) und Lücken in der netzartigen Struktur des Vimentin-Zytoskelettes ( ◄ ).



## 4. Diskussion

Statine werden weltweit in der Therapie der Hypercholesterinämie und Dyslipidämie eingesetzt. Sie führen zu einer Senkung der Morbidität und Mortalität koronarer Herzerkrankungen und reduzieren die Prävalenz großer vaskulärer Ereignisse (Baigent et al., 2005; Lardizabal et al., 2011).

Die Behandlung mit Statinen wird vor allem durch ihre myotoxische Wirkung limitiert, die zu einer Myalgie, Muskelschwäche, einer Myositis und einer Erhöhung der Creatinphosphokinase im Serum führen kann (Tomlinson et al., 2005). Es wird vermutet, dass milde Verläufe einer Myositis mit unspezifischen Myalgien vielfach nicht erkannt werden; ihre Häufigkeit wird auf ca. 1 bis 10% geschätzt (Bruckert et al., 2005; Law et al., 2006; Vaklavas et al., 2009). Ein erhöhtes Risiko besteht bei sportlicher Aktivität mit Erhöhung der Inzidenz von Muskelkrämpfen, -schmerzen und -schwäche auf ca. 25% (Dirks et al., 2006; Tomlinson et al., 2005).

Als schwerste Form der Statin-vermittelten Muskelschädigung ist eine Rhabdomyolyse mit einer Inzidenz von 3,4 von 100.000 Personenjahren beschrieben (Black, 2002; Graham et al., 2004). In 10 bis 15% führt die Rhabdomyolyse durch eine Myoglobinurie zu einer akuten Niereninsuffizienz (Ward, 1988), die mit einer Mortalität von 7 bis 80% assoziiert ist (Brivet et al., 1996). Ursächlich ist die Statin-induzierte Rhabdomyolyse in ca. 59% auf Arzneimittelinteraktionen zurückzuführen (Bellosta et al., 2004; Law et al., 2006). Es ist daher von großer Relevanz für die klinische Praxis, das myotoxische Potential der Kombination von Statinen mit anderen Arzneimitteln einschätzen zu können.

Einzelne Fallberichte suggerieren eine erhöhte Myotoxizität durch Arzneimittelinteraktionen von Statinen und dem Antibiotikum Daptomycin (Bland et al., 2011; Odero et al., 2009). Daptomycin ist ein intravenös verabreichtes Antibiotikum aus der Gruppe der cyclischen Lipopeptide mit bakterizider Wirkung gegenüber grampositiven Erregern, einschließlich Vancomycin- und Linezolid-resistenten Erregern und dem Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus*. Das Antibiotikum ist im Allgemeinen gut verträglich und weist bei einer Monotherapie ein geringes Myopathie-Risiko von ca. 0,2% auf (Arbeit et al., 2004).

In klinischen Studien beim Menschen ist unter einer Therapie mit 6 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht bei einer gleichzeitigen oder in geringem zeitlichen Abstand erfolgten Behandlung mit Simvastatin eine Erhöhung der Creatinphosphokinase erfasst worden (Fachinformation Cubicin® 2013). In einzelnen Fallberichten ist außerdem eine Rhabdomyolyse unter einer Komedikation dokumentiert worden, die nach Absetzen von einem der beiden Wirkstoffe, Simvastatin oder Daptomycin, regredient war (Berg et al., 2014; Bland et al., 2011; Odero et al., 2009). Diese Fallberichte suggerieren einen möglichen additiven oder synergistischen myotoxischen Effekt durch eine gleichzeitige Therapie mit Statinen und Daptomycin, welcher in anderen Studien kontrovers diskutiert wird (Golightly et al., 2013; Parra-Ruiz et al., 2012). Gemäß aktuellen Therapieleitlinien wird eine gleichzeitige Behandlung mit Daptomycin und Statinen nicht empfohlen und es existiert nur wenig klinische Erfahrung diesbezüglich. Insbesondere vor dem Hintergrund einer möglichen iatrogen induzierten Rhabdomyolyse mit einer hohen Morbidität und Mortalität ist es wichtig, das myotoxische Potential einer gleichzeitigen Therapie mit Daptomycin und Statinen weiter aufzuklären. In der vorliegenden Arbeit wurde daher modellhaft die Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Myozyten *in vitro* untersucht. Es wurde der Einfluss auf die Zellmorphologie, auf verschiedene intrazelluläre Proteine und auf die Apoptose bzw. Nekrose von differenzierten L6-Myozyten sowie auf die Proliferation von L6-Myoblasten untersucht.

L6-Myozyten sind eine Muskelzelllinie, welche durch eine hohe Proliferationsrate und eine schnelle Insulin-sensitive Differenzierung gekennzeichnet ist. Die Zellen wurden vielfach zur Untersuchung der Wirkung von verschiedenen Substanzen auf Muskelzellen verwendet und die Bedingungen für ihr Wachstum und ihre Differenzierung untersucht (D'Amore et al., 1986; Klip, 1984; Klip et al., 1990; Smith, 1990). Wie von verschiedenen Autoren beschrieben, wurde in dieser Arbeit nachvollzogen, dass die Präsenz von Insulin und Pferdeserum im Zellkulturmedium die Differenzierung von konfluierenden L6-Myoblasten zu Myotuben fördert (McCusker et al., 1988; Pinset et al., 1985; Lawson et al., 2000). Die Differenzierung der L6-Myoblasten zu Myozyten wurde während der Zellkultur lichtmikroskopisch beobachtet. Der Differenzierungsgrad der Zellen ist für die Untersuchungen relevant, da für Myoblasten und Myozyten Unterschiede in der Suszeptibilität und Reaktion auf Fremdstoffe biologisch plausibel sind und in einem ähnlichen Versuchsansatz mit

Daptomycin für Primärkulturen von Muskelzellen der Ratte nachgewiesen wurden (Kostrominova et al., 2010 a).

Im Allgemeinen eignen sich Zelllinien gut für In-vitro-Studien, da die Zellen auf eine vorhersehbare Art wachsen und auch bei vielfacher Passage ihre zelltypspezifischen Eigenschaften nicht verlieren. Da die Wirkung von Simvastatin und Daptomycin primär auf Myozyten überprüft werden sollte, ist es weiterhin von Vorteil, dass der Fibroblasten-Anteil der L6-Myozyten vernachlässigbar gering ist.

Die Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Zellen *in vitro* kann als Modell für eine mögliche Wirkung der Substanzen auf Muskelzellen des Menschen *in vivo* dienen. Zum einen können aber artspezifische Unterschiede bestehen, die eine unterschiedliche Suszeptibilität oder Reaktion auf äußere Reize bedingen. Zum anderen fehlen *in vitro* weitere Einflussfaktoren des menschlichen Organismus, wie z.B. Faktoren der Inflammationskaskade *in vivo* bei einer Myositis.

### **4.1 Statin-induzierte Effekte auf Muskelzellen *in vitro* und *in vivo***

Der in dieser Arbeit untersuchte Konzentrationsbereich von Simvastatin wurde gewählt, da sich bei diesen Konzentrationen in anderen In-vitro-Zytotoxizitätsstudien verschiedener Autoren ein Effekt Simvastatins abgezeichnet hatte (Kobayashi et al., 2008; Matzno et al., 1997, 2003, 2005). Alle Konzentrationsangaben von Simvastatin in dieser Arbeit bezogen sich auf die eingesetzte Lacton-Form. Da in den hier beschriebenen Experimenten keine analytischen Untersuchungen bzgl. der Anteile der Simvastatin-Metabolite durchgeführt wurden, können keine exakten Konzentrationsangaben der Metabolite gegeben werden. Eine fast vollständige, spontane Umwandlung der Lacton- in die Säureform Simvastatins wurde *in vitro* innerhalb von 24 Stunden in Serum-haltigem Kulturmedium beschrieben (Masters et al., 1995). Da sich die Konzentrationen der Lacton- und der Säureform Simvastatins im menschlichen Serum stärker unterscheiden (Shitara et al., 2006), ist ein Vergleich der In-vitro-Konzentrationen in dieser Arbeit und der  $c_{max}$  *in vivo* nur eingeschränkt möglich. Beim Menschen werden unter einer Behandlung mit einer mittleren, täglichen Simvastatin-Dosierung von 40 mg per os maximale Serumkonzentrationen ( $c_{max}$ ) der Säureform Simvastatins von ca. 20 bis 80 nM gemessen (Bellosta et al., 2012; Shitara et al., 2006). Radioenzymatische Untersuchungen ließen auf eine maximale Gesamt-Serumkonzentration von Simvastatin und seinen Metaboliten von 0,3 +/- 0,1 µM nach

einer 10-tägigen Gabe von 40 mg Simvastatin p.o./d und von 0,7 +/- 0,3 µM nach einer 10-tägigen Gabe von 80 mg Simvastatin p.o./d zurückschließen (Prueksaritanont et al., 2001). Die Simvastatin-Serumspiegel beim Menschen werden außerdem durch verschiedene Medikamenten-Wechselwirkungen beeinflusst. Beispielsweise wird durch eine Interaktion mit Grapefruit-Saft nach einer einmaligen Einnahme von 60 mg Simvastatin per os eine  $c_{max}$  von 0,4 +/- 0,1 µM erreicht (Lilja et al., 1998). Medikamenteninteraktionen oder genetisch bedingte Risikofaktoren führen zu einer durchschnittlichen Erhöhung der  $c_{max}$  der Säureform Simvastatins auf ca. 1 µM (Skottheim et al., 2008).

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit zeigten einen konzentrationsabhängigen, zellschädigenden Effekt auf differenzierte L6-Myozyten durch Simvastatin, dem eine steile Konzentrations-Wirkungsbeziehung zugrunde liegt.

Unter regelhaften Zellkulturbedingungen wachsen L6-Myozyten als Monolayer adhärent am Boden der Zellkulturflasche und bilden spindelförmige, multinukleäre Myotuben mit weitgehend isomorphen, rundlichen Zellkernen aus (Yaffe, 1968). Nach einer Exposition über 72 Stunden führte Simvastatin bei der höchsten untersuchten Konzentration von 10 µM, zu einem Verlust der Adhärenz der Zellen und einer Lösung der L6-Myozyten aus ihrem Zellverband. Bei dieser Simvastatin-Konzentration zeigten sich außerdem eine Fragmentierung bzw. Kondensierung der Zellkerne und ein Nachweis nekrotischer Zellfragmente. Die Schädigung durch Simvastatin war konzentrationsabhängig und bei einer Konzentration von 0,5 µM nach 72-stündiger Exposition nicht eindeutig.

In einem zehntägigen MTT-Zytotoxizitätstest mit Simvastatin in einem Konzentrationsbereich von 0,05 bis 3 µM konnte die zytotoxische Wirkung von Simvastatin auf L6-Myozyten als konzentrations- und zeitabhängig charakterisiert werden. Bei dieser langen Expositionsdauer ließen sich zytotoxische Effekte schon bei wesentlich niedrigeren Simvastatin-Konzentrationen nachweisen. Die Konzentration von Simvastatin, bei der gerade noch kein zytotoxischer Effekt zu sehen war („no observed effect concentration“, NOEC), betrug ca. 0,1 µM Simvastatin. Ca. 1 µM Simvastatin wurde als diejenige Konzentration identifiziert, bei der die Extinktion im Vergleich zu einem Kontrollansatz mit unbehandelten Zellen auf 50% gesunken war („50% effect concentration“,  $EC_{50}$ ). 1 µM Simvastatin ist also die Konzentration, bei der die Zellviabilität auf ca. 50% reduziert wurde. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen der L6-Myozyten nach Färbung mit Annexin und Propidiumiodid

bestätigten eine konzentrationsabhängige Reduktion vitaler L6-Myozyten *in vitro* nach 72 Stunden Exposition mit Simvastatin in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10  $\mu\text{M}$ . Bei allen durchflusszytometrischen Versuchen mit L6-Myozyten und Annexin- und Propidiumiodid-Färbung in dieser Arbeit waren die Annexin-positiven L6-Myozyten auch Propidiumiodid-positiv. Es ließen sich also nur zwei Zellpopulationen nachweisen, eine Propidium-positiv und eine Propidium-negative Population. Bei der quantitativen Auswertung der Wirkung von Simvastatin wurden daher nur vitale Zellen von Zellen mit einer porösen Zellmembran, d.h. spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen, differenziert. Denkbar ist, dass unter den Versuchsbedingungen dieser Arbeit keine Apoptose induziert wurde oder dass nur späte Phasen der Apoptosereaktion mit einer bereits beschädigten Zellmembran bzw. nekrotische Zellen erfasst wurden und daher keine ausschließlich Annexin-positiven Zellen gemessen wurden. Alternativ in Betracht zu ziehen wären, dass zellspezifische Eigenschaften der L6-Myozyten dazu führten, dass die Zellpopulation der rein Annexin-positiven und der Annexin- und Propidiumiodid-positiven Zellen durchflusszytometrisch nicht eindeutig voneinander zu differenzieren sind.

Neben den durchflusszytometrischen Untersuchungen mit differenzierten Myozyten wurde die Beeinflussung der Proliferationsrate von L6-Myoblasten durch Simvastatin durchflusszytometrisch mit Hilfe des Farbstoffes CFSE untersucht. In diesen Versuchen zeigte sich eine signifikante Reduktion der Proliferationsrate der L6-Myoblasten nach 24-stündiger Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Im Gegensatz dazu wurde im Rahmen von Vorversuchen zu dieser Arbeit unter den gleichen Versuchsbedingungen durchflusszytometrisch noch keine signifikante Apoptose bzw. Nekrose in L6-Myoblasten gemessen. Simvastatin führte also in der gleichen Dosierung und Expositionszeit, in der es noch keine Apoptose induziert, bereits zu einer Zellschädigung in Form einer Proliferationshemmung. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass die Proliferationsrate von L6-Myoblasten sensibler durch Simvastatin beeinflusst wird als die Apoptoseregulation.

Die in dieser Arbeit nachgewiesene konzentrationsabhängige Apoptose/Nekrose, Karyolyse und Zellfragmentierung von L6-Myozyten durch Simvastatin stimmten mit den publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen gut überein. Auch Matzno und Kollegen beschrieben einen konzentrationsabhängigen, toxischen Effekt von Simvastatin auf L6-Myoblasten und L6-Myozyten *in vitro*. Sie zeigten, dass Simvastatin in L6-Myoblasten

nach 96-stündiger Exposition in einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  die Fusion der Myoblasten hemmt und bei 3  $\mu\text{M}$  zu einer schwerwiegenden Zellschädigung führt. Nach einer Exposition gegenüber 3  $\mu\text{M}$  Simvastatin beobachteten sie in differenzierten L6-Myozyten nach 48-stündiger Exposition eine Karyopyknose und nach 72 Stunden eine ausgeprägte Schädigung der Muskelfasern (Matzno et al., 1997). Die selbe Arbeitsgruppe untersuchte lichtmikroskopisch die Wirkung verschiedener Statine auf undifferenzierte L6-Myoblasten *in vitro* und ordnete die Statine entsprechend ihrem Zytotoxizitätspotential folgendermaßen ein: Cerivastatin > Fluvastatin > Simvastatin > Atorvastatin > Pravastatin (Matzno et al., 2003). In anderen In-vitro-Studien wurde gezeigt, dass Statine auch in weiteren Zellen des Muskelgewebes, wie glatten Muskelzellen, Perizyten, Myoblasten und Myotuben der Skelettmuskulatur der Ratte und Primärkulturen differenzierter humaner Skelettmuskelzellen, aber auch in rheumatoiden Synovialzellen und Lymphoblasten, eine Apoptose induzieren können (Dirks et al., 2006; Johnson et al., 2004; Matzno et al., 2005; Mutoh et al., 1999; Sacher et al., 2005).

Im Gegensatz zu dem eindeutigen Nachweis einer Statin-vermittelten Apoptose von Skelettmuskelzellen *in vitro*, zeigte sich *in vivo* kein Anstieg von Apoptosemarkern durch Statine (Dirks et al., 2006; Meador et al., 2010; Seachrist et al., 2005). Eine Schädigung von Myozyten mit einem Anstieg der Creatinphosphokinase wurde durch Kobayashi und Kollegen bei Wistar Ratten *in vivo* nach Gabe von Cerivastatin in einer hohen Dosierung von 10 mg pro Kilogramm Körpergewicht dargelegt (Kobayashi et al., 2008).

In Humanstudien wurde die Myotoxizität von Statinen hauptsächlich in Form von randomisiert-kontrollierten Studien sowie Beobachtungsstudien erfasst. Bei den randomisiert-kontrollierten Studien wurden einige Patientengruppen durch ihr verstärktes Risikoprofil bereits in den Vorstudien ausgeschlossen. Einige Autoren vermuteten daher, dass die Inzidenz einer Myopathie in diesen Studien unterschätzt werden könnte (Jacobson, 2008). Tatsächlich war die Inzidenz unerwünschter Muskelbeschwerden in randomisiert-kontrollierten Studien mit ca. 1,5 – 5% (Joy et al., 2009; Law et al., 2006) niedriger als in einer großen Beobachtungsstudie mit 7942 Patienten, in der bei 10,5% der Patienten muskuläre Beschwerden erfasst wurden (Bruckert et al., 2005).

Als wichtige Patienten-assoziierte Risikofaktoren für eine Statin-vermittelte Myopathie wurden das weibliche Geschlecht, ein höheres Alter, eine renale oder hepatische Insuffizienz und ein Diabetes mellitus identifiziert (Huerta-Alardín et al., 2005). Gemäß neueren Erkenntnissen existieren auch genetische Risikofaktoren. Gendefekte, die eine primäre Myopathie verursachen, und Polymorphismen der Gene, die für Cytochrom P450, muskeleigene Enzyme oder für das hepatische Transportprotein OATP1 (organic anion-transporting polypeptide 1) kodieren, erhöhen das Risiko einer Statin-vermittelten Myopathie (Meador et al., 2010; Mastaglia et al., 2012; Voora et al., 2009).

Der Pathomechanismus der Statin-induzierten Apoptose wird seit vielen Jahren kontrovers diskutiert. Es gibt verschiedene In-vitro-Studien, die auf einen Mangel an Isoprenoiden als Ursache der Statin-induzierten Apoptose von Skelettmuskelzellen und glatten Muskelzellen hinweisen (Guijarro et al., 1998; Vaklavas et al., 2009). Statine reduzieren durch die Hemmung der Beta-HMG-CoA-Reduktase nicht nur die Synthese von Cholesterol, sondern auch die Bildung der Isoprenoide Farnesylpyrophosphat (FPP) und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). Diese Isoprenoide werden in einer als „Prenylierung“ bezeichneten Reaktion an spezifische Proteine gebunden und vermitteln deren Bindung an die Zellmembran. Diese „Verankerung“ an der Zellmembran ist für die regelrechte Funktion der Proteine entscheidend. Es wird vermutet, dass die Statin-induzierte Dysprenylierung von Proteinen über die Aktivierung der Caspasen 9 und 3 eine mitochondrial vermittelte Apoptose induziert (Dirks et al., 2006; Johnson et al., 2004; Nakagawa et al., 1998; Sacher et al., 2005).

In-vitro-Studien verschiedener Autoren mit unterschiedlichen Muskelzellen unterstützen die Theorie eines für die Muskeltoxizität ursächlichen Isoprenoidmangels, ergaben aber kontroverse Ergebnisse darüber, ob ein Mangel an FPP oder an GGPP entscheidend ist (Cao et al., 2009; Flint et al., 1997; Guijarro et al., 1998; Hanai et al., 2007; Itagaki et al., 2009; Matzno et al., 2005; Nishimoto et al., 2003; Sakamoto et al., 2007)

Die Prenylierung mit Geranylgeranylpyrophosphat ist auch für Rho-Proteine, kleine G-Proteine, welche unter anderem in der Zytoskelettbildung und der Vermittlung der Zelladhäsion beteiligt sind, entscheidend (Sakamoto et al., 2013). In der vorliegenden Arbeit wurde eine Abnahme der Expression des Rho-Proteins in L6-Myozyten nach einer Exposition über 24 Stunden mit Simvastatin in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 10  $\mu\text{M}$  gezeigt. Dies ist gut vereinbar mit der Theorie einer Dysprenylierung durch Statine, die für die Schädigung der Muskelzellen ursächlich sein könnte.

Eine vermehrte Expression von Caspase 3 in L6-Myozyten wurde in der vorliegenden Arbeit nach 24 Stunden Inkubation mit Simvastatin in einer Konzentration von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  allerdings nicht gemessen. Ein alternativer Versuchsansatz mit einer verlängerten Inkubationsdauer über 48 Stunden war für die Immunhistochemie nicht gut geeignet. Nach 48-stündiger Simvastatin-Exposition war ein großer Anteil der Myozyten nicht mehr adhären und ging bereits in den Arbeitsschritten für die Immunhistochemie verloren.

Die Isoprenoide Farnesylpyrophosphat und Geranylgeranylpyrophosphat sind unter anderem für die Zytoskelettbildung, die Zelladhäsion, -migration und -viabilität relevant (Sakamoto et al., 2013). Es ist daher wahrscheinlich, dass Statine einen Effekt auf Elemente des Zytoskeletts haben. In der vorliegenden Arbeit zeigten sich nach 24-stündiger Exposition mit Simvastatin in Konzentrationen von 1 bis 10  $\mu\text{M}$  eine reduzierte Expression und eine Strukturveränderung des Zytoskelett-Proteins Vimentin in L6-Myozyten. Darüber hinaus war mikroskopisch sichtbar, dass sich die apoptotischen/nekrotischen Zellen aus dem Zellverband herauslösten. Dies könnte auf eine Schädigung von Zytoskelettproteinen und Zell-Zellverbindungen zurückzuführen sein. In kardialen Fibroblasten wurde *in vitro* nachgewiesen, dass Simvastatin in Konzentrationen von 0,1 bis 10  $\mu\text{M}$  nach 24 Stunden das Aktin-Zytoskelett und den fokalen Adhäsionskomplex aus Vinculin und Paxillin zerstörte und die Zelladhäsion, Migration und Viabilität der Fibroblasten reduzierte (Copaja et al., 2012). Ebenso wurde bei F3II-Mammakarzinomzellen *in vitro* eine Abrundung der Zellen nach Statinexposition mikroskopisch gezeigt. Korrelierend stellte sich immunhistochemisch eine Disruption von Aktinfilamenten, Mikrotubuli und Fokalkontakten der Zellen dar (Farina et al., 2002). Die Störung der Zytoskelett-Struktur könnte zu der anti-metastatischen Wirkung von Statinen beitragen (Farina et al., 2002).

Eine weitere Theorie bzgl. der Pathogenese der Muskelschädigung ist, dass die Dysprenylierung über eine gestörte intrazelluläre Signalkaskade einen Mangel an zellulären Wachstumsfaktoren verursacht, welche den Zelltod vermitteln (Vaklavas et al., 2009). Für humane Fibroblasten wurde *in vitro* gezeigt, dass Lovastatin eine hemmende Wirkung auf die Wachstumsfaktoren *epidermal growth factor*, Insulin und *Insulin-like growth factor 1* hat. Es wurde vermutet, dass Lovastatin hierdurch den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus verhindert (Vincent et al., 1991).



Die vorliegende Arbeit weist daraufhin, dass Simvastatin die Proliferation von L6-Myoblasten reduziert. Dies wäre mit einer hemmenden Wirkung von Simvastatin auf den Zellzyklus der L6-Myoblasten vereinbar. In verschiedenen malignen Zellen wurde eine Unterbrechung des Zellzyklus durch Statine *in vitro* nachgewiesen (Crosbie et al., 2013; Meador et al., 2010; Jakóbsiak et al., 1991; Sánchez et al., 2008).

Weitere In-vitro-Studien ergaben den Hinweis, dass die Inhibition einiger alternativer Schritte der Cholesterolsynthese keine Muskelschädigung provoziert. Die Hemmung der Squalen-Synthase bzw. der Squalen-Epoxidase in murinen bzw. humanen Myotuben *in vitro* war nicht zytotoxisch (Flint et al., 1997; Johnson et al., 2004; Matzno et al., 1997; Nishimoto et al., 2003). Dies unterstützt die Theorie, dass die Dysprenylierung ein ursächliches Element der Myotoxizität von Statinen ist.

Es könnte daher diskutiert werden, in der Therapie der Hypercholesterinämie des Menschen ein alternatives Enzym der Cholesterinsynthese zu hemmen. Tierexperimentelle Daten aus Studien mit Mäusen bzw. Ratten weisen allerdings daraufhin, dass die Dysprenylierung durch Statine für ihre pleiotrope Wirkung entscheidend sein könnte. Beispielsweise wurden der neuroprotektive Effekt und die günstige Wirkung auf das cerebrovaskuläre Remodeling durch eine Substitution mit Mevalonat bzw. Isoprenoiden vermindert (Endres et al., 1998; Liu et al., 2010).

Weitere mögliche Ursachen der Statin-induzierten Myotoxizität, die in der Literatur kontrovers diskutiert werden, sind ein Mangel von Cholesterol in der Zellmembran, ein Mangel von Ubichinon (Coenzym Q 10), eine Dysregulation in der  $Ca^{2+}$ -Homöostase des Muskels sowie eine über autoimmunologische Mechanismen vermittelte Myotoxizität (Mohaupt et al., 2009; Sathasivam, 2012).

### **4.2 Daptomycin-induzierte Effekte auf Muskelzellen *in vitro* und *in vivo***

Bisher ist die Anzahl der Publikationen mit einem Bezug zu Daptomycin-induzierten Myopathien, sowohl von In-vitro- als auch In-vivo-Studien, gering. Kostrominova und Kollegen wiesen in Primärkulturen von Skelettmuskelzellen von Sprague Dawley Ratten *in vitro* einen konzentrations- und zeitabhängigen Effekt von Daptomycin auf differenzierte, spontan kontraktile Myotuben nach (Kostrominova et al., 2010 a). Der von Kostrominova untersuchte Konzentrationsbereich von Daptomycin lag mit 500 bis 6000 mg/l deutlich oberhalb der maximalen Serumkonzentration von Daptomycin, die

bei einem Menschen mit regelrechter Nierenfunktion bei einer Daptomycin-Therapie in aktuell empfohlener Dosierung erreicht wird. Bei einer regulären Therapie mit 6 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden intravenös beträgt die Spitzenkonzentration ca. 94 mg/l, bei 12 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden intravenös erreicht die Spitzenkonzentration ca. 184 mg/l. Daptomycin bewirkte in den differenzierten Muskelzellen eine Hemmung der Kontraktilität, eine Schädigung der Plasmamembran und eine Karyopyknose (Kostrominova et al., 2010 a). Alle Daptomycin-induzierten Effekte waren unter den gewählten Versuchsbedingungen konzentrationsabhängig. Bei der maximalen untersuchten Daptomycin-Konzentration war eine nahezu vollständige Lösung der Myotuben aus ihrem Zellverband, die Lösung der Zellen vom Boden der Zellkulturplatte sowie die Lyse von Myotuben zu beobachten. In undifferenzierten Myoblasten wurde kein Effekt von Daptomycin nachgewiesen. Die Autoren vermuteten daher, dass die Wechselwirkung Daptomycins mit spezifischen Oberflächenmolekülen differenzierter Myotuben entscheidend ist für die toxische Wirkung von Daptomycin. Der Pathomechanismus der Daptomycin-bedingten Muskelschädigung ist bislang allerdings nicht geklärt.

Kostrominova und Kollegen untersuchten auch die Wirkung von Daptomycin auf Skelettmuskelzellen von adulten, männlichen Sprague-Dawley Ratten *in vivo* (Kostrominova et al., 2010 b). Bei einer einmaligen Dosis von 200 mg pro Kilogramm Körpergewicht zeigte sich kein Effekt auf die Muskelzellen. Dagegen bewirkte die Gabe von 150 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht zweimal pro Tag über 3 Tage Schäden in der Zellmembran und/oder eine Makrophagen- und Neutrophilen-Infiltration in einige Muskelzellen. Außerdem wurde ein geringfügiger, aber signifikanter Anstieg der CPK im Serum im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nachgewiesen.

Tierexperimentelle Studien mit Hunden ergaben eine schädigende Wirkung von Daptomycin auf die Skelettmuskulatur mit histologischen Zeichen einer Myopathie und einem Anstieg der Creatinphosphokinase bei einer Dosierung von 25 mg pro Kilogramm Körpergewicht alle 8 Stunden. Diese durch Daptomycin vermittelte Myotoxizität korrelierte primär mit dem Dosierungsintervall (Oleson et al., 2000). Es zeigte sich ein erhöhtes Risiko einer Myopathie bei einer fraktionierten Dosierung von 25 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht alle 8 Stunden gegenüber einer Gabe von 75 mg pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden, obwohl die Daptomycin-Spitzenkonzentration im Plasma bei der einmaligen Gabe alle 24 Stunden höher war.

Die Spitzenkonzentration bei der einmaligen Gabe von 75 mg pro Kilogramm alle 24 Stunden erreichte  $540 \pm 112$  mg/l, während sie bei der fraktionierten Gabe von 25 mg alle 8 Stunden nur  $238 \pm 22$  mg/l betrug. Die Fläche unterhalb der Konzentrationskurve (area under the curve, AUC) als Maß für die Gesamtexposition war bei beiden Dosierungen ähnlich. Unter den von Oleson und Kollegen gewählten Versuchsbedingungen korrelierte die Myotoxizität von Daptomycin also weniger mit der Gesamtexposition oder der Spitzenkonzentration, sondern primär mit dem Dosisintervall. Im Rahmen dieser Studie wurde darüber hinaus die Wirkung von Daptomycin auf die Herzmuskulatur der Versuchstiere untersucht und histologische Veränderungen der Kardiomyozyten durch Daptomycin unter den gewählten Versuchsbedingungen ausgeschlossen.

Die Myotoxizität von Daptomycin wurde weiterhin in Humanstudien erfasst, welche eine weitgehend gute Verträglichkeit von Daptomycin im therapeutischen Bereich von 4 bis 6 mg pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden zur Therapie schwerwiegender Hautinfektionen widerspiegeln (Arbeit et al., 2004). 2,8% von 534 Patienten zeigten in dieser Studie eine Erhöhung der CPK im Serum. Arbeit und Kollegen beobachteten außerdem bei 0,2% der insgesamt 1342 untersuchten Patienten unter einer Therapie mit 4 bis 6 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden eine Myopathie mit einer muskulären Schwäche, Muskelschmerzen und einer signifikanten Erhöhung der CPK.

Fowler und Kollegen erfassten in einer weiteren randomisierten kontrollierten Studie bei 6,7% von 120 Patienten, die zur Therapie einer Endocarditis und Sepsis durch *Staphylococcus aureus* mit 6 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden behandelt wurden, eine Erhöhung der CPK (Fowler et al., 2006). Davon zeigten 4 von 11 Patienten eine CPK-Erhöhung oberhalb des Zehnfachen des Normalwertes.

In einem Fallbericht sind weiterhin Muskelschmerzen unter einer Therapie mit 6 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden ohne eine relevante Erhöhung der Creatinphosphokinase dokumentiert worden. Die Beschwerden waren nach Beenden der Therapie rückläufig (Veligandla et al., 2004). Zusammenfassend weisen diese Studien auf ein eher geringes Risiko einer Myopathie durch Daptomycin hin und zeigen eine insgesamt gute Verträglichkeit des Antibiotikums.

Diese Ergebnisse der randomisiert kontrollierten Studien stehen im Gegensatz zu einzelnen Fallberichten einer Rhabdomyolyse durch Daptomycin (Echevarria et al., 2005; Edwards et al., 2006; Kazory et al., 2006; Papadopoulos et al., 2006; Patel et al., 2007; Sbrana et al., 2010). Die myotoxische Wirkung trat in diesen Fallberichten vor allem bei Dosierungen von Daptomycin oberhalb der empfohlenen Dosierung von 4 bis 6 mg pro Kilogramm Körpergewicht auf.

Die vorliegenden Untersuchungen von L6-Myozyten *in vitro* zeigen übereinstimmend mit den Ergebnissen der klinischen Studien eine im Vergleich zu Statinen eher geringe Myotoxizität im therapeutischen Konzentrationsbereich.

In den lichtmikroskopischen Untersuchungen zeichnete sich aber bei einer supratherapeutischen Daptomycin-Konzentration von 300 mg/l Medium nach 24 Stunden Exposition ein zytotoxischer Effekt ab. Bei einem Teil der L6-Myozyten zeigten sich ein Verlust der Bodenadhärenz und eine Lösung aus dem Zellverband. Außerdem stellte sich eine Fragmentierung von Zellkernen mit einem Nachweis nekrotischer Zellfragmente dar. Dies ließ einen zytotoxischen Effekt vermuten, sodass weitere Untersuchungen im MTT-Test und in der Durchflusszytometrie durchgeführt wurden.

Im MTT-Zytotoxizitätstest mit einer Inkubationsdauer von zehn Tagen zeichnete sich im niedrigeren untersuchten Konzentrationsbereich von 1,6 bis 50 mg Daptomycin/l Medium eine leichte, konzentrationsabhängige Reduktion der Zellviabilität ab. Eine Konzentrationsabhängigkeit des Effektes war im Bereich von 50 bis 500 mg/l nicht eindeutig. Die NOEC betrug für Daptomycin ca. 1,6 mg/l Medium. Die  $EC_{50}$  wurde bei der maximalen untersuchten Konzentration von 500 mg Daptomycin/l Medium nicht erreicht. Insgesamt zeigte der Effekt von Daptomycin auf L6-Zellen unter diesen Versuchsbedingungen eine flache Konzentrations-Wirkungs-Beziehung.

Die durchflusszytometrische Untersuchung von L6-Myozyten nach 72-stündiger Exposition mit 300 mg Daptomycin/l Medium bestätigte einen zytotoxischen Effekt auf L6-Zellen. Es wurden keine Zellen identifiziert, die ausschließlich Annexin-positiv waren. Das Ergebnis könnte einerseits darauf zurückzuführen sein, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen nur späte Phasen der Zellapoptose erfasst wurden. Eine alternative Ursache wäre, dass Daptomycin zu einer Zellnekrose, aber nicht zu einer Apoptose, führt. Weiterhin könnte dieses Ergebnis in spezifischen Eigenschaften der L6-Myozyten begründet sein, die die Durchflusszytometrie mit Annexin und

Propidiumiodid beeinflussten. Bei der Auswertung wurden vitale Zellen von geschädigten Zellen mit einem Zellmembrandefekt differenziert.

Die im Rahmen der durchflusszytometrischen Versuche untersuchte Konzentration von 300 mg Daptomycin/l Medium ist höher als die Daptomycin-Spitzenkonzentration im Plasma eines Menschen mit regelrechter Nierenfunktion unter einer Daptomycin-Therapie in regulärer Dosierung. Die Spitzenkonzentrationen betragen 94 bis 184 mg/l bei einer Gabe von 6 bis 12 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden. Die im Rahmen von Vorversuchen durchgeführten durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten nach 72-stündiger Inkubation mit Daptomycin-Lösungen von max. 200 mg Daptomycin/l Medium keinen signifikanten Anstieg von apoptischen oder nekrotischen L6-Zellen.

Dagegen ließ sich nach Inkubation über 10 Tage bereits bei einer Konzentration von 100 mg Daptomycin/l Medium im MTT-Zytotoxizitätstest eine zytotoxische Wirkung auf L6-Zellen *in vitro* beobachten. Die Zunahme des zytotoxischen Effektes bei Erhöhung der Inkubationsdauer auf zehn Tage deutet auf eine Zeitabhängigkeit der myotoxischen Wirkung von Daptomycin hin.

Weiterhin wurde die Wirkung von Daptomycin auf die Proliferationsrate von L6-Myoblasten untersucht. Nach 24-stündiger Exposition mit 300 mg Daptomycin/l Medium zeigte sich in den durchflusszytometrischen Untersuchungen mit CFSE-Farbstoff keine Veränderung der Proliferationsrate von L6-Myoblasten im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle. Entsprechend diesem Ergebnis wurden in den Vorversuchen mit L6-Myoblasten unter den gleichen Versuchsbedingungen keine mikroskopischen Veränderungen beobachtet und durchflusszytometrisch keine erhöhte Nekrose/Apoptose gemessen. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Kostrominova und Kollegen zeigte sich unter den bis dato untersuchten Versuchsbedingungen keine Wirkung von Daptomycin auf undifferenzierte L6-Myoblasten (Kostrominova et al., 2010 a).

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Untersuchungen auf einen zytotoxischen Effekt von Daptomycin nach 72-stündiger Exposition in einem supratherapeutischen Konzentrationsbereich und nach einer längeren Expositionszeit von zehn Tagen auch in einem therapeutischen Konzentrationsbereich hin. Eine hohe Konzentration und eine lange Expositionszeit von Daptomycin korrelierten also mit der toxischen Wirkung auf die L6-Myozyten.

Diese Faktoren spiegeln sich auch in den publizierten Fallberichten einer Rhabdomyolyse durch Daptomycin beim Menschen als Risikofaktoren wider. Die Rhabdomyolyse trat in den Fallberichten bei Dosierungen oberhalb der aktuell empfohlenen 4 bis 6 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht bzw. bei einer verminderten renalen Ausscheidung von Daptomycin auf (Echevarria et al., 2005; Kazory et al., 2006; Papadopoulos et al., 2006; Patel et al., 2007; Sbrana et al., 2010). Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass eine Erhöhung der empfohlenen Daptomycin-Dosierung zunehmend diskutiert wird, um weniger empfindliche Stämme zu erfassen und eine Ausbreitung der Resistenz von Bakterien gegenüber Daptomycin zu verhindern (Lewis et al., 2005; Livermore, 2008; Sauermann et al., 2008). Außerdem weisen tierexperimentelle Daten darauf hin, dass eine höhere Dosierung von Daptomycin notwendig ist, um adäquate Wirkspiegel jenseits der Blut-Hirn-Schranke zu erreichen, die für die Behandlung von Infektionen des zentralen Nervensystems notwendig wäre. Im Tierexperiment mit Kaninchen zeigte sich eine wirksame Behandlung einer Meningitis unter einer Therapie mit 15 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht (Gerber et al., 2006). Die Kenntnis des Myotoxizitätspotentials von Daptomycin in einem höheren Konzentrationsbereich ist daher besonders relevant.

Der Mechanismus der Muskeltoxizität durch Daptomycin ist bislang ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde im Gegensatz zu den Effekten mit Simvastatin keine Wirkung von Daptomycin auf die Expression von Rho-Protein, aktivierter Caspase 3 und Vimentin nach 24 h Inkubation bei maximal 300 mg Daptomycin/l Medium gemessen.

### **4.3 Effekte auf Muskelzellen *in vitro* und *in vivo* durch Kombination von Simvastatin und Daptomycin**

Bisher existieren nur wenige Publikationen über die kombinierte Wirkung von Statinen und Daptomycin auf Muskelzellen. Entsprechende In-vitro-Studien sind aktuell nicht publiziert. In Humanstudien mit Daptomycin in einer Dosierung von 6 mg pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag ist bei einigen Patienten bei einer gleichzeitigen oder einer in geringem zeitlichen Abstand erfolgten Therapie mit Statinen eine starke Erhöhung der Creatinphosphokinase im Serum und eine Rhabdomyolyse beobachtet worden (Fachinformation Cubicin® 2013).

Außerdem sind einzelne Fälle einer Rhabdomyolyse mit einer akuten Niereninsuffizienz unter einer gleichzeitigen Therapie mit Simvastatin und Daptomycin beschrieben

worden (Berg et al., 2014; Bland et al., 2011; Odero et al., 2009). In zwei von diesen Fallberichten war die Dosierung von Daptomycin oberhalb der empfohlenen Dosierung von 4 bis 6 mg pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden. In dem Fallbericht von Odero und Kollegen erhielt der Patient am 1. bis 4. Therapietag zunächst 7,2 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden. Aufgrund der Diagnose einer eingeschränkten renalen Clearance von 24,6 ml/min, wurde die Dosierung am 5. bis 16. Therapietag auf 7,2 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht alle 48 Stunden reduziert. Bland und Kollegen berichteten von einem Patienten mit einer Rhabdomyolyse unter einer Therapie mit 8 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht alle 24 Stunden. Die Dosierung von Simvastatin war in beiden Fallberichten mit 80 mg Simvastatin per os alle 24 h (Odero et al., 2009) bzw. 40 mg per os alle 24 h (Bland et al., 2011) im Bereich der empfohlenen Dosierung. In beiden Fällen waren die klinischen Beschwerden nach dem Absetzen eines der beiden Medikamente regredient und die Simvastatin- oder Daptomycin-Monotherapie wurde gut vertragen.

Diese Fallberichte suggerieren einen möglichen additiven oder synergistischen myotoxischen Effekt durch eine gleichzeitige Therapie mit Statinen und Daptomycin, welcher in anderen Studien kontrovers diskutiert wird (Berg et al., 2011; Parra-Ruiz et al., 2012). Parra-Ruiz und Kollegen evaluierten in einer retrospektiven Studie die CPK-Konzentration im Serum von 36 Patienten, welche eine gleichzeitige Behandlung mit Daptomycin- und Simvastatin erhalten hatten und verglichen sie mit einer Kontrollgruppe von 68 Patienten mit einer Daptomycin-Monotherapie. In beiden Gruppen war die Dosierung von Daptomycin mit durchschnittlich 7,8 mg Daptomycin pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag oberhalb der empfohlenen Standarddosierung. Bei stark übergewichtigen Patienten wurde Daptomycin allerdings nicht nach dem tatsächlichen Gewicht, sondern entsprechend dem Idealkörpergewicht dosiert. Es zeigte sich kein Unterschied in dem Anstieg der Creatinphosphokinase in beiden Versuchsgruppen. 8% der Patienten mit begleitender Statin-Therapie und 10% der Patienten mit Daptomycin-Monotherapie entwickelten eine relevante CPK-Erhöhung im Serum von > 1000 U/l. Bei keinem der Patienten wurden klinische Zeichen von Muskelbeschwerden erfasst (Parra-Ruiz et al., 2012).

Auch die Arbeitsgruppe von Berg zeigte in einer retrospektiven Studie mit 512 Patienten eine relativ gute Sicherheit für die gleichzeitige Gabe von Statinen und Daptomycin,

verzeichnete aber eine geringe Erhöhung des CPK-Mittelwertes bei einer gleichzeitigen Therapie mit beiden Medikamenten im Vergleich zu einer Daptomycin-Monotherapie und im Vergleich zu einer kurz zuvor pausierten Statintherapie. Außerdem kam es bei einem Patienten unter einer gleichzeitigen Therapie mit einem Statin und Daptomycin zu einer Rhabdomyolyse (Berg et al., 2014).

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung von Simvastatin und Daptomycin an L6-Myozyten *in vitro*. Zusammenfassend korrelierten die Untersuchungen mit Daptomycin in einem Konzentrationsbereich, der bei einem Menschen unter therapeutischer Dosierung erreicht wird, mit der in den Humanstudien erfassten guten Verträglichkeit von Daptomycin. Lichtmikroskopisch und durchflusszytometrisch wurde im Rahmen von Vorversuchen die Wirkung von 0,5 – 3  $\mu\text{M}$  Simvastatin in Kombination mit Daptomycin im therapeutischen Konzentrationsbereich bis 200 mg/l Medium auf L6-Myozyten nach 48- bis 72-stündiger Exposition untersucht. Es zeigte sich unter diesen Versuchsbedingungen kein eindeutiger Effekt durch die Daptomycin-Exposition allein. Ebenso war kein signifikanter Unterschied zwischen der Gabe einer Einzelsubstanz und der kombinierten Gabe von Simvastatin und Daptomycin messbar. Daher konzentrierte sich diese Arbeit auf die Toxizität von suprathérapeutischen Dosierungen von Daptomycin, die auch in Fallberichten als Risikofaktoren identifiziert wurden.

Bei der untersuchten suprathérapeutischen Konzentration von Daptomycin von 300 mg/l Medium war nach 24- bzw. 72-stündiger Exposition ein verstärkter zytotoxischer Effekt bei kombinierter Gabe von Daptomycin und Simvastatin lichtmikroskopisch sichtbar und durchflusszytometrisch messbar. Diese verstärkte additive bis synergistische toxische Wirkung von Simvastatin und Daptomycin bestand für Kombinationen mit Simvastatinlösungen in einem Konzentrationsbereich von 3 bis 10  $\mu\text{M}$ . Bei einer niedrigeren Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin war kein signifikanter Unterschied zwischen der alleinigen Gabe von 300 mg Daptomycin/l Medium und der Kombination beider Substanzen messbar. Dieser verstärkte zytotoxische Effekt bei Kombination von Simvastatin und Daptomycin bestätigte sich im MTT- Zytotoxizitätstest mit einer Inkubationsdauer über 10 Tage. Auch hier war ein verstärkter Effekt bei der niedrigsten untersuchten Simvastatin-Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  noch nicht eindeutig, bestand aber ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Simvastatin. Die Ergebnisse wiesen auf einen additiven bis synergistischen toxischen Effekt von Simvastatin und Daptomycin hin.



Der Pathomechanismus der Simvastatin-vermittelten Myotoxizität ist nicht gänzlich, die Grundlage der Daptomycin-vermittelten Myotoxizität bislang kaum verstanden. Ebenso ist die Pathophysiologie einer kombinierten Wirkung der Substanzen auf Muskelzellen ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach 24-stündiger Exposition mit Simvastatin in einer maximalen Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  eine konzentrationsabhängige Abnahme der Expression der Rho-GTPase und des Zytoskelettproteins Vimentin. Daptomycin in einer Konzentration von 300 mg/l Medium bewirkte keine Veränderung der Proteinexpression im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Ebenso verursachte die Kombination von 300 mg Daptomycin/l Medium mit 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin keinen veränderten Effekt im Vergleich zu einer alleinigen Gabe von 10  $\mu\text{M}$  Simvastatin. Dies könnte bedeuten, dass der Muskelschädigung durch Simvastatin und Daptomycin jeweils unterschiedliche Pathomechanismen zugrunde liegen. Ein immunhistochemischer Nachweis einer Apoptose mit einer vermehrten Expression der aktivierten Caspase 3 zeigte sich in der vorliegenden Arbeit nach 24-stündiger Exposition mit Simvastatin und Daptomycin nicht.

#### **4.4 Ausblick**

Die vorliegende In-vitro-Arbeit weist auf eine additive bis synergistische zytotoxische Wirkung von Simvastatin und Daptomycin auf L6-Myozyten *in vitro* hin. Unter den gewählten Versuchsbedingungen in dieser Arbeit bestand ein additiver myotoxischer Effekt von Daptomycin nur in Dosierungen, die oberhalb der therapeutischen Dosierung beim Menschen liegen. Da sich in dieser Arbeit bereits eine Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von Daptomycin abzeichnete, könnte in weiteren Versuchen die kombinierte Wirkung beider Substanzen auch für eine längere Expositionszeit mit niedrigeren Daptomycin-Konzentrationen analysiert werden.

Toxizitätsstudien für Daptomycin in höheren Dosierungen sind aber ebenso wichtig, da sich bereits erste Antibiotikaresistenzen für Daptomycin in bisher verwandten Dosierungen abzeichnen (Livermore, 2008). Weiterhin wäre für Daptomycin in höheren Dosierungen auch eine bakterizide Wirkung jenseits der Blut-Hirn-Schranke zu erwarten (Gerber et al., 2006). Die Kenntnisse der Myotoxizität in hohen Dosierungen würden dazu beitragen, die Vor- und Nachteile einer für Infektionen des zentralen Nervensystems notwendigen höheren Daptomycin-Dosierung einzuschätzen.

Für die vorliegende In-vitro-Arbeit eignete sich die L6-Zelllinie gut, da ihre Eigenschaften bereits vielfach untersucht wurden. Sie zeichnen sich durch eine hohe Proliferationsrate aus und verlieren auch bei einer hohen Passage nicht ihre zelltypspezifischen Eigenschaften. Aufgrund artspezifischer Unterschiede wäre in zukünftigen Experimenten die Untersuchung der Wirkung von Simvastatin und Daptomycin in humanen Zelllinien oder Primärkulturen humaner Muskelzellen sinnvoll.

Die vorliegende Arbeit und weitere In-vitro-Studien verschiedener Autoren zeigten eine Wirkung von Statinen auf prenylierte Proteine und die Zytoskelettstruktur, welche ein mögliches pathophysiologisches Element der Muskelschädigung bilden. Eine Wirkung von Daptomycin wurde nicht beobachtet, sodass ein alternativer Mechanismus der Muskelschädigung durch Daptomycin angenommen werden könnte.

In diesem Zusammenhang ist es interessant, dass die Arbeit von Kostrominova und Kollegen und die vorliegenden Ergebnisse darauf hinweisen, dass Daptomycin möglicherweise keine Wirkung auf undifferenzierte Myoblasten hat (Kostrominova et al., 2010 a). Dies könnte dafür sprechen, dass die Wechselwirkung Daptomycins mit spezifischen Oberflächenmolekülen differenzierter Myotuben entscheidend ist für die toxische Wirkung von Daptomycin (Kostrominova et al., 2010 a). Die immunhistochemische, durchflusszytometrische oder Immunoblot-Untersuchung der Wirkung von Daptomycin auf Oberflächenmoleküle, die differenzierte Myozyten kennzeichnen, könnte helfen, den Mechanismus der Daptomycin-vermittelten Muskelschädigung aufzuklären.

Es gibt bedeutende Unterschiede in der Zytotoxizität von Simvastatin auf Muskelzellen *in vitro* und *in vivo*. Beispielsweise ist eine Apoptose *in vitro* gut belegt, während *in vivo* bislang keine Apoptose durch Statine nachgewiesen wurde (Dirks et al., 2006; Seachrist et al., 2005). Daher wäre es wichtig, die zytotoxische Wirkung der Kombination von Simvastatin und Daptomycin auch *in vivo*, zum Beispiel in tierexperimentellen Studien, weiterhin zu charakterisieren.

Humane Daten bezüglich einer kombinierten Wirkung von Statinen und Daptomycin auf das Muskelgewebe sind bislang nur geringfügig vorhanden und haben kontroverse Aussagen. Weitere humane Studien wären notwendig, um das Myotoxizitätspotential zu analysieren. Für diese sollte berücksichtigt werden, dass sich das typische Zeitfenster einer Muskelschädigung nach Beginn einer Statin- und einer Daptomycin-Therapie unterscheidet. Die Muskelbeschwerden treten unter einer Daptomycin-Behandlung

meist innerhalb der ersten Woche nach Therapiebeginn auf, während sie unter einer Statin-Medikation häufiger etwa einen Monat nach Beginn der Behandlung erscheinen (Edwards et al., 2006; Kazory et al., 2006; Papadopoulos et al., 2006; Patel et al., 2007). Es könnte daher vermutet werden, dass das Risiko einer additiven Muskelschädigung besonders nach mehreren Wochen einer kombinierten Gabe besteht. Studien über einen längeren Zeitraum wären diesbezüglich relevant.

Kenntnisse über die Risikofaktoren oder den charakteristischen Zeitverlauf einer Muskelschädigung in Humanstudien könnten dazu verwendet werden, optimierte Empfehlungen bezüglich der Frequenz und des Zeitpunktes laborchemischer Kontrollen der CPK, der Lebertransaminasen, des Kreatinins und ggf. weiterer Parameter zu erstellen.

Als frühzeitiger Marker einer Muskelschädigung durch Statine wurde in murinen Experimenten *in vivo* eine Veränderung der elektromyographischen Parameter beschrieben. Dies wäre als routinemäßige Untersuchung wahrscheinlich nicht sinnvoll, könnte aber bei Patienten mit einem hohen Risikoprofil für eine Rhabdomyolyse diskutiert werden.

Das weitergehende Verständnis einer Myopathie durch Statine, Daptomycin und deren Kombination ist einerseits wichtig, um ein unnötiges Absetzen eines Medikamentes zu vermeiden und damit möglicherweise die Exazerbation einer Grunderkrankung zu provozieren. Andererseits ist die Kenntnis des Risikoprofils vor allem vor dem Hintergrund einer möglichen, iatrogen induzierten Rhabdomyolyse relevant. Bislang besteht die einzige Therapie aus dem Absetzen der Medikation und einer symptomatischen Behandlung. Weitere Erkenntnisse über den Zusammenhang und die Pathomechanismen der Muskelschädigung könnten eine ursächliche Therapie bzw. die Einleitung prophylaktischer Maßnahmen ermöglichen.

## Literaturverzeichnis

- Alborn WE Jr, Allen NE, Preston DA. Daptomycin disrupts membrane potential in growing *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991;35:2282–2287.
- Amarenco P, Labreuche J. Lipid management in the prevention of stroke: review and updated meta-analysis of statins for stroke prevention. *Lancet Neurol.* 2009;8:453–463.
- Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K (Hrsg.). *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 11. Auflage, München 2013.
- Arbeit RD, Maki D, Tally FP, Campanaro E, Eisenstein BI, Daptomycin 98-01 and 99-01 Investigators. The safety and efficacy of daptomycin for the treatment of complicated skin and skin-structure infections. *Clin. Infect. Dis.* 2004;38:1673–1681.
- Baigent C, Keech A, Kearney PM, et al. Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins. *Lancet* 2005;366:1267–1278.
- Bellosta S, Arnaboldi L, Gerosa L, et al. Statins effect on smooth muscle cell proliferation. *Semin. Vasc. Med.* 2004;4:347–356.
- Bellosta S, Corsini A. Statin drug interactions and related adverse reactions. *Expert Opin. Drug Saf.* 2012;11:933–946.
- Benigni F, Atsumi T, Calandra T, et al. The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *J. Clin. Invest.* 2000;106:1291–1300.
- Berg ML, Estes LL, Dierkhising RA, Curran B, Enzler MJ. Evaluation of impact of statin use on development of CPK elevation during daptomycin therapy. *Ann. Pharmacother.* 2014;48:320–327.
- Berland Y, Vacher Coponat H, Durand C, Baz M, Laugier R, Musso JL. Rhabdomyolysis with simvastatin use. *Nephron* 1991;57:365–366.
- Black DM. A general assessment of the safety of HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Curr. Atheroscler. Rep.* 2002;4:34–41.
- Blamoun AI, Batty GN, DeBari VA, Rashid AO, Sheikh M, Khan MA. Statins may reduce episodes of exacerbation and the requirement for intubation in patients with COPD: evidence from a retrospective cohort study. *Int. J. Clin. Pract.* 2008;62:1373–1378.
- Bland CM, Bookstaver PB, Thomas S. Successful re-challenge of daptomycin therapy after initial rhabdomyolysis with co-administration of simvastatin. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2011;38:549–550.

- Briel M, Studer M, Glass TR, Bucher HC. Effects of statins on stroke prevention in patients with and without coronary heart disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am. J. Med.* 2004;117:596–606.
- Brivet F, Loirat P. [What are the advances in the treatment of acute kidney failure?]. *Presse Médicale Paris Fr.* 1983 1996;25:227–229.
- Bruckert E, Hayem G, Dejager S, Yau C, Bégaud B. Mild to moderate muscular symptoms with high-dosage statin therapy in hyperlipidemic patients--the PRIMO study. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2005;19:403–414.
- Cao P, Hanai J-I, Tanksale P, Imamura S, Sukhatme VP, Lecker SH. Statin-induced muscle damage and atrogen-1 induction is the result of a geranylgeranylation defect. *FASEB J.* 2009;23:2844–2854.
- Catapano AL, Reiner Z, De Backer G, et al. ESC/EAS Guidelines for the management of dyslipidaemias The Task Force for the management of dyslipidaemias of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Atherosclerosis Society (EAS). *Atherosclerosis* 2011;217:3–46.
- Cleland JGF, McMurray JJV, Kjekshus J, et al. Plasma concentration of amino-terminal pro-brain natriuretic peptide in chronic heart failure: prediction of cardiovascular events and interaction with the effects of rosuvastatin: a report from CORONA (Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure). *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54:1850–1859.
- Copaja M, Venegas D, Aranguiz P, et al. Simvastatin disrupts cytoskeleton and decreases cardiac fibroblast adhesion, migration and viability. *Toxicology* 2012;294:42–49.
- Crosbie J, Magnussen M, Dornbier R, Iannone A, Steele TA. Statins inhibit proliferation and cytotoxicity of a human leukemic natural killer cell line. *Biomark. Res.* 2013;1:33.
- D'Amore T, Lo TC. Approaches used to examine the mechanism and regulation of hexose transport in rat myoblasts. *Biochem. Cell Biol.* 1986;64:1081–1091.
- Dirks AJ, Jones KM. Statin-induced apoptosis and skeletal myopathy. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2006;291:C1208–1212.
- Downs JR, Clearfield M, Weis S, et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis Prevention Study. *JAMA* 1998;279:1615–1622.
- Dulbecco R, Freeman G. Plaque production by the polyoma virus. *Virology* 1959;8:396–397.
- Echevarria K, Datta P, Cadena J, Lewis JS 2nd. Severe myopathy and possible hepatotoxicity related to daptomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005;55:599–600.
- Edwards C.M., King K., Garcia R.J. Early-onset rhabdomyolysis associated with daptomycin. *Infect Dis Clin Pract.* 2006;14:327–328.

- Eisenstein BI. Lipopeptides, focusing on daptomycin, for the treatment of Gram-positive infections. *Expert Opin. Investig. Drugs* 2004;13:1159–1169.
- Endres M, Laufs U, Huang Z, et al. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998;95:8880–8885.
- Endres M. Statins and stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2005;25:1093–1110.
- Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 2001;285:2486–2497.
- Farina HG, Bublik DR, Alonso DF, Gomez DE. Lovastatin alters cytoskeleton organization and inhibits experimental metastasis of mammary carcinoma cells. *Clin. Exp. Metastasis* 2002;19:551–559.
- Flint OP, Masters BA, Gregg RE, Durham SK. Inhibition of cholesterol synthesis by squalene synthase inhibitors does not induce myotoxicity *in vitro*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997;145:91–98.
- Fowler VG Jr, Boucher HW, Corey GR, et al. Daptomycin versus standard therapy for bacteremia and endocarditis caused by *Staphylococcus aureus*. *N. Engl. J. Med.* 2006;355:653–665.
- Garnett WR. Interactions with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Am. J. Health-Syst. Pharm.* 1995;52:1639–1645.
- Gerber P, Stucki A, Acosta F, Cottagnoud M, Cottagnoud P. Daptomycin is more efficacious than vancomycin against a methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in experimental meningitis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;57:720–723.
- Golightly LK, Barber GR, Barron MA, Page RL 2nd. Statins and daptomycin: safety assessment of concurrent use and evaluation of drug interaction liability. *Drug Metabol. Drug Interact.* 2013;28:49–58.
- Graham DJ, Staffa JA, Shatin D, et al. Incidence of hospitalized rhabdomyolysis in patients treated with lipid-lowering drugs. *JAMA* 2004;292:2585–2590.
- Grundey SM. Treatment targets in the management of dyslipidemias: which targets in whom? *Curr. Cardiol. Rep.* 2012;14:692–700.
- Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, et al. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ. Res.* 1998;83:490–500.
- Hanai J, Cao P, Tanksale P, et al. The muscle-specific ubiquitin ligase atrogin-1/MAFbx mediates statin-induced muscle toxicity. *J. Clin. Invest.* 2007;117:3940–3951.
- Hatzigeorgiou C, Jackson JL. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors and osteoporosis: a meta-analysis. *Osteoporos. Int.* 2005;16:990–998.

- Huerta-Alardín AL, Varon J, Marik PE. Bench-to-bedside review: Rhabdomyolysis -- an overview for clinicians. *Crit. Care* 2005;9:158–169.
- Istvan ES, Deisenhofer J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. *Science* 2001;292:1160–1164.
- Itagaki M, Takaguri A, Kano S, Kaneta S, Ichihara K, Satoh K. Possible mechanisms underlying statin-induced skeletal muscle toxicity in L6 fibroblasts and in rats. *J. Pharmacol. Sci.* 2009;109:94–101.
- Jacobson TA. Toward “pain-free” statin prescribing: clinical algorithm for diagnosis and management of myalgia. *Mayo Clin. Proc.* 2008;83:687–700.
- Jakóbisiak M, Bruno S, Skierski JS, Darzynkiewicz Z. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1991;88:3628–3632.
- Jamal SM, Eisenberg MJ, Christopoulos S. Rhabdomyolysis associated with hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors. *Am. Heart J.* 2004;147:956–965.
- Johnson TE, Zhang X, Bleicher KB, et al. Statins induce apoptosis in rat and human myotube cultures by inhibiting protein geranylgeranylation but not ubiquinone. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004;200:237–250.
- Joy TR, Hegele RA. Narrative review: statin-related myopathy. *Ann. Intern. Med.* 2009;150:858–868.
- Katz MS, Carroll PR, Cowan JE, Chan JM, D’Amico AV. Association of statin and nonsteroidal anti-inflammatory drug use with prostate cancer outcomes: results from CaPSURE. *BJU Int.* 2010;106:627–632.
- Kazory A, Dibadj K, Weiner ID. Rhabdomyolysis and acute renal failure in a patient treated with daptomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006;57:578–579.
- Keltz E, Khan FY, Mann G. Rhabdomyolysis. The role of diagnostic and prognostic factors. *Muscles Ligaments Tendons J.* 2013;3:303–312.
- Klip A, Pâquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care* 1990;13:228–243.
- Klip A. Is intracellular  $Ca^{2+}$  involved in insulin stimulation of sugar transport? Fact and prejudice. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 1984;62:1228–1236.
- Knop K.C., Rosenkranz T., Vogel P. Muskelkrankheiten des Erwachsenenalters. *Hamburger Ärzteblatt* 4/04: 162
- Kobayashi M, Kagawa T, Narumi K, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Bicarbonate supplementation as a preventive way in statins-induced muscle damage. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2008;11:1–8.
- Kobayashi M, Kagawa T, Takano R, Itagaki S, Hirano T, Iseki K. Effect of medium pH on the cytotoxicity of hydrophilic statins. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2007;10:332–339.

- Kostrominova TY, Coleman S, Oleson FB, Faulkner JA, Larkin LM. Effect of daptomycin on primary rat muscle cell cultures *in vitro*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 2010 a; 46:613–618.
- Kostrominova TY, Hassett CA, Rader EP, et al. Characterization of skeletal muscle effects associated with daptomycin in rats. *Muscle Nerve* 2010 b;42:385–393.
- LaPlante KL, Rybak MJ. Daptomycin - a novel antibiotic against Gram-positive pathogens. *Expert Opin. Pharmacother.* 2004;5:2321–2331.
- Lardizabal JA, Deedwania P. Lipid-lowering therapy with statins for the primary and secondary prevention of cardiovascular disease. *Cardiol. Clin.* 2011;29:87–103.
- Law M, Rudnicka AR. Statin safety: a systematic review. *Am. J. Cardiol.* 2006;97:52C–60C.
- Lawson MA, Purslow PP. Differentiation of myoblasts in serum-free media: effects of modified media are cell line-specific. *Cells Tissues Organs* 2000;167:130–137.
- Lewis JS 2nd, Owens A, Cadena J, Sabol K, Patterson JE, Jorgensen JH. Emergence of daptomycin resistance in *Enterococcus faecium* during daptomycin therapy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005;49:1664–1665.
- Liao JK. Beyond lipid lowering: the role of statins in vascular protection. *Int. J. Cardiol.* 2002;86:5–18.
- Lilja JJ, Kivistö KT, Neuvonen PJ. Grapefruit juice-simvastatin interaction: effect on serum concentrations of simvastatin, simvastatin acid, and HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1998;64:477–483.
- Liu A, Yang J, Gonzalez FJ, Cheng GQ, Dai R. Biphasic regulation of intracellular calcium by gemfibrozil contributes to inhibiting L6 myoblast differentiation: implications for clinical myotoxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 2011;24:229–237.
- Liu Y-J, Wang X-G, Tang Y-B, et al. Simvastatin ameliorates rat cerebrovascular remodeling during hypertension via inhibition of volume-regulated chloride channel. *Hypertension* 2010;56:445–452.
- Livermore DM. Future directions with daptomycin. *J. Antimicrob. Chemother.* 2008;62 Suppl 3:iii41–iii49.
- Mansi I, Mortensen E. The controversy of a wider statin utilization: why? *Expert Opin. Drug Saf.* 2013;12:327–337.
- Mastaglia FL, Needham M. Update on toxic myopathies. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2012;12:54–61.
- Masters BA, Palmoski MJ, Flint OP, Gregg RE, Wang-Iverson D, Durham SK. *In vitro* myotoxicity of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors, pravastatin, lovastatin, and simvastatin, using neonatal rat skeletal myocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1995;131:163–174.



- Matzno S, Tazuya-Murayama K, Tanaka H, et al. Evaluation of the synergistic adverse effects of concomitant therapy with statins and fibrates on rhabdomyolysis. *J. Pharm. Pharmacol.* 2003;55:795–802.
- Matzno S, Yamauchi T, Gohda M, et al. Inhibition of cholesterol biosynthesis by squalene epoxidase inhibitor avoids apoptotic cell death in L6 myoblasts. *J. Lipid Res.* 1997;38:1639–1648.
- Matzno S, Yasuda S, Juman S, et al. Statin-induced apoptosis linked with membrane farnesylated Ras small G protein depletion, rather than geranylated Rho protein. *J. Pharm. Pharmacol.* 2005;57:1475–1484.
- McCusker RH, Clemmons DR. Insulin-like growth factor binding protein secretion by muscle cells: effect of cellular differentiation and proliferation. *J. Cell. Physiol.* 1988;137:505–512.
- Meador BM, Huey KA. Statin-associated myopathy and its exacerbation with exercise. *Muscle Nerve* 2010;42:469–479.
- Mitka M. Expanding statin use to help more at-risk patients is causing financial heartburn. *JAMA* 2003;290:2243–2245.
- Moghadasian MH. Clinical pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Life Sci.* 1999;65:1329–1337.
- Mohaupt MG, Karas RH, Babiychuk EB, et al. Association between statin-associated myopathy and skeletal muscle damage. *CMAJ.* 2009;181:E11–18.
- Morikawa S, Murakami T, Yamazaki H, et al. Analysis of the global RNA expression profiles of skeletal muscle cells treated with statins. *J. Atheroscler. Thromb.* 2005;12:121–131.
- Mutoh T, Kumano T, Nakagawa H, Kuriyama M. Role of tyrosine phosphorylation of phospholipase C gamma1 in the signaling pathway of HMG-CoA reductase inhibitor-induced cell death of L6 myoblasts. *FEBS Lett.* 1999;446:91–94.
- Nakagawa H, Mutoh T, Kumano T, Kuriyama M. HMG-CoA reductase inhibitor-induced L6 myoblast cell death: involvement of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *FEBS Lett.* 1998;438:289–292.
- Nakamura H, Arakawa K, Itakura H, et al. Primary prevention of cardiovascular disease with pravastatin in Japan (MEGA Study): a prospective randomised controlled trial. *Lancet* 2006;368:1155–1163.
- Naval NS, Abdelhak TA, Zeballos P, Urrunaga N, Mirski MA, Carhuapoma JR. Prior statin use reduces mortality in intracerebral hemorrhage. *Neurocrit. Care* 2008;8:6–12.
- Nishimoto T, Tozawa R, Amano Y, Wada T, Imura Y, Sugiyama Y. Comparing myotoxic effects of squalene synthase inhibitor, T-91485, and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in human myocytes. *Biochem. Pharmacol.* 2003;66:2133–2139.

- Novaro GM, Tiong IY, Pearce GL, Lauer MS, Sprecher DL, Griffin BP. Effect of hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors on the progression of calcific aortic stenosis. *Circulation* 2001;104:2205–2209.
- Novartis 11/2013., Fachinformation Fachinformation Cubicin® 50 mg/ml
- Odero RO, Cleveland KO, Gelfand MS. Rhabdomyolysis and acute renal failure associated with the co-administration of daptomycin and an HMG-CoA reductase inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* 2009;63:1299–1300.
- Oleson FB Jr, Berman CL, Kirkpatrick JB, Regan KS, Lai JJ, Tally FP. Once-daily dosing in dogs optimizes daptomycin safety. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000;44:2948–2953.
- Ozsoy RC, Koopman MG, Kastelein JJP, Arisz L. The acute effect of atorvastatin on proteinuria in patients with chronic glomerulonephritis. *Clin. Nephrol.* 2005;63:245–249.
- Papadopoulos S, Ball AM, Liewer SE, Martin CA, Winstead PS, Murphy BS. Rhabdomyolysis during therapy with daptomycin. *Clin. Infect. Dis.* 2006;42:e108–110.
- Parra-Ruiz J, Dueñas-Gutiérrez C, Tomás-Jiménez C, Linares-Palomino JP, Garrido-Gomez J, Hernández-Quero J. Safety analysis of high dose (>6 mg/kg/day) daptomycin in patients with concomitant statin therapy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2012;31:1771–1774.
- Patel SJ, Samo TC, Suki WN. Early-onset rhabdomyolysis related to daptomycin use. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2007;30:472–474.
- Phillips PS, Haas RH, Bannykh S, et al. Statin-associated myopathy with normal creatine kinase levels. *Ann. Intern. Med.* 2002;137:581–585.
- Pinset C, Whalen RG. Induction of myogenic differentiation in serum-free medium does not require DNA synthesis. *Dev. Biol.* 1985;108:284–289.
- Poynter JN, Gruber SB, Higgins PDR, et al. Statins and the risk of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2005;352:2184–2192.
- Prueksaritanont T, Vega JM, Zhao J, et al. Interactions between simvastatin and troglitazone or pioglitazone in healthy subjects. *J. Clin. Pharmacol.* 2001;41:573–581
- Ridker PM, Danielson E, Fonseca FAH, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:2195–2207.
- Sacher J, Weigl L, Werner M, Szegedi C, Hohenegger M. Delineation of myotoxicity induced by 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase inhibitors in human skeletal muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2005;314:1032–1041.
- Sakamoto K, Honda T, Yokoya S, Waguri S, Kimura J. Rab-small GTPases are involved in fluvastatin and pravastatin-induced vacuolation in rat skeletal myofibers. *FASEB J.* 2007;21:4087–4094.

- Sakamoto K, Kimura J. Mechanism of statin-induced rhabdomyolysis. *J. Pharmacol. Sci.* 2013;123:289–294.
- Sánchez CA, Rodríguez E, Varela E, et al. Statin-induced inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation is related to cell cycle arrest and apoptotic and necrotic cell death mediated by an enhanced oxidative stress. *Cancer Invest.* 2008;26:698–707.
- Sathasivam S. Statin induced myotoxicity. *Eur. J. Intern. Med.* 2012;23:317–324.
- Sauermann R, Rothenburger M, Graninger W, Joukhadar C. Daptomycin: a review 4 years after first approval. *Pharmacology* 2008;81:79–91.
- Sbrana F, Di Paolo A, Pasanisi EM, et al. Administration interval and daptomycin toxicity: a case report of rhabdomyolysis. *J. Chemother. Florence Italy* 2010;22:434–435.
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383–1389.
- Seachrist JL, Loi C-M, Evans MG, Criswell KA, Rothwell CE. Roles of exercise and pharmacokinetics in cerivastatin-induced skeletal muscle toxicity. *Toxicol. Sci.* 2005;88:551–561.
- Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR, et al. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003;361:1149–1158.
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N. Engl. J. Med.* 1995;333:1301–1307.
- Shitara Y, Sugiyama Y. Pharmacokinetic and pharmacodynamic alterations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors: drug-drug interactions and interindividual differences in transporter and metabolic enzyme functions. *Pharmacol. Ther.* 2006;112:71–105
- Silverman JA, Perlmutter NG, Shapiro HM. Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003;47:2538–2544.
- Skottheim IB, Gedde-Dahl A, Hejazifar S, Hoel K, Asberg A. Statin induced myotoxicity: the lactone forms are more potent than the acid forms in human skeletal muscle cells in vitro. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2008;33:317–325.
- Smith RJ. Effects of the sulfonylureas on muscle glucose homeostasis. *Am. J. Med.* 1990;89:38S–43S; discussion 51S–53S.
- Study of the Effectiveness of Additional Reductions in Cholesterol and Homocysteine (SEARCH) Collaborative Group, Armitage J, Bowman L, et al. Intensive lowering of LDL cholesterol with 80 mg versus 20 mg simvastatin daily in 12,064 survivors

- of myocardial infarction: a double-blind randomised trial. *Lancet* 2010;376:1658–1669.
- Tally FP, Zeckel M, Wasilewski MM, et al. Daptomycin: a novel agent for Gram-positive infections. *Expert Opin. Investig. Drugs* 1999;8:1223–1238.
- Todd PA, Goa KL. Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolaemia. *Drugs* 1990;40:583–607.
- Tomaszewski M, Stępień KM, Tomaszewska J, Czuczwar SJ. Statin-induced myopathies. *Pharmacol. Rep.* 2011;63:859–866.
- Tomlinson SS, Mangione KK. Potential adverse effects of statins on muscle. *Phys. Ther.* 2005;85:459–465.
- Vaklavas C, Chatzizisis YS, Ziakas A, Zamboulis C, Giannoglou GD. Molecular basis of statin-associated myopathy. *Atherosclerosis* 2009;202:18–28.
- Veligandla SR, Louie KR, Malesker MA, Smith PW. Muscle pain associated with daptomycin. *Ann. Pharmacother.* 2004;38:1860–1862.
- Vickers S, Duncan CA, Vyas KP, et al. *In vitro* and *in vivo* biotransformation of simvastatin, an inhibitor of HMG CoA reductase. *Drug Metab. Dispos.* 1990;18:476–483.
- Vincent TS, Wülfert E, Merler E. Inhibition of growth factor signaling pathways by lovastatin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991;180:1284–1289.
- Vollmer T, Key L, Durkalski V, et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2004;363:1607–1608.
- Voora D, Shah SH, Spasojevic I, et al. The SLCO1B1\*5 genetic variant is associated with statin-induced side effects. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009;54:1609–1616.
- Ward MM. Factors predictive of acute renal failure in rhabdomyolysis. *Arch. Intern. Med.* 1988;148:1553–1557.
- Williams D, Feely J. Pharmacokinetic-pharmacodynamic drug interactions with HMG-CoA reductase inhibitors. *Clin. Pharmacokinet.* 2002;41:343–370.
- Yaffe D. Retention of differentiation potentialities during prolonged cultivation of myogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1968;61:477–483.
- Young-Xu Y, Jabbour S, Goldberg R, et al. Usefulness of statin drugs in protecting against atrial fibrillation in patients with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 2003;92:1379–1383.
- Zhou Q, Liao JK. Pleiotropic effects of statins. - Basic research and clinical perspectives. *Circ. J.* 2010;74:818–826.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1:</b> Strukturformel von Simvastatin.....	7
<b>Abb. 2:</b> Cholesterolsynthese und ihre Hemmung durch Simvastatin. ....	10
<b>Abb. 3:</b> Histologische Darstellung einer nekrotisierenden Myopathie mit Nachweis von entzündlichen Infiltraten.....	12
<b>Abb. 4:</b> Hypothetisches Schema der Statin-vermittelten Apoptose in Skelettmuskelzellen.....	14
<b>Abb. 5:</b> Strukturformel von Daptomycin. ....	15
<b>Abb. 6:</b> Pipettierschema für die 96-Well-Platte im MTT-Zytotoxizitätstest. ....	30
<b>Abb. 7:</b> Auswertung der Durchflusszytometrie mit Annexin und Propidiumiodid.....	34
<b>Abb. 8:</b> Auswertung der Durchflusszytometrie mit Carboxyfluoresceinsuccinimidylester. .	37
<b>Abb. 9:</b> Lichtmikroskopische Aufnahme von L6-Myozyten nach 72 h Inkubation Simvastatin und/oder Daptomycin im Vergleich zu einer Negativkontrolle. ....	43
<b>Abb. 10:</b> Lichtmikroskopische Aufnahme von L6-Myozyten nach Färbung mit Hoechst 33258 (Bisbenzimid H 33258) und Propidiumiodid.....	44
<b>Abb. 11:</b> Lichtmikroskopische Aufnahme von L6-Myozyten mit Hoechst 33258 (Bisbenzimid H 33258) und Propidiumiodid nach Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin über 72 h. ....	45
<b>Abb. 12:</b> MTT-Zytotoxizitätstest mit Simvastatin. ....	48
<b>Abb. 13:</b> MTT-Zytotoxizitätstest mit Daptomycin.....	49
<b>Abb. 14:</b> MTT-Zytotoxizitätstest mit Simvastatin und Daptomycin. ....	50
<b>Abb. 15:</b> Durchflusszytometrische Untersuchung der L6-Myozyten mit Annexin V und Propidiumiodid nach 72-stündiger Exposition mit Simvastatin und Daptomycin.....	54
<b>Abb. 16:</b> Ausgewählte Histogramme der Durchflusszytometrie mit Annexin V und Propidiumiodid.....	56

<b>Abb. 17:</b> Durchflusszytometrische Untersuchung der Proliferationsrate von L6-Myoblasten mit CFSE nach 24-stündiger Exposition mit Simvastatin und/oder Daptomycin.....	58
<b>Abb. 18:</b> Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen Rho-Protein. ....	59
<b>Abb. 19:</b> Bilder der immunhistologischen Analysen der L6-Myozyten nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin und Färbung mit einem Antikörper gegen Rho-Protein. ....	61
<b>Abb. 20:</b> Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3. ....	62
<b>Abb. 21:</b> Bilder der immunhistologischen Untersuchungen der L6-Myozyten nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin und Färbung mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3. ....	63
<b>Abb. 22:</b> Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen Vimentin.....	64
<b>Abb. 23:</b> Bilder der immunhistologischen Analysen der L6-Myozyten nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin und Färbung mit einem Antikörper gegen das Intermediärfilament Vimentin. ....	66

## Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b> Klinische Symptome einer Rhabdomyolyse .....	6
<b>Tab. 2:</b> MTT-Zytotoxizitätstest mit Simvastatin über 10 d. ....	48
<b>Tab. 3:</b> MTT-Zytotoxizitätstest mit Daptomycin über 10 d. ....	49
<b>Tab. 4:</b> MTT-Zytotoxizitätstest mit Simvastatin und Daptomycin über 10 d.....	51
<b>Tab. 5:</b> Durchflusszytometrie mit Annexin V und Propidiumiodid – Prozentanteil vitaler L6-Myozyten nach 72 h Inkubation mit Simvastatin und Daptomycin. ....	55
<b>Tab. 6:</b> Durchflusszytometrie mit CFSE - Prozentanteil der L6-Myoblasten mit einer hohen Proliferationsrate nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin. ....	57
<b>Tab. 7:</b> Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen Rho-Protein nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin. .	60
<b>Tab. 8:</b> Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen aktivierte Caspase 3 nach 24 h Inkubation mit Simvastatin und/oder Daptomycin .....	62
<b>Tab. 9:</b> Immunhistochemische Untersuchung von L6-Myozyten mit einem Antikörper gegen Vimentin nach 24 h Inkubation der L6-Myozyten mit Simvastatin und/oder Daptomycin.....	65

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Picker-Minh, Tuyet-Vi Sylvie, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Wirkung von Simvastatin allein und in Kombination mit Daptomycin auf L6-Zellen *in vitro*“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -[www.icmje.org](http://www.icmje.org)) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift



## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationen und Vorträge

### Publikationen

Dave H, Rosser B, Reineke K, **Nguyen-Minh S**, Knirsch W, Prêtre R. Aortic arch enlargement and coarctation repair through a left thoracotomy: significance of ductal perfusion. *Eur. J. Cardio-Thorac. Surg. Off. J. Eur. Assoc. Cardio-Thorac. Surg.* 2012;41:906–912.

**Nguyen-Minh S**, Drossel K, Horn D, Rost I, Spors B, Kaindl AM. Combined deletion 18q22.2 and duplication/triplication 18q22.1 causes microcephaly, mental retardation and leukencephalopathy. *Gene* 2013b;523:92–98.

**Nguyen-Minh S**, Bühner C, Hübner C, Kaindl AM. Is microcephaly a so-far unrecognized feature of XYY syndrome? *Meta Gene* 2014, 2:160-163.

**Picker-Minh S**, Busche A, Hartmann B, Spors B, Clopocki E, Hübner C, Horn D, Kaindl AM. Large Homozygous Microdeletion in the *RAB3GAP1 Gene* Causes Warburg Micro Syndrome 1. *Orphanet J Rare Dis.* 2014 Oct 21;9(1):113

Adegbola A, Musante L, Callewaert B, Maciel P, Hu H, Isidor B, **Picker-Minh S**, Caignec CL, Chiaie B, Vanakker O, Menten B, D'heedene A, Bockaert N, Roelens F, Decaestecker K, Silva J, Soares G, Lopes F, Najmabadi H, Kahrizi K, Cox GF, Angus SP, Fischer U, Suckow V, Bartsch O, Chess A, Ropers HH, Wienker TF, Hübner C, Kaindl AM, Kalscheuer VM. Redefining the MED13L syndrome. Accepted in the *European Journal of Human Genetics*

### Poster und Kurzvorträge

**79. DGPT Frühjahrstagung**, März 2013, Halle.

Nguyen-Minh S, Felies A, Baumann I, Stahlmann R.

Effects of Daptomycin and Simvastatin alone or in combination on L6 Myocytes  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 386 (Suppl 1), Abstract-Nr. 292.

**39. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie**, April 2013, Innsbruck.

Nguyen-Minh S, Busche A, Hartmann B, Spors B, Clopocki E, Hübner C, Horn D, Kaindl AM. Large Homozygous Microdeletion in the RAB3GAP1 Gene causes Warburg Micro Syndrome. *Neuropediatrics*, Volume 44 (2013), Abstract-Nr. PS16-1165.

## **Danksagung**

Ich möchte mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ralf Stahlmann für seine Offenheit und Freude für wissenschaftliche Diskussionen und seine stete Hilfsbereitschaft als Doktorvater bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn PD Dr. Reinhard Wanner für seine wissenschaftlichen Anregungen und seine freundliche Unterstützung und der gesamten Arbeitsgruppe für die gegenseitige Hilfe und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Schließlich danke ich meiner Familie für ihre stete, liebevolle Unterstützung.