

Klinik & Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie

Direktor: Prof. Dr. med. Daniel Reuter

**Differentielle Effekte von Prava- und Simvastatin auf das
Lungenödem post reanimationem und die Endothelzellfunktion**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin Rostock,

vorgelegt von

Hauke Hermann Engelke,

geboren am 20.09.1987 in Herford

eingereicht im Oktober 2018,

Verteidigung im November 2019

Dekan: Prof. Dr. med. E. Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. J. P. Roesner, Klinikum Südstadt in Rostock, Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. B. Hinz, Universitätsmedizin Rostock, Institut für Pharmakologie und Toxikologie
3. Gutachter: Prof. Dr. med. R. Schubert, Universität Augsburg, zuvor Universitäts-Medizin Mannheim

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Das Endothel	1
1.1.1. Das Endothel als Organ – Aufbau und Funktion.....	1
1.1.2. Die Rolle der Endothelzellen bei vaskulären und nicht-vaskulären Erkrankungen... 2	
1.1.3. Die Bedeutung des Endothels in der Pathogenese des globalen Ischämie/Reperfusion-Syndroms.....	3
1.1.4. Folgen einer Endothelschädigung am Beispiel des alveolären Flüssigkeitsübertritts bei inflammatorischer bzw. reperfusion-assoziiertes Schädigung der Lunge	4
1.2. Statine – Einsatz, Pharmakologie und Perspektiven.....	5
1.2.1. Einfluss von Statinen auf die inflammatorische Schädigung der Lunge.....	6
1.3. Zielsetzung	7
2. Materialien und Methoden	8
2.1. Histologische Untersuchung des Lungengewebes nach kardiopulmonaler Reanimation	8
2.2. Zellkultur humaner pulmonaler Endothelzellen	9
2.3. Matrigel-Angiogenese-Assay	10
2.4. Migrations-Modell	11
2.5. Durchflusszytometrie	12
2.6. Western Blot	12
2.7. Statistische Versuchsauswertung	14
3. Ergebnisse.....	15
3.1. Pravastatin reduziert die alveoläre Schädigung von reanimierten Mäusen, Simvastatin hingegen zeigt keinen Effekt.	15
3.2. Pravastatin und Simvastatin haben keinen Einfluss auf die alveoläre Leukozyteninfiltration von reanimierten Mäusen.....	16
3.3. Pravastatin fördert und Simvastatin hemmt die Netzwerkbildung humaner pulmonaler mikrovaskulärer Endothelzellen in vitro.....	17
3.4. Simvastatin induziert Nekrose in humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen in vitro	21
3.5. Simvastatin induziert endotheliale COX-2-Protein-Level	23

3.5.1. Eine funktionelle COX-2-Inhibition beeinflusst nicht die Wirkung Simvastatins auf das Endothel	25
3.6. AKT-/ERK-Inhibition vermindert die von Pravastatin vermittelten Effekte auf Endothelzellen	27
4. Diskussion.....	30
4.1. Differentielle Effekte von Prava- und Simvastatin auf das Lungenödem post reanimationem	30
4.2. Statine entfalten ihre protektive Wirkung peri reanimationem nicht am Endothel.....	33
4.3. Pravastatin wirkt proangiogen auf pulmonale Endothelzellen	33
4.4. Simvastatin wirkt angiostatisch und zytotoxisch auf pulmonale Endothelzellen	35
5. Zusammenfassung	38
6. Literaturverzeichnis.....	40
7. Anhang	47
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	47
7.2. Abbildungsverzeichnis	49
7.3. Eidesstattliche Erklärung.....	50
7.4. Danksagungen.....	51
7.5. Thesen	53

1. Einleitung

1.1. Das Endothel

1.1.1. Das Endothel als Organ – Aufbau und Funktion

Das Endothel ist ein einschichtiger Zellverband, der die innerste Schicht aller Blutgefäße bildet. Es stellt eine erste Barriere zwischen dem zirkulierenden Blut und den tiefer gelegenen Gefäßwandschichten dar. Eine Funktionstüchtigkeit des Endothels kann nur durch einen intakten Verbund von Endothelzellen mittels verschiedener Zell-Zell-Kontakte wie z.B. Tight Junctions, Adhärens-Kontakten und Gap Junctions aufrechterhalten werden (Lüllmann-Rauch 2006).

Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutdrucks sowie des Wasser- und Stoffaustausches zwischen dem intravasalen Blut und den Geweben (Aird 2004). Durch die Sekretion von Stickstoff-Monoxid und anderen vasoaktiven Substanzen nehmen Endothelzellen direkt an der Regulation des Gefäßtonus und somit der lokalen Durchblutung teil. Weitere Funktionen des Endothels sind die Regulation inflammatorischer Reaktionen durch Interaktion mit Entzündungszellen sowie die Regulation der Blutgerinnung und des transzellulären Stofftransportes. Dem Endothel kommt somit insgesamt eine besondere Bedeutung in der Regulation und dem Erhalt der vaskulären Homöostase zu (Lüllmann-Rauch 2006; Aird 2004; Cooke 2000).

Eine besondere Funktion des Endothels ist die Fähigkeit zur Bildung neuer Gefäße - der sogenannten Angiogenese. Dieser Gefäßneubildungsprozess beginnt mit der Migration von Endothelzellen aus präformierten Kapillaren. Im weiteren Verlauf beginnen die Endothelzellen zu proliferieren und auszusplassen und bilden schließlich neue, röhrenförmige Strukturen mit einem Lumen. Der Prozess der Angiogenese wird durch zahlreiche Mechanismen reguliert, wobei ein Sauerstoffmangel (Hypoxie) sowie entzündliche Prozesse die hauptsächlichen Stimuli darstellen (Schmidt 2007). Proangiogene Substanzen wie z.B. der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) wirken über die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden und aktivieren beispielsweise die Proteinkinase C, die extrazellulär regulierte Kinase (ERK), Calcineurin und die

AKT-Kinasen (Zachary 2003). Im Rahmen von Inflammation und Wundheilungsprozessen werden die angiogenen Prozesse durch freigesetzte Zytokine, Abbauprodukte und Wachstumsfaktoren gesteuert (Carmeliet und Jain 2011; Liekens et al. 2001). Von der Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist ebenfalls bekannt, dass sie angiogene Prozesse steuern kann (Kuwano et al 2004). Daher rückt das Endothel bzw. seine Bedeutung bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Organismus in den Fokus der heutigen Therapien: zum einen wird versucht, die ungewollte Angiogenese z. B. bei Tumoren zu hemmen, zum anderen, die erwünschte Angiogenese im Sinne der regenerativen Prozesse zu erhalten bzw. zu verbessern (Carmeliet 2000; Schmidt 2007).

1.1.2. Die Rolle der Endothelzellen bei vaskulären und nicht-vaskulären Erkrankungen

Gefäßerkrankungen haben aufgrund ihrer hohen Prävalenz in den Industrienationen einen hohen Stellenwert in den Gesundheitssystemen erlangt. Aktuelle Daten belegen, dass ca. 33 Prozent der Bevölkerung der Vereinigten Staaten von Amerika an arterieller Hypertonie leiden (Go et al. 2013). Dabei scheint das Auftreten einer arteriellen Hypertonie mit einer endothelialen Dysfunktion assoziiert zu sein (Dharmashankar und Widlansky 2010). Diese führt zu einem krankhaften Umbau von arteriellen Blutgefäßen, der sich im weiteren Krankheitsprozess als Gefäßstenose bei der koronaren Herzerkrankung (KHK) oder peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) manifestiert. In der Folge kommt es zu einer lokalen Minderperfusion und Hypoxie des Endorgans (Davignon 2004) und kann im Funktionsverlust bzw. Verlust des betroffenen Organs/ Gewebes enden. Die sozio-ökonomische Bedeutung der kardiovaskulären Erkrankungen wird deutlich, wenn man bedenkt, dass sie weltweit mit 29,6 Prozent die mit Abstand häufigste Todesursache darstellen (Nichols et al. 2014).

Neben den durch Arteriosklerose bedingten Gefäßerkrankungen bilden die Vaskulitiden eine weitere große Gruppe der Gefäßerkrankungen mit hoher Prävalenz. Hierbei handelt es sich um inflammatorische Gefäßveränderungen von Venen, Arterien oder Lymphgefäßen, die anhand ihrer Lokalisation, der betroffenen Gefäße und ihrer Genese unterschieden und eingeteilt werden. Bei ihnen kommt es durch eine überschießende Entzündungsreaktion zu Schäden der endothelialen

Integrität und damit zu einer Beeinträchtigung der Endothelfunktion (Baldwin et al. 2015).

Eine weitere durch Inflammation bedingte endotheliale Dysfunktion ist bei einer Sepsis zu beobachten. Bei dieser generalisierten Entzündungsreaktion (Hagel et al. 2011) wird das Endothel aktiviert, so dass vasokonstriktorische, prokoagulatorische und inflammatorische Mediatoren bzw. Substanzen exprimiert werden. In der Folge nimmt die Gefäßpermeabilität zu (van Ierssel et al. 2014; Aird 2003), so dass Flüssigkeit aus dem Gefäßsystem in das Interstitium übertritt. Des Weiteren werden bei diesem Krankheitsbild die Endothelzellen durch Apoptose- und Nekroseprozesse irreversibel geschädigt (Aird 2003), so dass es zur direkten Zerstörung der Endothelzellbarriere mit einer erhöhten Anzahl zirkulierender Endothelzellen kommt (Backer et al. 2013).

1.1.3. Die Bedeutung des Endothels in der Pathogenese des globalen Ischämie/Reperfusionssyndroms

Der Herz-Kreislaufstillstand stellt eine globale Ischämie mit konsekutiver Hypoxämie des gesamten Organismus dar (Adams 2006). Bereits nach kurzer Zeit werden Entzündungsmediatoren wie z. B. der Tumornekrosefaktor- α (TNF α) freigesetzt. Eine anschließende Reperfusion nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation verstärkt diese inflammatorischen Effekte. So werden u. a. Sauerstoffradikale produziert, die einen oxidativen Zellschaden zur Folge haben. Durch u. a. diese oxidative Schädigung des Endothels wird eine Permeabilitätsstörung induziert (Carden und Granger 2000; Zhang 2005). Durch eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen entlang des Endothels haften sich vermehrt Leukozyten am Endothel an. Dies ist der erste Schritt in der Auswanderung von Leukozyten in geschädigtes Gewebe, wo sie den Gewebeschaden durch eine Unterhaltung bzw. Aggravierung der Entzündungsreaktion weiter verschlimmern.

Die Inzidenz des plötzlichen Herztodes beträgt in Deutschland ca. 123/100 000. Von diesen Patienten versterben jedoch über 50 Prozent, ohne dass eine Reanimation begonnen wurde, u.a., weil die Rettungskräfte zu spät eintreffen (Neukamm et al. 2011), bzw. keine Laienreanimation begonnen wurde. Weltweit liegt die Inzidenz von Patienten, die einen plötzlichen Herztod erleiden und im Anschluss reanimiert werden, bei 62/100 000 (Nolan et al. 2012). Trotz intensiver Bemühungen um eine Verbesserung des neurologischen Outcomes werden in Europa nur ca. acht Prozent

der Patienten nach einer erfolgreichen Reanimation aus dem Krankenhaus entlassen (Nolan et al. 2012). Von den Überlebenden weisen über 60 Prozent ein schlechtes bzw. unbefriedigendes neurologisches Outcome auf, welches der Länge der Zeit ohne Blutfluss (vor Reanimationsbeginn „no flow“) und der Zeit mit geringem Blutfluss (während der Reanimation „low flow“) geschuldet ist (Huet et al. 2011). Die sofortige bzw. frühzeitige kardiopulmonale Reanimation (cardiopulmonary resuscitation = CPR) bei Kreislaufstillstand ist die einzige Möglichkeit der Sicherstellung der Sauerstoffversorgung des Gehirns und anderer hypoxieanfälliger Organe (Roewer und Thiel 2010). Ziel einer erfolgreichen Reanimation muss also der schnelle Beginn der Reanimationsmaßnahmen sowie die schnelle Wiederherstellung eines Spontankreislaufes sein (return of spontaneous circulation = ROSC), um das Ausmaß eines Schadens mit systemischer Inflammation, Organversagen und Untergang von neuralen Strukturen möglichst gering zu halten.

Mit zunehmender Dauer der Ischämie nimmt auch der Endothelschaden zu. Dies führt zu einer schwerwiegenden Endotheldysfunktion mit einer gesteigerten Permeabilität sowie einem Einstrom von Flüssigkeit in das Interstitium. Das hat die Bildung von Ödemen, eine Störung der vaskulären Homöostase und Organdysfunktionen, z. B. Lungenschäden, zur Folge (Wang et al. 2013). Diese Veränderungen werden unter dem Begriff des sogenannten Postreanimationssyndroms (Post-Cardiac Arrest Syndrome) zusammengefasst (Neumar et al. 2008).

Um den zugrundeliegenden Wirkungsmechanismus zu erforschen, haben Huet et al. den Einfluss von humanem Serum auf Endothelzellkulturen untersucht. Es zeigte sich, dass die Inkubation der Endothelzellen mit Seren von reanimierten Patienten zu einem Absterben von Endothelzellen führt. Der beobachtete Zelluntergang war höher als bei der Verwendung von Seren septischer Patienten. Damit könnte der Endothelschaden ein wichtiger Spieler in der Pathogenese des Postreanimationssyndroms sein (Huet et al. 2011).

1.1.4. Folgen einer Endothelschädigung am Beispiel des alveolären Flüssigkeitsübertritts bei inflammatorischer bzw. reperfusions-assoziiertes Schädigung der Lunge

Endothelschäden treten im Rahmen einer direkten Alveolarzellschädigung, aber auch indirekt bei einer schweren inflammatorischen Reaktion, durch eine Ischämie/

Reperfusionssyndrom nach erfolgreicher kardiopulmonalen Wiederbelebung, bei Pankreatitis und auch bei einer Sepsis auf (Gill et al. 2015). In der Folge wird die Integrität des Endothels gestört und Flüssigkeit tritt aus dem vaskulären Raum in den Alveolarraum über (Wang et al. 2013). In der Maximalvariante entwickelt sich daraus ein ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome) mit einem Lungenversagen.

1.2. Statine – Einsatz, Pharmakologie und Perspektiven

Statine sind eine Medikamentengruppe, die zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten in den Industrieländern zählen. Die klassischen Einsatzgebiete sind die Behandlung der Hypercholesterinämie oder die Sekundärprophylaxe nach Myokardinfarkt und Schlaganfall (Herold 2014).

Neben ihrer Hauptwirkung, der Blockade der Cholesterinsynthese, vermitteln Statine weitere Effekte, die nicht über eine reine Cholesterinsenkung erklärt werden können - sogenannte pleiotrope Effekte. Diese beinhalten eine globale Endothelprotektion und Verbesserung der Endothelfunktion, was sich u. a. in einer verbesserten Gefäßelastizität widerspiegelt. Des Weiteren vermitteln Statine antiinflammatorische Effekte, eine Stabilisierung atherosklerotischer Plaques und eine Hemmung der Gerinnungsaktivität (Antonopoulos et al. 2012; Mihos et al. 2010; Davignon 2004; Blum und Shamburek 2009).

Der Hauptwirkmechanismus der Statine beruht auf der kompetitiven Hemmung des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese, der sogenannten 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) (Aktories 2006). Der Wirkungsort von Statinen ist vor allem die Leber. Durch die Hemmung der HMG-CoA-Reduktase kommt es zu einem Mangel an Cholesterin, auf den der Körper mit einer erhöhten Dichte von LDL-Cholesterin-Rezeptoren reagiert. Durch eine erhöhte Rezeptordichte nehmen die Zellen mehr LDL-Cholesterin aus der Peripherie auf, wodurch der Serumspiegel absinkt. Häufig verwendete Statine sind z.B. Fluvastatin, Atorvastatin, Lovastatin, Pravastatin und Simvastatin. Die verschiedenen Statine werden aufgrund ihrer Löslichkeit in lipo- und hydrophile Statine unterteilt. Pravastatin ist hydrophil und damit gut in Wasser löslich. Lova- und Simvastatin sind lipophil und somit fettlöslich (**Abbildung 1**).

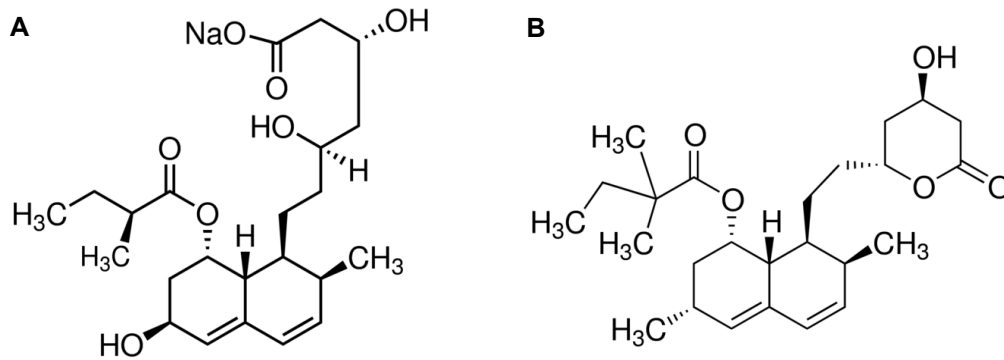


Abbildung 1: Strukturformeln von Prava- und Simvastatin

A Strukturformel von Pravastatin (hydrophil) und **B** Simvastatin (lipophil). © Sigma-Aldrich

Aufgrund der pleiotropen Effekte im Sinne einer Endothelprotektion erscheinen Statine als eine vielversprechende Therapieoption, um einer globalen Endothelschädigung, wie sie beim Postreanimationssyndrom auftritt, entgegenzuwirken (Fink et al. 2010; Huet et al. 2011).

In einer experimentellen Kleintieruntersuchung hat unsere Arbeitsgruppe nachweisen können, dass die Applikation von Pravastatin das Überleben von Mäusen nach kardiopulmonaler Reanimation erhöht. Außerdem wiesen die Tiere, die im Rahmen der Reanimation Pravastatin erhalten hatten, in den anschließenden neurologischen Funktionstests bessere Resultate auf, was als eine Neuroprotektion gewertet wurde (Bergt et al. 2012).

In der Literatur gibt es Hinweise, dass lipophile Statine auch negative Effekte auf Endothel- und andere Körperzellen haben könnten. So wurde beispielsweise eine vermehrte Apoptose bei Gefäßzellen beobachtet (Acquavella et al. 2010; Kaufmann et al. 2006; Katsiki et al. 2010).

1.2.1. Einfluss von Statinen auf die inflammatorische Schädigung der Lunge

Statine können die Endothelschädigung bei inflammatorischen Prozessen in der Lunge positiv beeinflussen und somit lungenprotektiv wirken. Dies konnten Melo et al. in einer experimentellen Untersuchung an einem Endotoxin-induzierten Lungenversagen zeigen. Dabei schienen verschiedenen Statine die Endotoxin-

vermittelten Veränderungen der Lungenarchitektur in unterschiedlichem Ausmaß zu beeinflussen (Melo et al. 2013).

Untersuchungen zu Auswirkungen von Statinen auf die Endothelzellschädigung nach kardiopulmonaler Reanimation sind bislang noch nicht Gegenstand von Untersuchungen gewesen.

1.3. Zielsetzung

Aufgrund der positiven Effekte, die beim Einsatz von Pravastatin in einem murinen Reanimationsmodell beobachtet wurden, sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Quantifizierung des alveolären Lungenschadens reanimierter Mäuse unter dem Einfluss von Simva- und Pravastatin.
2. *In-vitro*-Untersuchungen zu Auswirkungen von Pravastatin und Simvastatin auf die Angiogenesefähigkeit von Endothelzellen.
3. *In-vitro*-Untersuchungen zu Auswirkungen von Plasma reanimierter Mäuse nach Pravastatin- bzw. Simvastatinbehandlung auf die Angiogenesefähigkeit von Endothelzellen.
4. *In-vitro*-Untersuchungen zu möglichen Mechanismen der Schädigung bzw. Protektion von Endothelzellen durch Simvastatin und Pravastatin.

2. Materialien und Methoden

2.1. Histologische Untersuchung des Lungengewebes nach kardiopulmonaler Reanimation

Zur Quantifizierung der alveolären Schädigung nach Herz-Kreislaufstillstand und kardiopulmonaler Reanimation wurden die Lungen von Mäusen (C57BL/6J-Mäuse) entnommen, in Formalin fixiert, mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt und mikroskopiert. Untersucht wurden als Kontrollgruppen nicht reanimierte Tiere, die als Trägerlösung NaCl bzw. Clinoleic (Ernährungslösung aus Olivenöl und Sojaöl der Firma Baxter) erhalten haben, aber auch solche, die mit Pravastatin bzw. Simvastatin behandelt wurden (jeweils n=3 Tiere). Des Weiteren wurde Lungengewebe von kardiopulmonal reanimierten Tieren untersucht, die zur Reanimation mit NaCl, Clinoleic, Pravastatin bzw. Simvastatin behandelt wurden (jeweils n=5-7 Tiere). Die Tierversuche wurden zuvor durch die Ethikkommission genehmigt (LALLF 7221.3-1.1-022/11).

Die Quantifizierung der Alveolarschädigung erfolgte anhand der Breite bzw. Dicke der alveolären Septen einerseits und der alveolären Leukozyteninfiltration andererseits. Die Veränderung des Durchmessers der Alveolarsepten ist ein etabliertes Maß für eine pulmonale Schädigung (Matute-Bello et al. 2011; Liu et al. 2012). Dabei ist eine Zunahme insbesondere bei einem ARDS festzustellen, aber auch im Rahmen einer Linksherzinsuffizienz mit konsekutivem pulmonalen Hypertonus oder bei einer toxischen Alveolitis (Gould und Miller 1975; Dayeh et al. 2016). Es wurden von jedem angefertigten Lungenpräparat jeweils zehn mikroskopierte repräsentative Ausschnitte erfasst. In jedem Bild wurde die durchschnittliche Dicke der Alveolarsepten anhand von 20 Einzelmessungen mit Hilfe von Image Pro Plus Software (Media Cybernetics, Rockville, USA) ermittelt und mit Graph Pad Prism 4 Software (Graph Pad Software, La Jolla, USA) ein Durchschnittswert für jedes einzelne Tier und anschließend für die gesamte Gruppe gebildet.

Zur Erfassung der alveolären Leukozyteninfiltration wurden die Leukozyten in den Alveolen pro Gesichtsfeld gezählt und als Vielfaches der Kontrolle angegeben (Liu et al. 2012).

2.2. Zellkultur humaner pulmonaler Endothelzellen

Für die *in-vitro*-Experimente wurden kommerziell erworbene humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen (human pulmonary microvascular endothelial cells = HPMEC, PromoCell, Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Endothelzellen wurden auf 60,1 cm² Zellkulturschalen (TPP® Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz) kultiviert. Zunächst wurde die Zellkulturschale mit 3,5 ml Attachment Factor Protein (Gibco® by Life Technologies Corporation, Deutschland) für 20 Minuten bei Raumtemperatur vorbehandelt, um den Zellen die nötigen Anheftungsbedingungen zu gewährleisten. Danach wurde der Attachment Factor abgenommen und die Zellkulturschale einmal mit 6 ml phosphatgepufferter Salzlösung ohne Calcium und Magnesium (PBS) (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) gespült. Im Anschluss daran wurde eine Zellsuspension mit $4 \cdot 10^5$ Zellen in 8 ml Kulturmedium (EndoPrime Kit, Katalog-Nr. U050-042, (PAA) und 10 % fetalem Kälberserum (Fetal Calf Serum=FCS), (PAA)) in der Zellkulturschale ausgesät und diese dann im Inkubator (Hera cell 150, Thermo Scientific, USA) bei 37° C und 5 % Kohlenstoffdioxid inkubiert. Nach 48 Stunden wurde das alte Medium von der Zellkulturschale abgenommen, diese einmal mit vorgewärmtem PBS gespült und anschließend wieder mit 8 ml Medium bedeckt und erneut inkubiert. Wenn die Zellkulturschale zu 70-80 % konfluent bewachsen war, wurde das Medium von der Kulturschale abgenommen und diese dann zweimal mit vorgewärmtem PBS abgespült. Anschließend wurde die konfluent bewachsene Zellkulturschale mit 2 ml Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Life Technologies) für eine Minute unter den oben genannten Bedingungen inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Boden der Zellkulturschale lösten. Um das Trypsin zu neutralisieren und eine Schädigung der Zellen zu verhindern, wurde die Suspension aus Zellen und Trypsin zusätzlich mit 8 ml Medium aufgefüllt und die nun 10 ml fassende Suspension in ein 50 ml CELLSTAR®-Reagenzgefäß (Greiner Bio-One, USA) pipettiert. Von der Suspension wurden 10 µl für eine Neubauer-Zählkammer abgenommen, das Reagenzgefäß wurde für sechs Minuten bei 1200 Umdrehungen/Minute und 22° C in einer Allegra X-12R Centrifuge (Beckmann Coulter, Deutschland) zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Flüssigkeitsüberstand bis auf 0,5 ml abgenommen und die sich nun auf dem Boden des Reagenzgefäßes in Form eines Pellets befindlichen Zellen in den restlichen 0,5 ml Flüssigkeit resuspendiert. Durch Hinzugabe von Medium wurde

eine Konzentration von $5 \cdot 10^4$ Zellen/ml erreicht. Je 8 ml dieser Suspension mit $4 \cdot 10^5$ Zellen wurden in neuen Kulturschalen reinkubiert.

2.3. Matrigel-Angiogenese-Assay

Eine Möglichkeit, die Ausbildung zellulärer Netzwerke unter verschiedenen Bedingungen zu quantifizieren, bietet der *in-vitro*-Matrigel-Angiogenese-Assay. Für den *in-vitro*-Matrigel-Angiogenese-Assay wurden in jedes verwendete Well einer CELLSTAR® 96-Wellplatte (Greiner Bio-One, USA) mit flachem Boden 70 µl auf Eis aufgetauten Matrigels™ (BD Biosciences, USA) gefüllt. Für jede Versuchsvariante wurden jeweils zwei Wells verwendet. Die 96-Wellplatte wurde im Anschluss für 20 Minuten bei 37° Celsius inkubiert, damit sich das Matrigel festigen konnte. Die HPMECs wurden, wie in 2.2. beschrieben, aus der Zellkulturschale gelöst und in eine Suspension von 10^5 Zellen/ml gebracht. Von der Zellsuspension wurden 100 µl in jedes Well auf das ausgehärtete Matrigel pipettiert, was einer Zellzahl von 10 000 Zellen entsprach. Den 100 µl Zellsuspension wurden nun 100 µl Medium mit den individuell für jede Variante zu untersuchenden Zusätzen hinzugegeben, beispielsweise Medium mit einer Pravastatinkonzentration von 100 µg/ml, um final in dem Well mit 200 µl eine Pravastatinkonzentration von 50 µg/ml mit insgesamt 10^4 Zellen zu erreichen (siehe **Liste 1**). Im Anschluss wurde die 96-Wellplatte bei 37° C und 5 % Kohlenstoffdioxid inkubiert. Nach acht Stunden wurden von jedem Well vier Fotos der entstandenen Zellnetzwerke unter einem inversen Durchlichtmikroskop (DMIL-Mikroskop, Leica, Wetzlar, Deutschland) angefertigt.

Die Netzwerklängen wurden mit Image-Pro Plus Software (Media Cybernetics, USA) für jedes Bild einzeln ausgemessen, sodass pro Variante acht Messwerte mit GraphPad Prism 4 (Graph Pad, USA) ausgewertet werden konnten. Diese acht Messwerte wurden gemittelt und als Vielfaches der Kontrollgruppe dargestellt. (Wagner et al. 2013).

Liste 1 Verwendete Reagenzien in den *in-vitro*-Versuchen

- Pravastatin 25 mg (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), gelöst in PBS, finale Konzentration im Versuch von 0,05 – 50 µg/ml
- Simvastatin 5 mg (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), gelöst in DMSO, finale Konzentration im Versuch von 0,05 – 50 µg/ml

- Der selektive COX-2-Inhibitor Valdecoxib 5 mg (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), gelöst in DMSO, finale Konzentration im Versuch von 0,01 – 10 µmol/l
- Dimethylsulfoxid (DMSO), finale Konzentrationen im Versuch äquivalent zu denen der Versuchssubstanzen
- LY294002 (Tocris Bioscience, Vereinigtes Königreich), ein Inhibitor der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), finale Konzentration im Versuch von 5 µmol/l
- FR180204 (Tocris Bioscience, Vereinigtes Königreich), ein Inhibitor der extracellular signal-regulated kinase (ERK), finale Konzentration im Versuch von 25 µmol/l
- Tumornekrosefaktor- α (R&D Systems, USA), finale Konzentration im Versuch von 10 ng/ml
- Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (R&D Systems, USA), finale Konzentration im Versuch 10 ng/ml

2.4. Migrations-Modell

Für die Beurteilung der Fähigkeit von Endothelzellen zur Migration wurde der Scratch-Assay verwendet. Da Angiogenese zwingend mit der Migration von Endothelzellen einhergeht, eignet sich dieses Verfahren gut in Ergänzung zum Matrigel-Angiogenese-Assay, um die Endothelzellfunktion *in vitro* zu untersuchen. Beobachtet wurde die Endothelzellmigration unter dem Einfluss von Pravastatin, Simvastatin und DMSO. Um die Migration der Endothelzellen bei Wundverschluss beurteilen zu können, wurden sie in einer CELLSTAR® 6-Wellplatte (Greiner Bio-One) kultiviert. Jedes Well wurde erst mit 1 ml Attachment Factor für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, der Attachment Factor anschließend abgenommen und die Wells danach mit jeweils 2 ml PBS einmal gespült. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Zellkulturschale gelöst und mit einer Anzahl von $5 \cdot 10^4$ HPMECs pro Well wieder ausgesät. Nun wurden die Zellen bei 37° C und 5 % Kohlenstoffdioxid inkubiert, alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt. Wenn der Zellboden konfluent bewachsen war, wurde das Medium aus dem Well abgenommen und der Zellrasen zweimal mit vorgewärmtem PBS gespült. Im Anschluss wurde mit der Pipettenspitze einer Eppendorf 0,5-10 µl-Pipette (Eppendorf AG, Deutschland)

eine Wundfläche im Zellrasen verursacht, indem jeweils zwei zueinander parallele Linien in einem Winkel von 90° durch den Zellrasen gezogen wurden. Auf diese Weise entstanden pro Well vier Kreuze mit einer Wundfläche von ca. 160 µm Kantenlänge. Zu den Zellen wurden nun nach erneutem Spülen mit vorgewärmtem PBS, um die beim Scratchen entstandenen Zelltrümmerreste zu entfernen, 5 ml Medium gegeben. Mit dem Medium wurde der zu untersuchende Stoff in der zuvor für die erwünschte Konzentration errechneten Menge vermischt, z.B. 50 µl einer Pravastatinlösung in PBS mit einer Konzentration von 5 mg/ml, um eine finale Pravastatinkonzentration von 50 µg/ml im Well zu erhalten. Die Kreuze wurden dann abfotografiert und das Well anschließend bei den in 2.2. genannten Bedingungen inkubiert. Im Abstand von 2 Stunden wurden Fotos von allen Kreuzen aufgenommen, sodass nach 8 Stunden von jeder Variante jeweils 4 Fotos nach 0, 2, 4, 6 und 8 Stunden existierten. Pro Kreuz und Zeitpunkt konnten mit Image Pro Plus vier Wundkantenlängen bestimmt werden, anhand derer dann der prozentuale Wundverschluss ermittelt wurde. Dieser diente als Maß der Endothelzellmigration und dem Vergleich der verschiedenen Gruppen untereinander (Wagner et al. 2013).

2.5. Durchflusszytometrie

Das Medium der konfluent bewachsenen 60,1 cm²-Zellkulturschale wurde abgenommen. Es folgte ein Waschvorgang mit PBS. Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml frischem Medium bedeckt. Entsprechend der jeweiligen Untersuchung wurde die zuvor errechnete Menge des Statins (Pravastatin bzw. Simvastatin) hinzugegeben. Nach achtstündiger Inkubation unter den in 2.2. genannten Bedingungen wurden die Zellen von der Zellkulturschale gelöst, in Puffer (PBS mit 0,5 % FCS) resuspendiert und zweimal in Pufferlösung gewaschen. 1x10⁶ Zellen wurden mit je 5 µL Annexin-V und 5 µl Propidium-Iodid für 15 Minuten inkubiert und anschließend der Analyse mit einem Durchflusszytometer (Becton Dickinson, USA) zugeführt. Nekrotische Zellen stellen sich als zweifach positiv dar, vitale als zweifach negativ.

2.6. Western Blot

Zur Vorbereitung wurden die HPMECs wie in 2.2. beschrieben auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät und kultiviert, bis sich ein konfluenter Zellrasen entwickelt hatte. Dann wurde das Medium abgenommen, 1 ml frisches Medium in jedes Well

gegeben und im Anschluss daran die zu untersuchende Substanz hinzugefügt (siehe **Liste 1**). Die Zellen wurden nun bei 37° C und einer Kohlenstoffdioxidkonzentration von 5 % für 12 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium von den Wells abgenommen und diese unmittelbar danach zweimal mit eiskaltem PBS abgespült. Das PBS wurde anschließend komplett unter Zuhilfenahme einer 100-1000 µl-Eppendorfpipette aus den Wells entfernt. In die Wells wurden dann jeweils 180 µl Homburg Lysepuffer (Tris 1 M pH 7,5, EDTA 250 M, Triton-X-100 10 %, Natriumazid 4 %, Phenylmethylsulfonylfluorid 100 M, Protease Inhibitor Cocktail (Sigma Aldrich), Natriumchlorid 5 M (Serag Wiessner, Deutschland), destilliertes Wasser (Braun, Deutschland)) pipettiert. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber 16 cm (Sarstedt, Deutschland) von dem Well gelöst und die dabei entstandene Zellsuspension in ein eisgekühltes 15 ml CELLSTAR®-Reagenzgefäß (Greiner Bio-One) überführt. Die Zellsuspension wurde alle zehn Minuten durchmischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Hiernach wurden die Reagenzgefäße für 10 Minuten bei 4° C mit 3750 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Die proteinhaltigen Überstände wurden abgenommen und identische Proteinmengen elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamid-Gel (Sigma-Aldrich) nach ihrem Molekulargewicht fraktioniert und anschließend auf eine Nitrocellulosemembran (Millipore Corporation, USA) übertragen. Die Membran wurde zwei Stunden mit 2,5 % bovinem Serumalbumin (BSA)(PAA) geblockt und im Anschluss über Nacht bei 4° C mit dem Primär-Antikörper inkubiert (siehe **Liste 2**). Die Proteinbanden wurden mit dem an Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase = HRP) gebundenen Sekundärantikörper sichtbar gemacht, indem sie bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert wurden und die HRP mit verstärktem Chemilumineszenz Substrat (Thermo Fisher Scientific, USA) und Autoradiographie (Bio Rad Universal Hood 2, USA) detektiert wurde. Die Densometrie wurde mit Quantity One 4.6.6.0 Software (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt.

Liste 2 Verwendete Antikörper im Western Blot:

- Anti-Human COX-2 Antikörper (Katalognummer AF 4198, R&D Systems, Minneapolis, USA)
- Anti-Maus-IgG HRP-gekoppelter Antikörper (Katalognummer HAF007, R&D Systems, Minneapolis, USA)

2.7. Statistische Versuchsauswertung

Die Darstellung der Versuchsergebnisse erfolgte als Mittelwert inklusive der Standardabweichung. Sämtliche Kontrollgruppen wurden auf den Wert eins normiert, die Vergleichsgruppen wurden als Vielfaches der jeweiligen Kontrolle angegeben. Dies stellte die Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Versuche sicher. Hierzu wurde die Graph-Pad-Prism-Software 4.01 (Graph Pad, USA) verwendet, die Signifikanzprüfung erfolgte mit dem One-Way ANOVA mit der Korrektur nach Bonferroni.

3. Ergebnisse

3.1. Pravastatin reduziert die alveoläre Schädigung von reanimierten Mäusen, Simvastatin hingegen zeigt keinen Effekt.

Bei den reanimierten Tieren, die mit der Trägersubstanz (NaCl) behandelt wurden, zeigte sich eine Zunahme der Alveolarseptendicke (ca. 25%). Bei den mit Pravastatin behandelten reanimierten Tieren war eine geringe bzw. tendenzielle Zunahme der Alveolarseptendicke zu beobachten, die jedoch nicht statistisch signifikant war.

Bei den reanimierten Tieren, die mit der Trägersubstanz (Clinoleic) behandelt wurden, zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der Alveolarseptendicke (ca. 25%). Dies war auch bei den mit Simvastatin behandelten reanimierten Tieren zu beobachten.

Im Vergleich zu den mit Simvastatin behandelten Tieren ist die Alveolarseptendicke bei den mit Pravastatin behandelten Tieren signifikant geringer (**Abbildung 2 u. 3**).

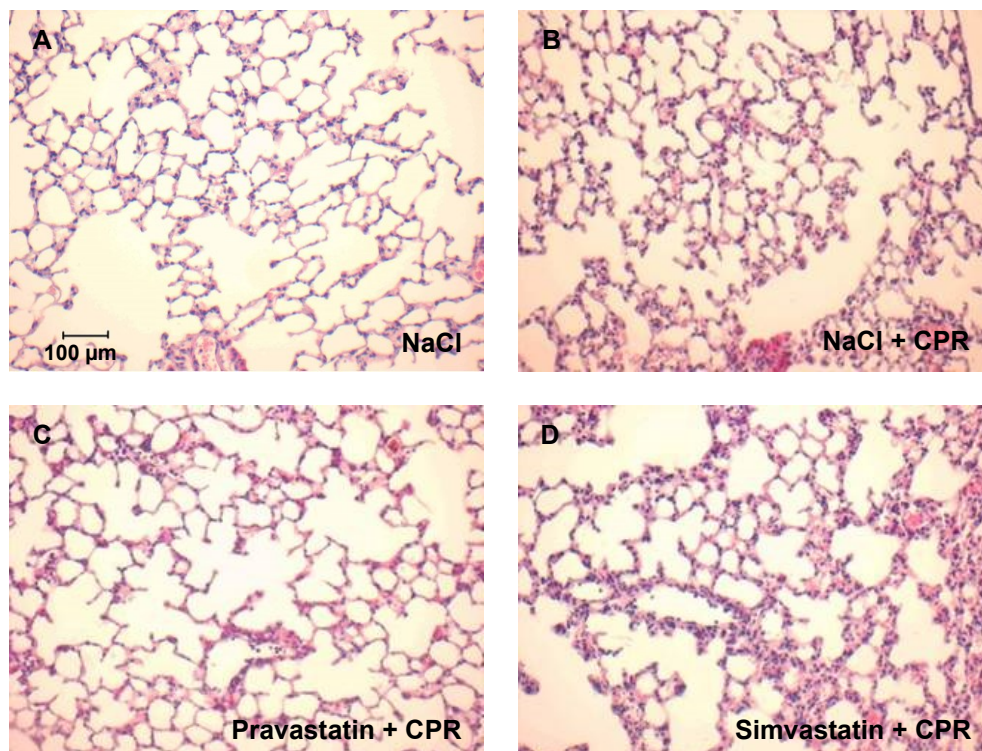
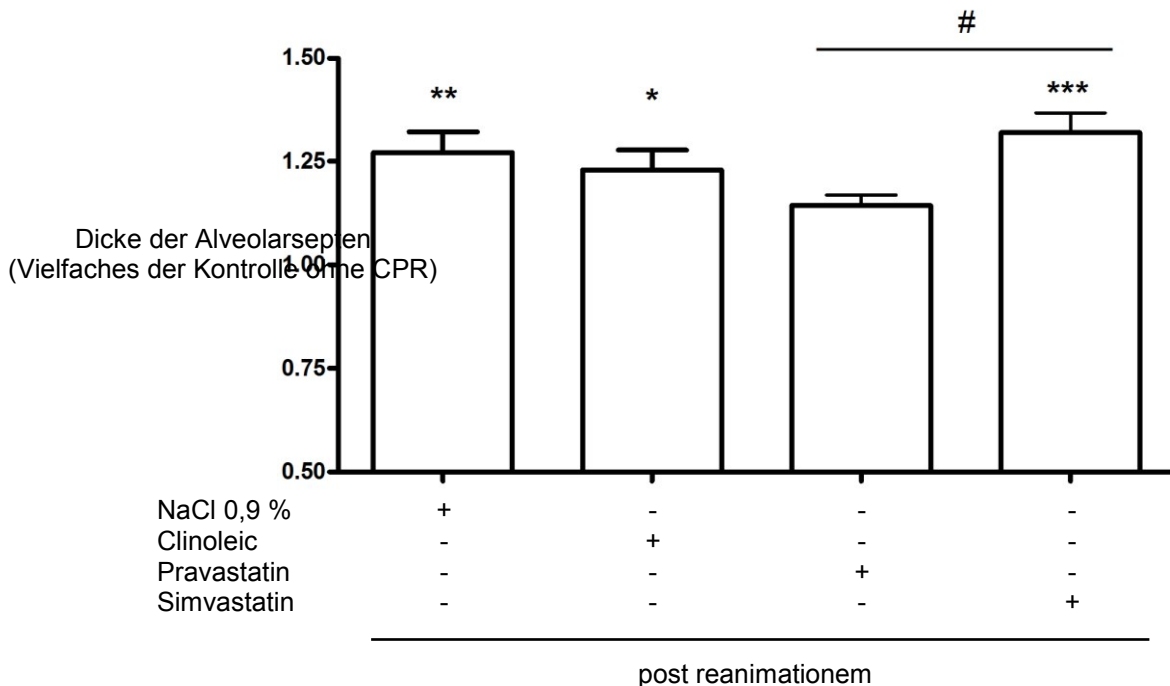


Abbildung 2: Histologische Schnitte muriner Lungen

Ausschnitte aus Gewebeproben von murinen Lungen in HE-Färbung bei 200facher Vergrößerung zur Beurteilung eines pulmonalen Ödems nach Reanimation (CPR). **A** NaCl, keine Reanimation. **B** Reanimation + NaCl. **C** Reanimation + Pravastatin 0,5 mg/kg



Körpergewicht. **D** Reanimation + Simvastatin 0,5 mg/kg Körpergewicht.

Abbildung 3: Zunahme der Dicke von Alveolarsepten post reanimationem

Bei 200facher Vergrößerung wurden die Lungen von n=3 Tieren in jeder Kontrollgruppe bzw. n=5-7 Tieren in den Reanimationsgruppen untersucht. Es zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Dicke von Alveolarsepten nach Reanimation mit NaCl, Clinoleic und Simvastatin; *P<0,05 vs. Kontrolle, **P<0,01 vs. Kontrolle, ***P<0,001 vs. Kontrolle, #P<0,05 vs. Pravastatin.

3.2. Pravastatin und Simvastatin haben keinen Einfluss auf die alveoläre Leukozyteninfiltration von reanimierten Mäusen.

Nach der Reanimation war eine Zunahme der alveolären Leukozyteninfiltration in allen Gruppen zu beobachten (ca. 50%). Weder die Trägersubstanzen noch Pravastatin oder Simvastatin zeigten einen Effekt auf die Leukozyteninfiltration (Abbildung 4).

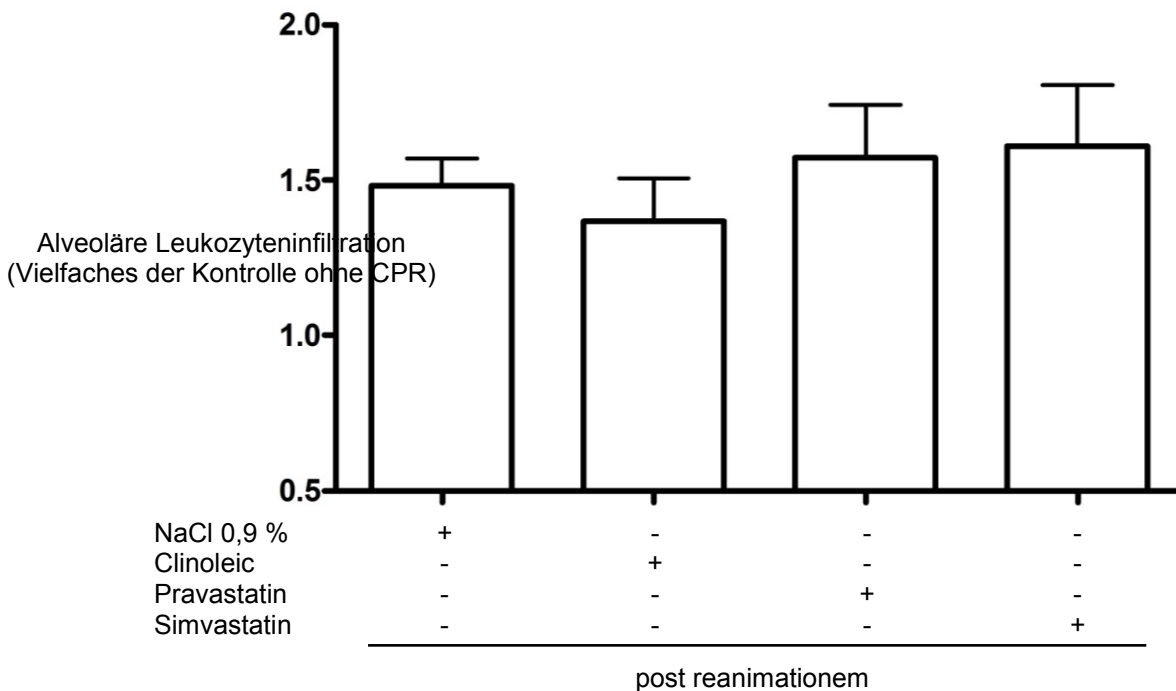


Abbildung 4: Relative alveoläre Leukozyteninfiltration nach Reanimation

Bei einer 200fachen Auflösung wurde post reanimationem keine signifikant erhöhte relative alveoläre Leukozyteninfiltration beobachtet, untersucht wurden n=3 Tiere in jeder Kontrollgruppe bzw. n=5-7 Tiere in den Reanimationsgruppen.

3.3. Pravastatin fördert und Simvastatin hemmt die Netzwerkbildung humaner pulmonaler mikrovaskulärer Endothelzellen *in vitro*

Für diese Untersuchung wurde der Matrigel-Angiogenese-Assay mit steigender Statinkonzentration (Pravastatin und Simvastatin) von 0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, 25 µg/ml und 50 µg/ml sowie Kontrollen durchgeführt (jeweils n=6).

Pravastatin förderte die Netzwerkbildung, was sich in einer Zunahme der kumulativen Kapillarlänge zeigte. Dabei scheint dieser Effekt dosisabhängig zu sein. Bei den untersuchten Konzentrationen konnten weder ein Plateau noch toxische Effekte beobachtet werden (**Abbildung 5**).

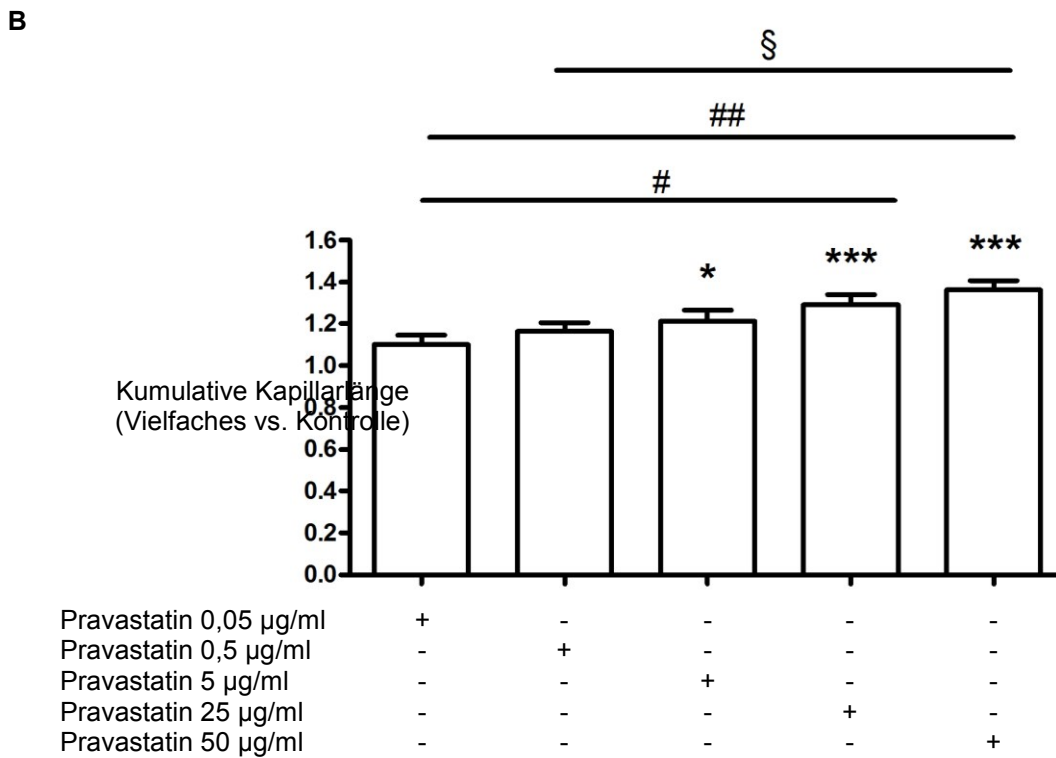
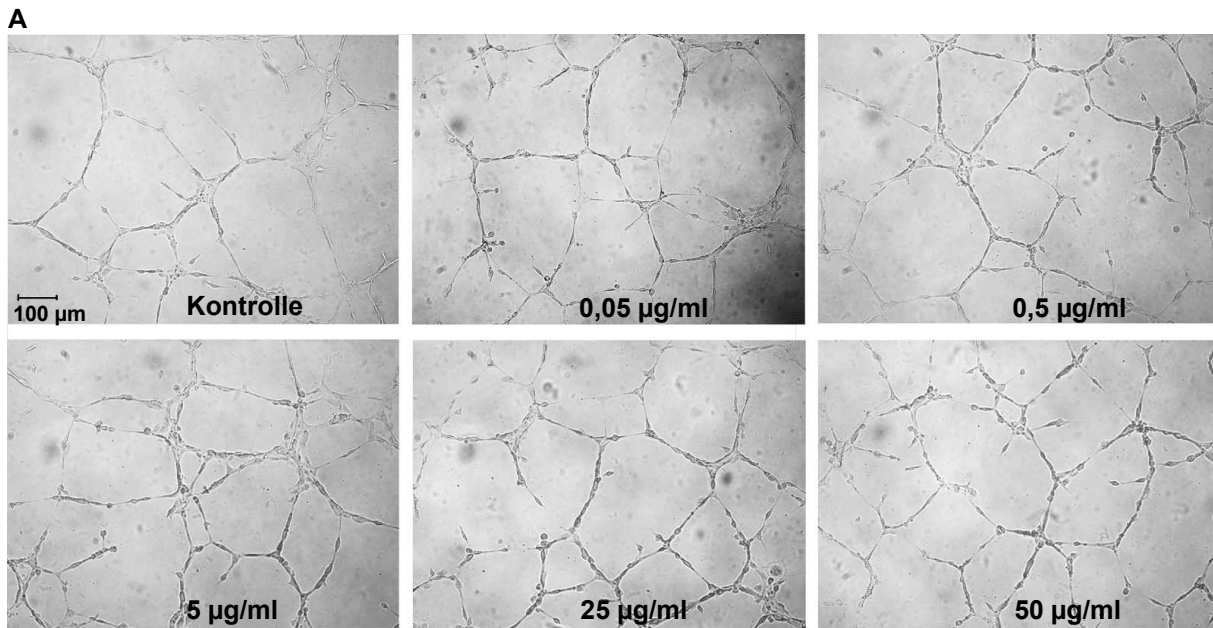
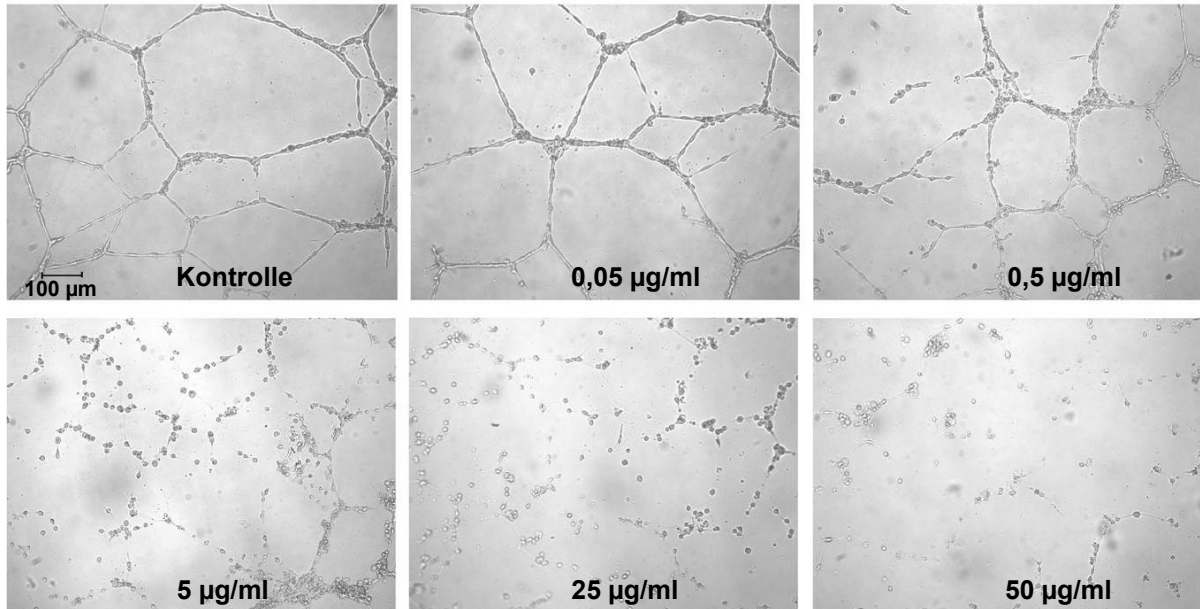


Abbildung 5: *In-vitro*-Angiogenese nach acht Stunden bei steigender Konzentration von Pravastatin

A Bei steigender Konzentration von Pravastatin zeigt sich eine verstärkte Ausbildung zellulärer Netzwerke im Matrigel-Angiogenese-Assay. **B** Dargestellt ist eine Zunahme der kumulativen Kapillarlänge als Vielfaches der Kontrolle bei steigender Konzentration von Pravastatin; * $P < 0,05$ gegen Kontrolle, ** $P < 0,01$ gegen Kontrolle, *** $P < 0,001$ gegen Kontrolle; # $P < 0,05$ gegen Pravastatin=0,05 µg/ml, ## $P < 0,01$ gegen Pravastatin=0,05 µg/ml; § $P < 0,05$ gegen Pravastatin=0,5 µg/ml; n=6 Versuche.

Bei der Inkubation mit Simvastatin hingegen zeigte sich im Matrigel-Angiogenese-Assay eine dosisabhängige Abnahme der kumulativen Kapillarlänge. Ab einer Konzentration von 5 µg/ml Simvastatin war ein Absterben der Endothelzellen zu beobachten, und zwar zunehmend bei steigender Dosis (**Abbildung 6**).

A



B

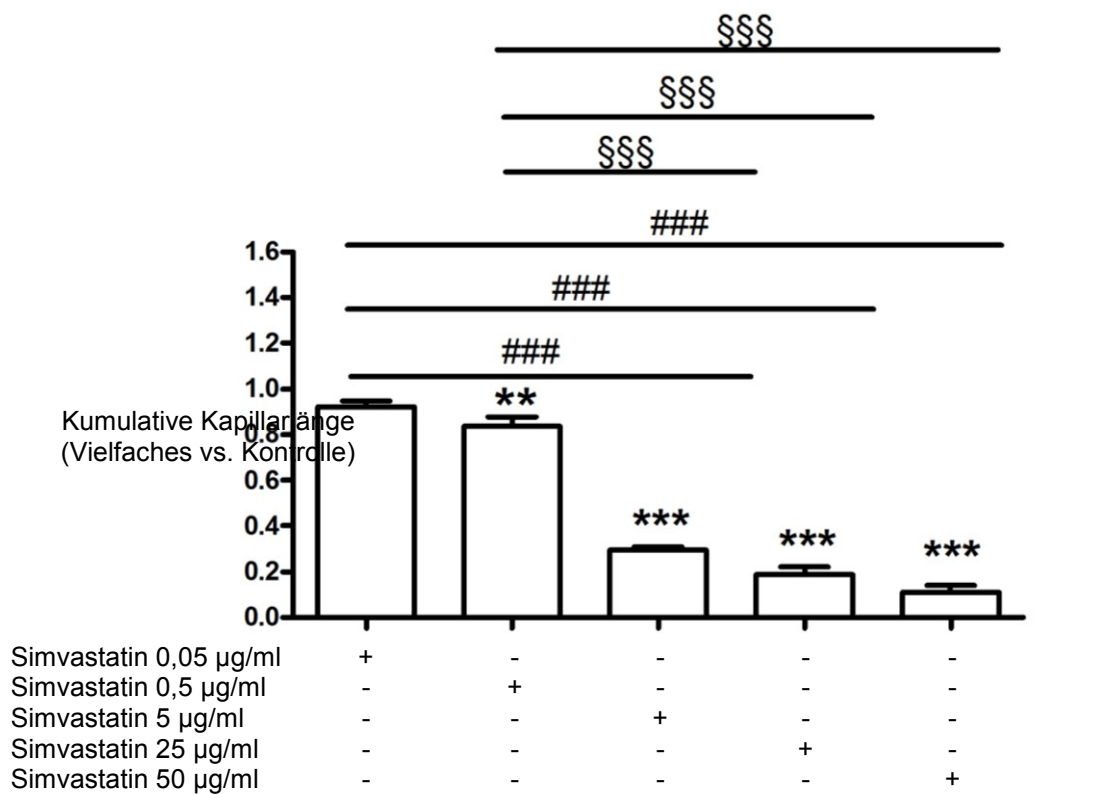


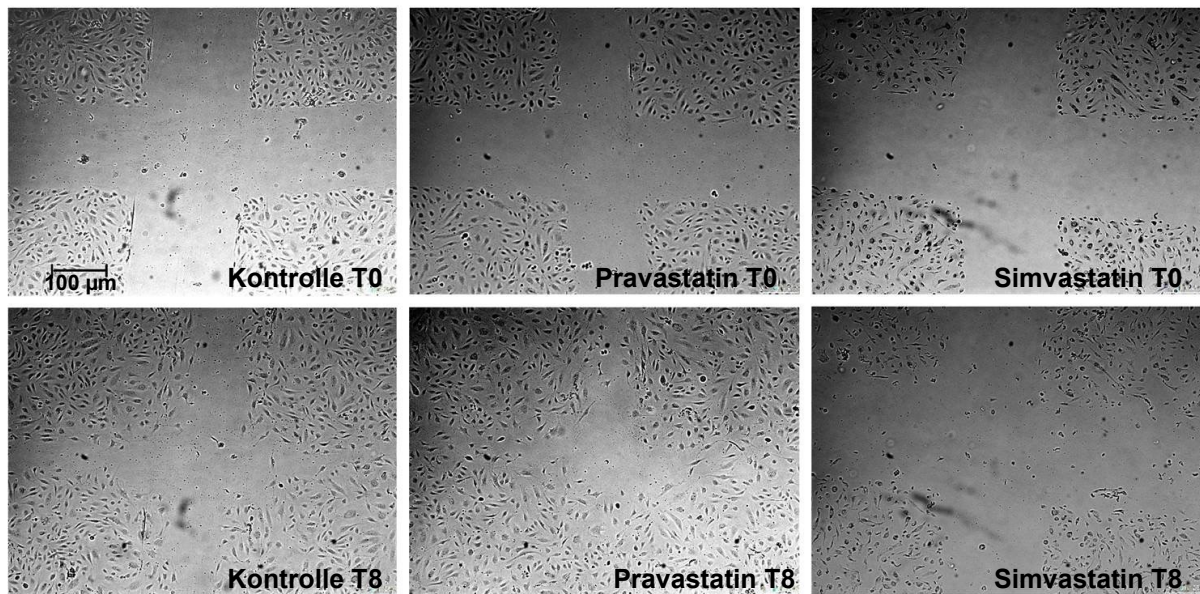
Abbildung 6: *In-vitro*-Angiogenese nach acht Stunden bei steigender Konzentration von Simvastatin

A Bei steigender Konzentration von Simvastatin zeigt sich eine Abnahme der Netzworkebildung bis hin zum Ausbleiben von zellulären Netzwerken. **B** Dargestellt ist eine dosisabhängige Abnahme der zellulären Netzworkebildung bei steigender Konzentration von Simvastatin; **P<0,01 gegen Kontrolle, ***P<0,001 gegen Kontrolle; ####P<0,001 gegen Simvastatin=0,05 µg/ml; §§§P<0,001 gegen Simvastatin=0,5 µg/ml; n=6 Versuche.

Zusätzlich zu den Matrigel-Angiogenese-Assays wurde ein Scratch-Assay durchgeführt, der Aussagen zum Migrationsverhalten von Endothelzellen unter Prava- und Simvastatinbehandlung geben sollte (n=6). Dabei wurden Pravastatin und Simvastatin in Konzentrationen von 50 µg/ml verwendet. Als Kontrolle dienten der Lösungsvermittler DMSO und NaCl.

Es zeigte sich, dass Pravastatin die endotheliale Migration signifikant förderte. Nach 8h hatte sich die Wunde im Zellrasen (Scratch) zu 85% geschlossen. Demgegenüber schienen die Endothelzellen unter dem Einfluss von Simvastatin ihre Fähigkeit zur Migration fast komplett verloren zu haben, da die Verletzung nach 8h teilweise noch weiter zugenommen hatte (**Abbildung 7**). Diese Beobachtung könnte durch ein Absterben der Endothelzellen erklärt werden.

A



B

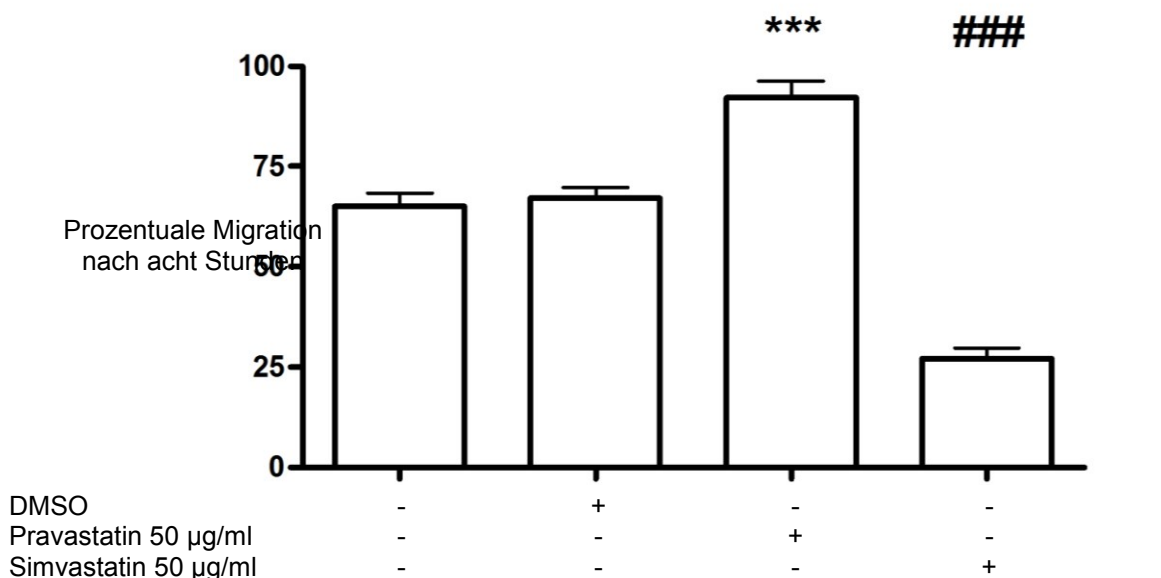


Abbildung 7: Endothelzellmigration unter dem Einfluss von Simva- und Pravastatin nach acht Stunden

A Die Endothelzellmigration fällt unter Inkubation mit Pravastatin höher aus als in der Kontrollgruppe, Simvastatin hingegen hemmt die *in-vitro*-Migration. **B** Es zeigt sich im Vergleich zu NaCl eine signifikant erhöhte Endothelzellmigration unter dem Einfluss von Pravastatin, Simvastatin wirkt sich signifikant negativ auf die Migration aus; *** $P < 0,001$ gegen NaCl, ### $P < 0,001$ gegen Clinoleic; $n = 6$ Versuche.

3.4. Simvastatin induziert Nekrose in humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen *in vitro*

Um den Verdacht solcher toxischen Effekte zu untersuchen, wurden die Endothelzellen nach Prava- und Simvastatinbehandlung mit Annexin-V und

Propidiumiodid inkubiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen. Annexin-V bindet an Phosphatidylserin und ist ein Marker für Apoptose, während Propidiumiodid nur durch zerstörte Zellmembranen in die Zellen eindringen kann und so nekrotische Zellen identifiziert (Yedjou et al. 2013).

Bei den mit Pravastatin behandelten Endothelzellen (25 und 50 µg/ml) war weder eine Veränderung der Apoptose- noch eine Veränderung der Nekroserate zu beobachten (**Abbildung 8**).

Im Gegensatz dazu war bei den mit Simvastatin behandelten Zellen eine Verdoppelung (25 µg/ml) bzw. eine Verfünffachung der Nekrose- und Apoptoserate zu beobachten (**Abbildung 9**).

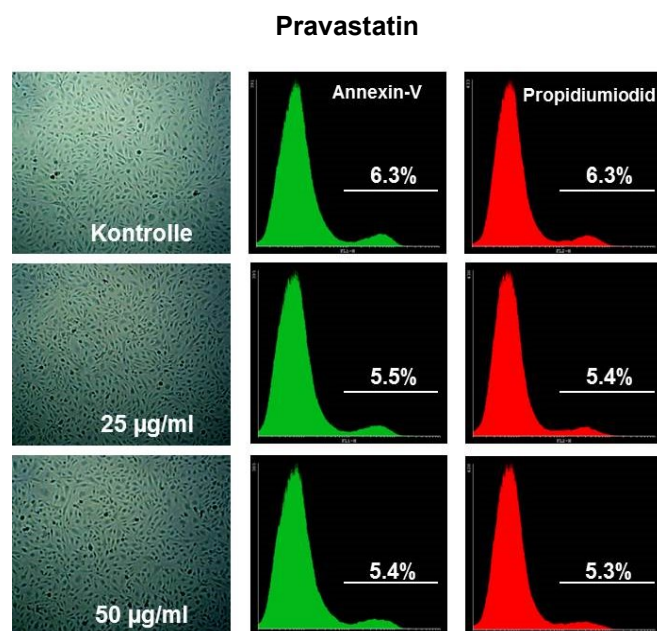


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse von Endothelzellen bei Inkubation mit Pravastatin

Apoptose und Nekrose nehmen unter Pravastatineinwirkung nicht zu (exemplarische Darstellung eines repräsentativen Versuches).

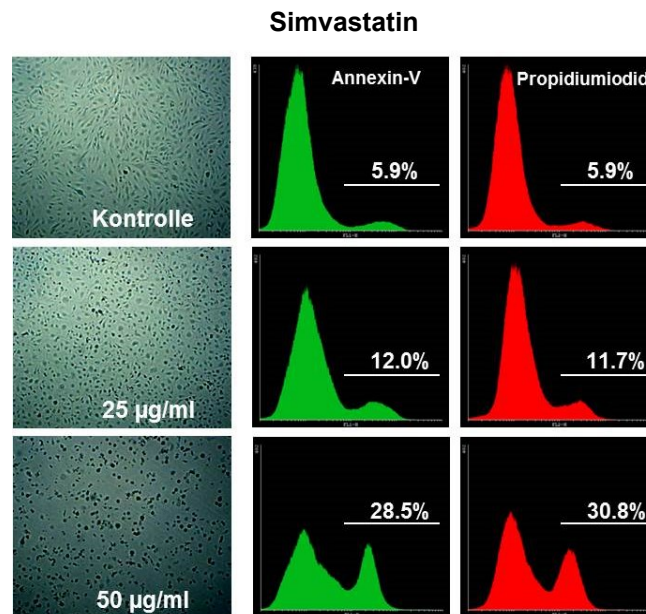


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse von Endothelzellen bei Inkubation mit Simvastatin

Grafische Darstellung Annexin-V- u. Propidiumiodid-positiver Zellen, deutlicher Anstieg der nekrotischen und apoptotischen Zellen unter Simvastatintherapie (exemplarische Darstellung eines repräsentativen Versuches).

3.5. Simvastatin induziert endotheliale COX-2-Protein-Level

Nach den Hinweisen auf eine zytotoxische und antiangiogene Wirkung Simvastatins und die proangiogene Wirkung von Pravastatin stellte sich die Frage nach einem zugrundeliegenden Mechanismus.

In der Literatur ist beschrieben, dass Statine sowohl Einfluss auf die Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) als auch auf ihre Aktivität nehmen können. So scheint Simvastatin eine Reduktion der TNF α -vermittelten COX-2-Expression zu bewirken. Allerdings wurde auch eine Statin-vermittelte COX-2-Induktion beschrieben (Massaro et al. 2010; Chen et al. 2004). Einflüsse der COX-2 auf die Angiogenese scheinen jedoch gesichert (Kuwano et al 2004).

Zur Klärung eines möglichen COX-2-abhängigen Effektes wurde der COX-2-Level der HPMECs unter dem Einfluss von Statinen mittels Western Blots untersucht. Hierfür wurden HPMECs mit TNF α , Simva- und Pravastatin inkubiert. Als Kontrolle

dienten DMSO und PBS. Es zeigte sich, dass Simvastatin einen hohen Protein-Level der endothelialen COX-2 induziert, Pravastatin hingegen nicht (**Abbildung 10**).

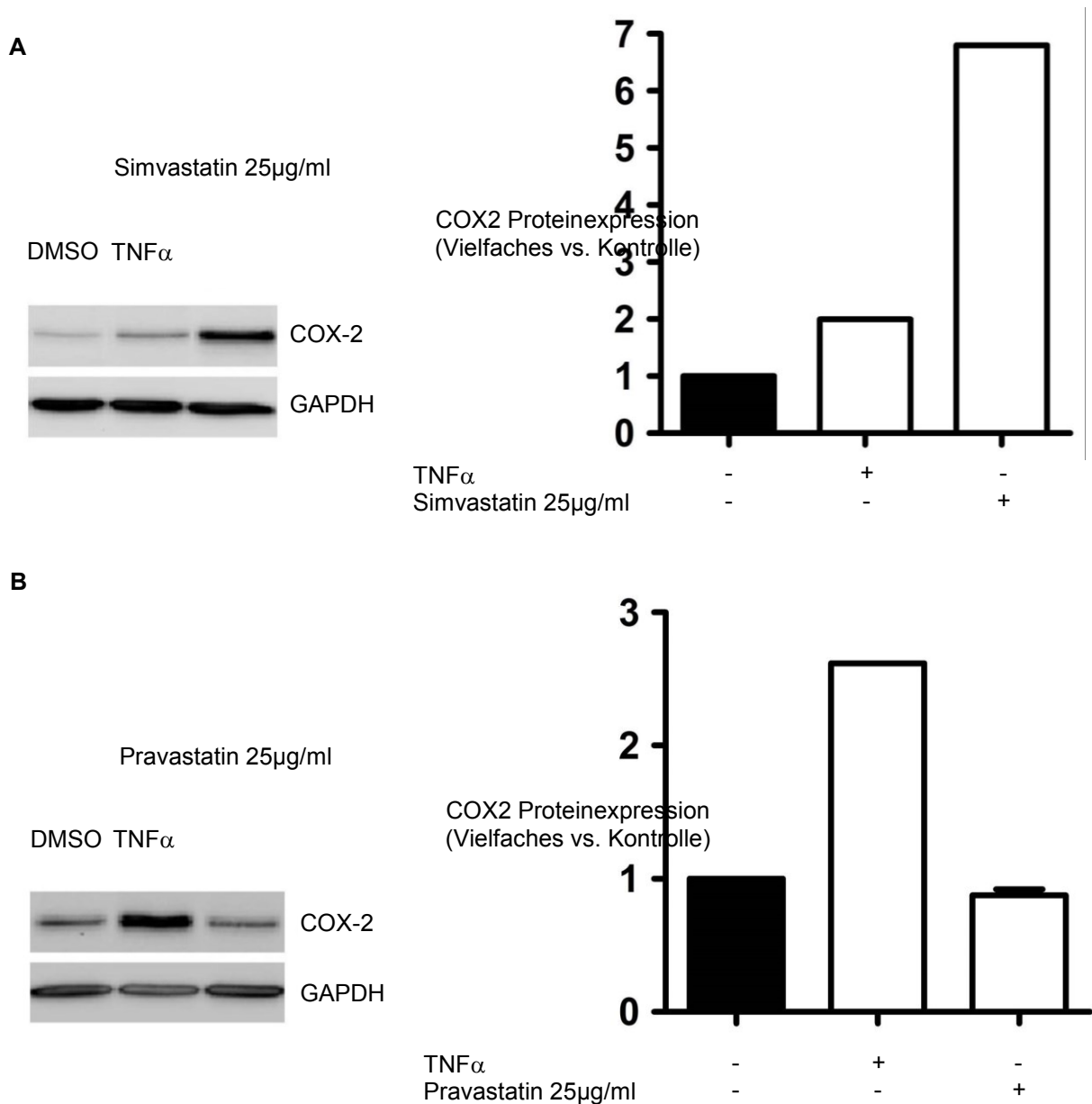
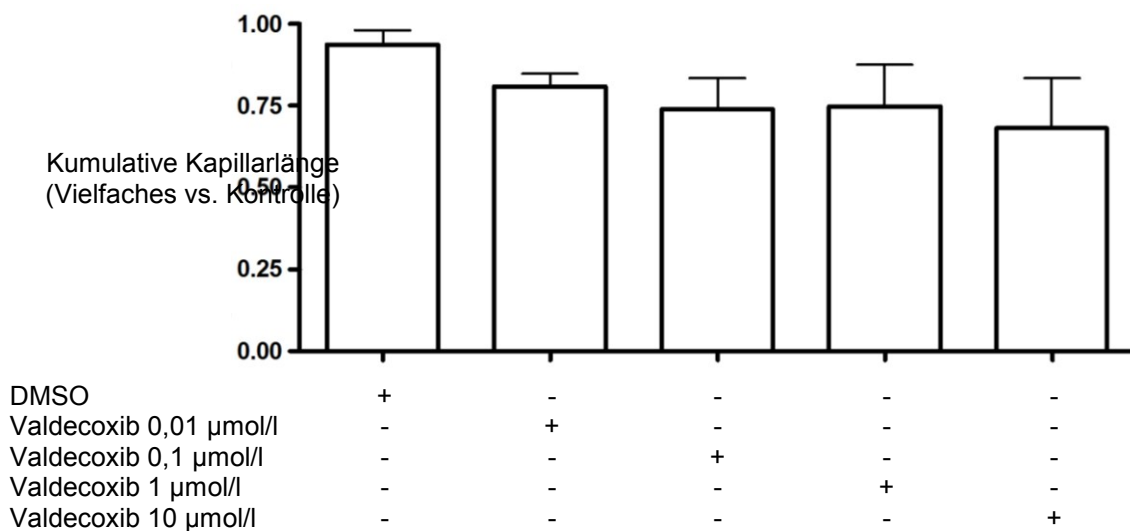


Abbildung 10: Einfluss von Statinen auf den endothelialen COX-2-Protein-Level

A Unter der Einwirkung von Simvastatin kommt es zu einem massiv erhöhten COX-2-Protein-Level, deutlich ausgeprägter als unter dem Einfluss von TNF α . **B** Pravastatin führt zu keinem gesteigerten COX-2-Niveau der Endothelzelle; gezeigt ist ein repräsentativer Versuch.

3.5.1. Eine funktionelle COX-2-Inhibition beeinflusst nicht die Wirkung Simvastatins auf das Endothel

Nun stellte sich die Frage, ob die Einflüsse von Simva- und Pravastatin auf das Angiogenese- und Migrationsverhalten der HPMECs COX-2-vermittelt sind. Daher wurden in einem weiteren Versuch Endothelzellen mit Valdecoxib, einem selektiven COX-2-Inhibitor, co-inkubiert und anschließend Matrigel-Angiogenese-Assays mit aufsteigenden Valdecoxibkonzentrationen angefertigt (**Abbildung 11**). Dabei



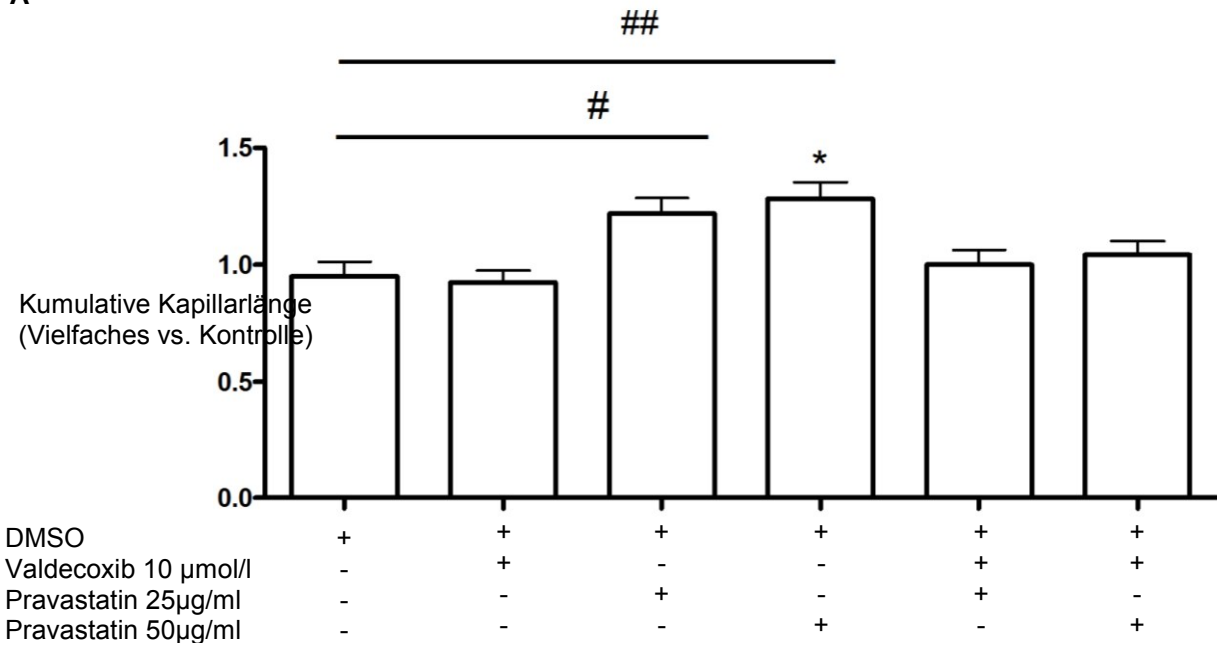
konnten keine signifikanten Einflüsse von Valdecoxib identifiziert werden.

Abbildung 11: *In-vitro*-Angiogenese bei steigender Valdecoxibkonzentration

Die Ausbildung zellulärer Netzwerke *in vitro* wird von steigenden Valdecoxibkonzentrationen im Matrigel-Angiogenese-Assay nicht signifikant beeinflusst; n=5 Versuche.

Zur Überprüfung der These, dass die COX-2 an der Effektvermittlung von Simvastatin und Pravastatin beteiligt ist, wurden n=6 bzw. n=3 Matrigel-Angiogenese-Assays in Co-Inkubation mit Valdecoxib durchgeführt. So wurden HPMECs in Gegenwart von Valdecoxib=10 µmol/l und Pravastatin bzw. Simvastatin=25 µg/ml und 50 µg/ml auf Matrigel inkubiert. Die kumulative Kapillarlänge fiel unter Co-Inkubation von Pravastatin mit Valdecoxib geringer aus als unter alleiniger Pravastatinwirkung. Bei der Co-Inkubation von Valdecoxib mit Simvastatin zeigten sich keine Unterschiede zur alleinigen Simvastatinwirkung (**Abbildung 12**).

A



B

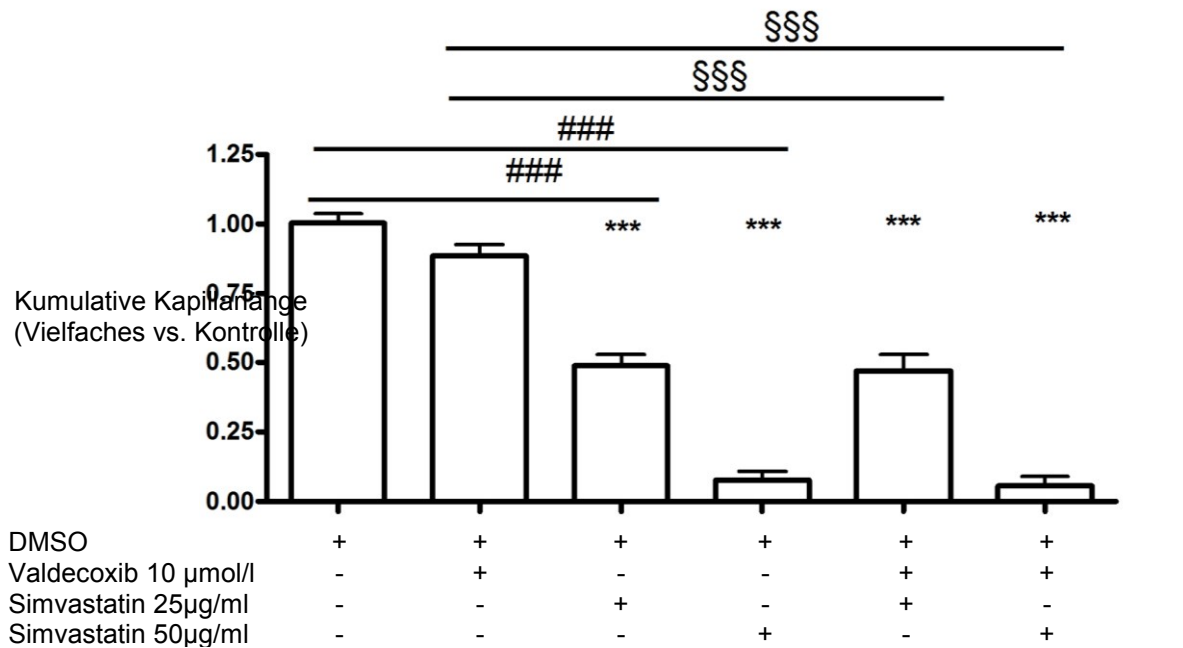


Abbildung 12: Co-Inkubation von Endothelzellen mit Valdecoxib und Statinen

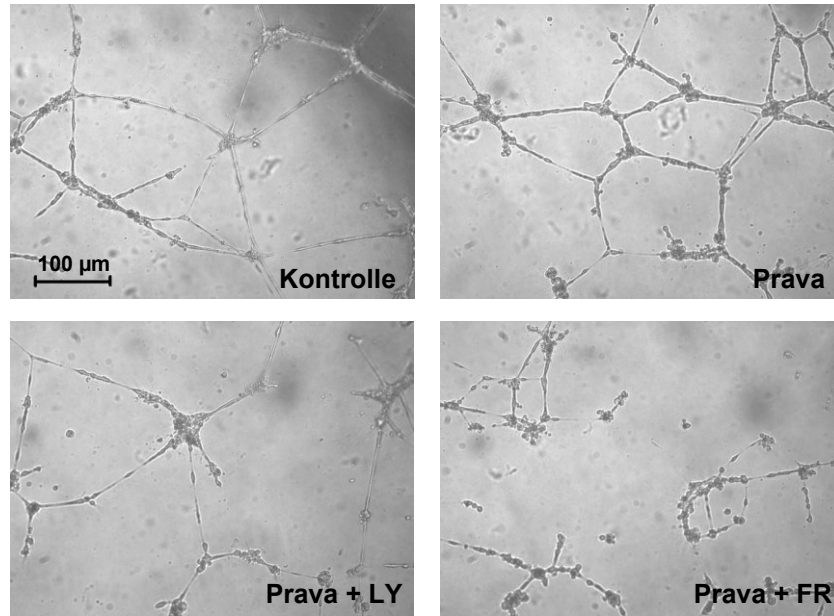
A Co-Inkubation von Pravastatin mit Valdecoxib scheint die proangiogenen Effekte Pravastatins aufzuheben; *P<0,05 gegen Kontrolle #P<0,05 gegen DMSO, ###P<0,01 gegen DMSO; n=6 Versuche. **B** Bei Co-Inkubation von Simvastatin mit Valdecoxib zeigt sich keine Beeinflussung der bekannten Effekte Simvastatins; ***P<0,001 gegen Kontrolle, ####P<0,001 gegen DMSO, §§§P<0,001 gegen Valdecoxib; n=3 Versuche.

3.6. AKT-/ERK-Inhibition vermindert die von Pravastatin vermittelten Effekte auf Endothelzellen

Angiogenese geht zwingend mit einer Endothelzellproliferation und -migration einher. Es ist bekannt, dass die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K), deren Aktivierung in eine Rekrutierung der AKT-Kinasen mündet, eine tragende Rolle bei der Zellproliferation spielt (Vivanco et al. 2002). Nakao et al. haben untersucht, ob und wie Pravastatin die Migration und Proliferation von Endothelzellen steigert. Es konnte gezeigt werden, dass Pravastatin die Endothelzellproliferation und -migration steigert und dass diese Steigerung durch Inhibition der PI3K aufgehoben werden kann (Nakao et al. 2007). Shiota et al. konnten zeigen, dass Pravastatin sowohl zur Aktivierung der AKT- als auch der ERK-Kinasen führt (Shiota et al. 2012). Für Simvastatin ist beschrieben, dass es die durch mechanischen Stress und LDL-Cholesterin-induzierte Aktivierung der Extrazellulär-Signal-regulierten Kinase (ERK), welche ebenfalls einen hohen Stellenwert in der Proliferation von Zellen einnimmt, inhibiert (Zhang et al. 2013).

Davon ausgehend wurden n=5 Matrigel-Angiogenese-Assays angefertigt, um zu untersuchen, in wieweit sich eine Blockade des PI3K- bzw. ERK-Signalwegs auf die Pravastatin-induzierte Angiogenese auswirkt. Hierbei wurden LY294002 als PI3K-Inhibitor und FR180204 zur Unterbrechung des ERK-Signalwegs verwendet. Bei Co-Inkubation von Pravastatin mit LY294002 respektive FR180204 zeigte sich eine Abnahme der kumulativen Kapillarlänge im Vergleich zur alleinigen Inkubation mit Pravastatin (**Abbildung 13**).

A



###

B

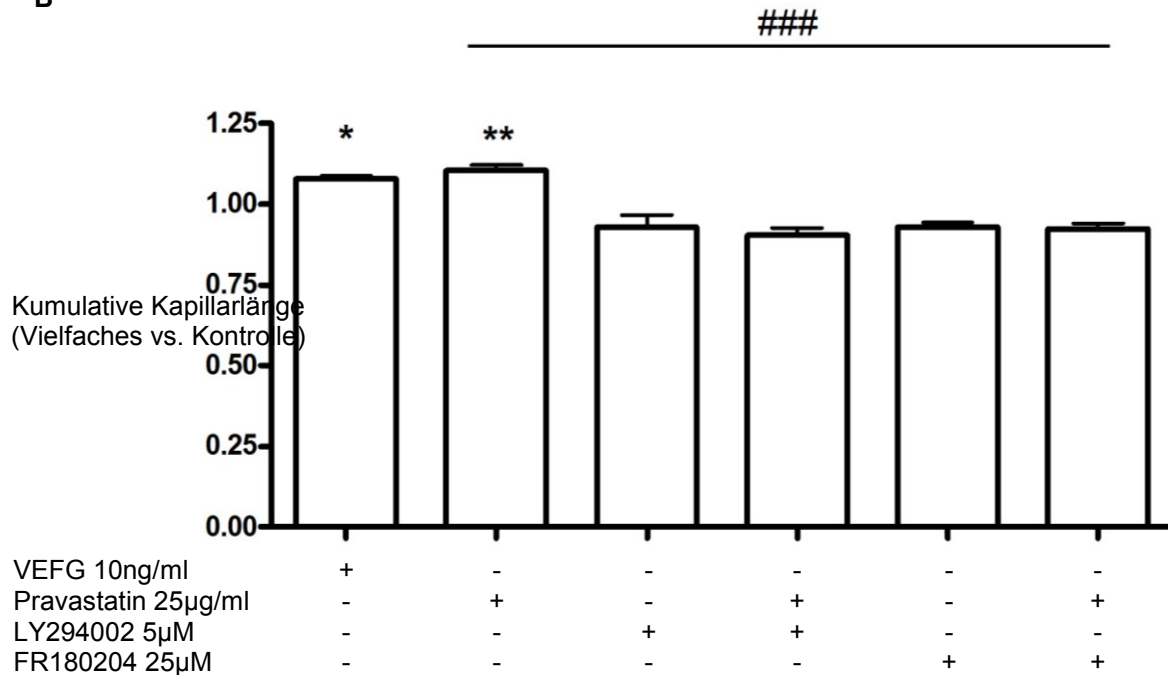
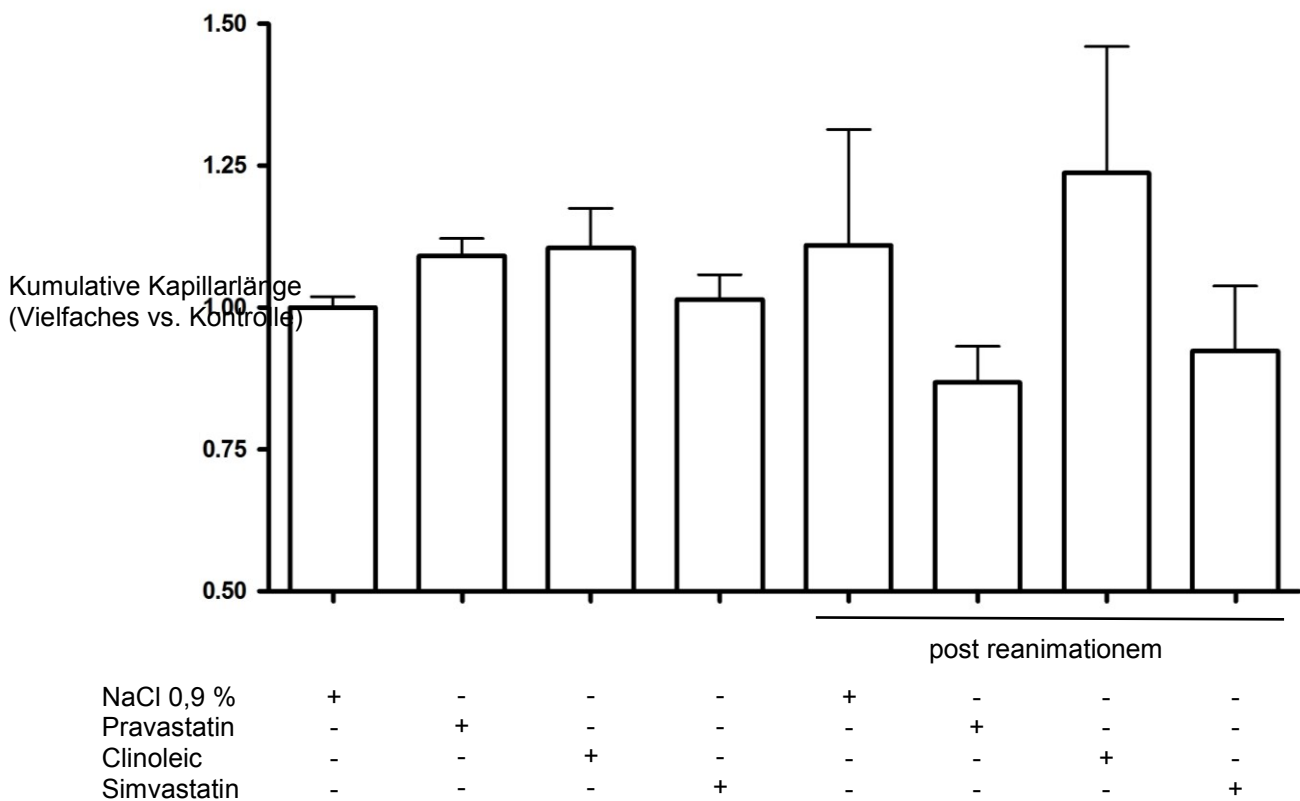


Abbildung 13: Einfluss von ERK- und PI3K-Inhibition auf Pravastatin-vermittelte Angiogenese *in vitro*

A Bei Co-Inkubation von HPMECs mit Pravastatin und dem PI3K-Inhibitor LY294002 bzw. dem ERK-Inhibitor FR180204 zeigt sich eine Aufhebung der proangiogenen Effekte. Als Positivkontrolle wurde VEGF verwendet. **B** * $P < 0,05$ gegen Kontrolle, ** $P < 0,01$ gegen Kontrolle, ### $P < 0,001$ gegen Pravastatin; ausgewertet wurden $n=5$ Versuche.

Abschließend wurde untersucht, ob das Plasma von reanimierten Mäusen einen Einfluss auf die Angiogeneseeigenschaften der HPMECs *in vitro* hat. Dazu wurde wiederum der Matrigel-Angiogenese-Assay angewendet: die Zellen wurden mit Plasma von reanimierten Mäusen, das 8 Stunden nach Reanimation entnommen wurde, inkubiert. Als Kontrollen diente Plasma von Mäusen, die nicht reanimiert wurden.

Hierbei zeigte sich, dass die Verabreichung eines Statins mit und ohne Reanimation nach acht Stunden keinen signifikanten Einfluss auf die angiogene Potenz von



HPMECs *in vitro* hat (**Abbildung 14**).

Abbildung 14: *In-vitro*-Angiogenese nach Reanimation

Kumulative Kapillarlänge als Vielfaches von NaCl; verwendet wurden n=3 Mäuse je Kontrollgruppe und n=5-7 Mäuse je Reanimationsgruppe.

4. Diskussion

Der Herzstillstand, gefolgt von einer kardiopulmonalen Reanimation, betrifft jedes Jahr eine Vielzahl von Patienten und geht trotz intensiver Forschung nach wie vor mit einer hohen Sterblichkeit und schweren neurologischen Beeinträchtigungen einher. Unsere Arbeitsgruppe hat in einem Modell der kardiopulmonalen Reanimation von Mäusen gezeigt, dass die Applikation von Pravastatin das Überleben und die neurologische Beeinträchtigung der Tiere post reanimationem verbesserte, wohingegen die Applikation von Simvastatin mit keinerlei günstigen Effekten einherging (Bergt et al. 2017). Pravastatin-behandelte Tiere zeigten im Gegensatz zu Simvastatin-behandelten Tieren in Blutgasanalysen post reanimationem eine verbesserte Oxygenierung, was vermuten lässt, dass die pulmonale Funktion durch die Applikation von Pravastatin, nicht jedoch durch Simvastatin besser erhalten werden konnte.

4.1. Differentielle Effekte von Prava- und Simvastatin auf das Lungenödem post reanimationem

In dieser Arbeit wurde einer möglichen günstigen Modulation der pulmonalen Funktion durch Pravastatin post reanimationem nachgegangen. Die Analyse von Lungenpräparaten reanimierter Mäuse und von Mäusen aus nicht reanimierten Kontrollgruppen hinsichtlich der Ausprägung histologischer Marker für ein pulmonales Ödem zeigte, dass Pravastatin im Gegensatz zu Simvastatin ein Lungenödem post reanimationem reduzieren kann. Dieses spiegelte sich bei den Tieren, die Pravastatin erhalten hatten, nach der Reanimation in einer signifikant geringeren Dicke der Alveolarsepten als Surrogatparameter des pulmonalen Ödems wider, und zwar im direkten Vergleich mit den Tieren, die während der Reanimation Simvastatin erhalten hatten.

In der Literatur finden sich Hinweise darauf, dass Statine in unterschiedlichem Ausmaß unter bestimmten Umständen einen Lungenschaden mildern können. Melo et al. untersuchten, in wieweit Atorvastatin, Pravastatin und Simvastatin das Auftreten eines LPS-induzierten akuten Lungenversagens unterschiedlich beeinflussen. Die Autoren zeigten, dass die Tiere, welche drei Tage vor der intraperitonealen LPS-Injektion Pravastatin verabreicht bekommen hatten, eine histologisch weniger geschädigte Lunge aufwiesen als jene aus den anderen

Untersuchungsgruppen. Des Weiteren wurde gezeigt, dass im Gegensatz zu Simvastatin sowohl Prava- als auch Atorvastatin zu einer verstärkten antiinflammatorischen bzw. antioxidativen Aktivität führten und darüber hinaus die Lungenfunktion verbesserten, jedoch hat auch Simvastatin zu einem weniger ausgeprägten Lungenschaden geführt (Melo et al. 2013).

Auch unsere Ergebnisse zeigen, dass die Qualität der Lungenarchitektur gemessen an der Dicke der alveolären Septen bei den Mäusen, die im Rahmen der Reanimation Pravastatin erhalten hatten, vergleichbar mit denen nicht reanimierter Tiere war. Die Mäuse, die während der Reanimation Simvastatin erhalten hatten, wiesen jedoch eine signifikant höhere Dicke der Alveolarsepten auf als nicht reanimierte Tiere der Kontrollgruppe. Die Ausprägung des pulmonalen Ödems fiel auch signifikant höher aus als bei den Tieren, die während der Reanimation Pravastatin erhalten hatten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass das pulmonale Ödem post reanimationem durch Pravastatin und Simvastatin entgegengesetzt beeinflusst wird. Signifikante Unterschiede bezüglich der Leukozyteninfiltration, eines weiteren histologischen Markers für ein Lungenödem, wurden hingegen nicht beobachtet.

Eine mögliche Erklärung für partiell gegensätzliche Ergebnisse aus dieser Arbeit und aus der Studie von Melo et al. könnte der Unterschied in den Studienprotokollen liefern. Die Tiere aus unserer Arbeitsgruppe erhielten das Statin initial während der Reanimation, den Tieren aus der Arbeitsgruppe um Melo et al. wurden jedoch schon an den drei Tagen vor der ALI-Induktion Statine verabreicht. Die Medikamente unmittelbar bei Reanimation beziehungsweise regelmäßig post reanimationem zu verabreichen erscheint jedoch vor dem Hintergrund, dass es sich nicht um eine präventive, sondern eine notfallmedizinische Maßnahme handelt, indiziert. Darüber hinaus bestehen deutliche Unterschiede in der Dosierung der Statine: eine übliche Dosierung von Pravastatin für einen durchschnittlichen 70 kg wiegenden Patienten liegt zwischen 10-40 mg (Herold 2014). Unsere Arbeitsgruppe hatte mit 0,5 mg/kg Körpergewicht eine klinisch relevante Dosierung gewählt, wohingegen Melo et al. mit 5 mg/kg Körpergewicht Pravastatin eine zehnmal höheren Dosierung gewählt hatten (Bergt et al. 2017; Melo et al. 2013).

Nach der Applikation von Simvastatin im Zuge der Reanimation ließ sich in dieser Arbeit ein signifikant ausgeprägteres Lungenödem aufweisen. Diese Ergebnisse

stehen im Widerspruch zu jenen von Melo et al., die Simvastatin einen positiven Effekt bescheinigen, wenn auch einen geringeren als Pravastatin. Im Vergleich zeigt sich, dass Melo et al. auch für Simvastatin mit 20 mg/kg Körpergewicht eine supraphysiologische Konzentration wählten, wohingegen unsere Arbeitsgruppe Simvastatin ebenfalls in klinisch relevanter Dosierung von 0,5 mg/kg Körpergewicht appliziert hatte.

In einer Zusammenschau der publizierten Literatur stellt sich die Studienlage bezüglich der Wirkung Simvastatins auf zellulärer Ebene als heterogen dar. Kaufmann und Kollegen haben 2006 gezeigt, dass sich lipophile Statine, wie z.B. Simvastatin, auf die mitochondriale Funktion von Skelettmuskelzellen negativ auswirken und sogar Apoptose verursachen (Kaufmann et al. 2006). Gefäßtoxische Effekte lipophiler Statine sind ebenfalls bekannt (Katsiki et al. 2010). Es kann angenommen werden, dass lipophile Statine, welche im Gegensatz zu hydrophilen Statinen frei über die Zellmembran diffundieren können, zu einer ausgeprägteren Interferenz mit dem Mevalonatweg durch Inhibition der HMG-CoA-Reduktase führen. Dies könnte zu einer ausgeprägten Depletion von Mevalonatweg-Metaboliten führen, welche jedoch auch wichtige Substrate für zelluläre Funktionen darstellen (z.B. in Form des Coenzym Q10). In einigen Arbeiten ist bereits von differentiellen Effekten hydrophiler im Vergleich zu lipophilen Statinen berichtet worden, wobei die lipophilen Statine zelluläre Funktionen ungünstig beeinflussten (Kain et al. 2015; Urbano et al. 2017).

Diese Theorie ist auch von möglichem Interesse bezüglich der differentiellen Effekte von Simvastatin und Pravastatin auf das neurologische Outcome post reanimationem. Sollte es zu einer ausgeprägten Depletion von Cholesterin aufgrund der Mevalonatweginhibition durch lipophile Statine kommen, so könnte dies vor allem für neuronale Zellen eine besondere Bedeutung haben, die besonders cholesterinreich sind (Day et al. 1997). Vereinzelt identifizieren eine ungünstige Modulation lipophiler Statine auf die kognitive Funktion und warnen sogar vor der Anwendung von lipophilen Statinen bei Patienten mit Demenz (Muldoon et al. 2004; Wagstaff et al. 2003). Die Identifikation der genauen molekularen und zellulären Mechanismen einer differentiellen Wirkung von lipophilen vs. hydrophilen Statinen könnte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen werden.

4.2. Statine entfalten ihre protektive Wirkung peri reanimationem nicht am Endothel

Die Auslösung eines pulmonalen Ödems wird im Wesentlichen durch einen Verlust der endothelialen Integrität verursacht (Patterson und Lum 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Wirkung von Pravastatin und Simvastatin auf die Endothelfunktion verglichen. Endothelzellen bilden auf einem Extrazellulärmatrixäquivalent einen konfluenten Monolayer. Wird dieser verletzt, haben Endothelzellen die Eigenschaft, den Defekt durch Migration unverzüglich zu schließen. Des Weiteren bilden Endothelzellen auf Extrazellulärmatrixäquivalenten kapillarähnliche Strukturen aus. In der vorliegenden Arbeit wurde in Analogie zu diesen Endothelzellfunktionen ein Matrigel-Angiogenese-Assay zur Evaluation der Endothelfunktion angewendet.

Unsere Untersuchungen zum Einfluss von murinem Plasma auf die Endothelzellfunktion im Matrigel-Angiogenese-Assay bei Verwendung von Mäuseplasma acht Stunden post reanimationem bzw. von Mäuseplasma ohne vorausgegangenem Herz-Kreislaufstillstand zeigten jedoch, dass unter diesen Konditionen die *in-vitro*-Angiogenese nicht durch die Zugehörigkeit zu einer bestimmten Untersuchungsgruppe bestimmt wird.

Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass nach acht Stunden keine wirksame Statindosis mehr im Plasma vorhanden ist. Möglich erscheint auch, dass nach Reanimation zu viele zytotoxische Substanzen im Blut zirkulieren. Diese Hypothese wird durch andere Untersuchungen gestützt, in welchen z.B. ein vermehrtes Anfallen von reaktiven Sauerstoffspezies im Plasma nach Reanimation nachgewiesen werden konnte (Huet et al. 2011).

4.3. Pravastatin wirkt proangiogen auf pulmonale Endothelzellen

Um die Effekte von Pravastatin auf die Endothelfunktion direkt zu untersuchen, applizierten wir Pravastatin in aufsteigender Konzentration im Migrations- und Matrigel-Angiogenese-Assay und deckten dabei sowohl sub- als auch supraphysiologische Konzentrationen ab. Wir konnten zeigen, dass Pravastatin eine Zunahme der kumulativen Kapillarlänge im Matrigel Angiogenese-Assay bewirkt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Pravastatin die Migration von humanen pulmonalen mikrovaskulären Endothelzellen *in vitro* beschleunigt.

Statine vermitteln zahlreiche, Cholesterin-unabhängige Effekte, welche günstig auf das Endothel wirken. So ist z.B. beschrieben, dass sie anti-inflammatorisch und antioxidativ wirken (Liao und Laufs 2005). Vor allem anti-inflammatorische Effekte sind von besonderer Bedeutung im Hinblick auf die pleiotropen, protektiven Effekte der Statine auf das Endothel. In diesem Sinne wurde insbesondere von einer Inhibition inflammatorischer Mediatoren wie Rho-Kinasen und der Cyclooxygenase-2 (COX-2) berichtet (Massaro et al 2010). Dies konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden indem gezeigt wurde, dass eine Co-Inkubation von Pravastatin mit dem COX-2- Inhibitor Valdecoxib im Matrigel-Angiogenese-Assay zur Abnahme der Pravastatin-vermittelten proangiogenen Effekte führte. Pravastatin führte jedoch nicht zu einer Modulation der COX-2-Expression. Darüber hinaus ließen sich Vermittler der Pravastatin-induzierten Signaltransduktion aufzeigen. Im Angiogenese-Assay zeigte sich, dass eine AKT-Inhibition die Pravastatin-induzierte Angiogenese abschwächte. Derselbe Effekt stellte sich bei einer ERK-Inhibition dar. Aus diesen Ergebnissen lässt sich herleiten, dass Pravastatin proangiogene Eigenschaften besitzt, die wahrscheinlich sowohl AKT- als auch ERK-vermittelt sind.

Andere Studien zeigten jedoch auch antiangiogene Effekte von Pravastatin auf die Endothelfunktion, verwendeten aber meistens deutlich höhere Dosierungen von Pravastatin (z.B. 500 μM , was dem ca. Vierfachen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Höchstkonzentration von 112 μM entspricht) (Asakage et al. 2004). Nakao et al. stellten fest, dass die Applikation von 1 μM Pravastatin in einem Beobachtungszeitraum von drei respektive zwei Tagen bei Endothelzellen zu einer gesteigerten Proliferation und Migration führte, welche bei höheren Konzentrationen von 10 bzw. 100 μM nicht mehr nachweisbar war. Die Dosisabhängigkeit der Statineffekte ist Gegenstand intensiver Diskussionen, da in einer Vielzahl von Studien Statine in Dosierungen *in vitro* appliziert wurden, die entsprechend ihrer Pharmakokinetik bei Patienten nicht relevant sind. Jedoch beruht die Annahme der ubiquitär günstigen, pleiotropen Effekte der Statine größtenteils auf diesen Studien und benötigt ggf. eine intensive Re-Evaluation mit dem Anspruch auf eine translationale Relevanz für die klinische Statin-Applikation (Björkhem-Bergman et al. 2011).

4.4. Simvastatin wirkt angiostatisch und zytotoxisch auf pulmonale Endothelzellen

Der Einfluss Simvastatins auf die Angiogenese von Endothelzellen wurde bereits mehrfach untersucht. Thirunavukkarasu et al. publizierten 2013 eine Arbeit, in der sie unter anderem den Einfluss Simvastatins auf Endothelzellen untersuchten. Hierbei kamen sie zu dem Schluss, dass 1 μM Simvastatin die Migration von Endothelzellen *in vitro* fördert und sogar die antiangiogenen Effekte hoher Glukosekonzentrationen (30 mM) im Matrigel Angiogenese-Assay antagonisieren kann (Thirunavukkarasu et al. 2013). In anderen Arbeiten war eine vergleichbare Konzentration von 1 μM Simvastatin in der Lage, TNF α -induzierte Angiogenese *in vitro* zu unterdrücken bzw. abzuschwächen sowie generell antiinflammatorisch zu wirken (Zhu et al. 2007). Auch wurde eine Modulation der COX-2-Expression durch Simvastatin beschrieben: Massaro et al. untersuchten 2010 den Einfluss Simva- und Atorvastatins auf die Angiogenese und die TNF α -induzierte COX-2-Expression und konnten zeigen, dass Simvastatin sowohl die COX-2-Expression als auch die Angiogenese *in vitro* hemmt, zytotoxische Effekte Simvastatins wurden nicht verzeichnet (Massaro et al 2010).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Potenz Simvastatins, die endotheliale Kapillarbildung zu beeinflussen, untersucht. Simvastatin wurde in aufsteigender Konzentration mit einer Maximaldosis von 119 μM eingesetzt. Hierbei zeigte sich deutlich, dass mit zunehmender Simvastatinkonzentration die Endothelfunktion stark reduziert wurde. Diese Ergebnisse wurden im Migrations-Assay bestätigt. Es zeigte sich außerdem, dass Simvastatin *in vitro* einen nekrotischen Untergang von Endothelzellen verursachte, was sich in erhöhten Anteilen Propidiumiodid- und Annexin-V-positiver Zellen widerspiegelte. Es konnte gezeigt werden, dass Simvastatin im Gegensatz zu Pravastatin zu einer starken Erhöhung der endothelialen COX-2 führte. Aus einer selektiven COX-2-Blockade resultierte jedoch keine Aufhebung der durch Simvastatin vermittelten antiangiogenen Effekte, was ein multifaktorielles Geschehen der Simvastatin-induzierten zytotoxischen Effekte vermuten lässt.

Die abnehmende Angiogeneseaktivität scheint im Widerspruch zu den Beobachtungen Thirunavukkarasus zu stehen, allerdings ist ein Vergleich der Resultate vor dem Hintergrund, dass Thirunavukkarasus Ergebnisse im Angiogenese-Assay keine reine Simvastatingruppe ohne Glukosebehandlung

beinhalten, problematisch. Auch in der Methodik unterscheiden sich Thirunavukkarasus Angiogenese-Assays von denen dieser Arbeit: der Beobachtungszeitraum betrug in beiden Studien 8 Stunden, die Endothelzellen wurden in den Versuchen dieser Arbeit allerdings während des Matrigel-Angiogenese-Assays mit Simvastatin inkubiert, Thirunavukkarasu entschied sich dagegen für eine Präinkubation der Zellen mit Simvastatin und Glukose über 48 Stunden, bevor die Endothelzellen auf Matrigel ausgesät wurden. Eine Inkubation der Endothelzellen während des Angiogenese-Assays erscheint jedoch vor dem Hintergrund, dass angiogene Teilschritte wie die Proliferation etc. *in vivo* in Gegenwart von Blut und seinen Bestandteilen wie auch etwaigen Pharmaka stattfinden, plausibel.

Massaro et al. zeigten, dass Simvastatin nicht zytotoxisch wirkt und in der Lage ist, die TNF α -induzierte COX-2-Expression abzuschwächen. Selbiges gelte auch für die Angiogenese, was in Einklang mit den Ergebnissen Zhus steht. Zhu verweist hierbei auf das antiinflammatorische Potential Simvastatins. Auch in dieser Arbeit konnte eine Abnahme der Angiogeneseaktivität in Gegenwart von Simvastatin beobachtet werden, das ist vereinbar mit den Beobachtungen Zhus und Massaros. Ein wesentlicher Unterschied zwischen unseren Ergebnissen und denen Massaros besteht jedoch darin, dass in der hier verwendeten Zellpopulation hohe Anteile nekrotischer Zellen nachgewiesen werden konnten. Oliveira et al. konnten zeigen, dass Simvastatin dosisabhängig bei Prostatakrebszellen zu Nekrose führt, wobei die Medikamentenkonzentration mit maximal 100 μ M ähnlich wie in der vorliegenden Studie gewählt wurde (Oliveira et al. 2008). Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanzen zwischen Massaros Resultaten und denen dieser Arbeit könnte demnach sein, dass in dieser Arbeit 25 bzw. 50 μ g/ml Simvastatin verwendet wurden, was 59 beziehungsweise 119 μ M entspricht. Massaro hingegen entschied sich für maximal 10 μ M - ob es bei dieser Konzentration bereits zu nekrotischen Veränderungen kommt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht und kann daher auch nicht beurteilt werden. Zumindest bei Prostatakarzinomzellen scheint es laut Oliveira unter der Einwirkung von 10 μ M Simvastatin zur Apoptose, nicht aber zur Nekrose zu kommen.

Die Tatsache, dass 59 μ M Simvastatin in dieser Arbeit im Western Blot zu einem hohen COX-2-Niveau führten, scheint zunächst ebenfalls im Widerspruch zu den Aussagen Massaros und Zhus zu stehen, spricht sie doch für eine ausgeprägte

inflammatorische Komponente. Auch hier muss jedoch wieder bedacht werden, dass Massaro eine maximale Simvastatinkonzentration von 10 μM gewählt hat, Zhu gar nur von 1 μM . Eine Erklärung wäre möglicherweise, dass Simvastatin in geringen Dosen ein antiinflammatorisches, in hohen jedoch proinflammatorisches Potential besitzt. Das stünde auch im Einklang mit der Theorie der biphasisch vermittelten Statineffekte (Li und Losordo 2007). Eine Klärung der dosisabhängigen Effekte von Simvastatin sowie deren Relevanz für die klinische Situation muss in zukünftigen Studien erfolgen.

5. Zusammenfassung

Der plötzliche Herztod weist in Deutschland eine Inzidenz von ca. 123/ 100 000 auf, was ca. 100 000 Patienten pro Jahr entspricht. Die wenigen Patienten, die einen Herzstillstand überleben, haben häufig trotz intensiver medizinischer Behandlung unter ausgeprägten Folgeerscheinungen insbesondere neurologischer Genese zu leiden. Dringend benötigte erfolgreiche Therapiestrategien fehlen bislang. In einem murinen Reanimationsmodell konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass Mäuse post reanimationem eine weitaus bessere Prognose aufwiesen, wenn sie im Rahmen der Reanimation eine intravenöse Therapie mit Pravastatin erhielten. Gegenätzlich verhielt sich dies nach Simvastatinapplikation. Dass Statine über die Senkung des Cholesterinspiegels hinaus positive Eigenschaften besitzen, so genannte pleiotrope Effekte, ist bereits seit längerem bekannt. Ein Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, worauf die gegensätzliche Wirkung von Prava- und Simvastatin peri reanimationem beruht.

Es konnte gezeigt werden, dass Mäuse post reanimationem ein geringer ausgeprägtes Lungenödem aufwiesen, wenn ihnen im Rahmen der kardiopulmonalen Reanimation intravenös Pravastatin appliziert wurde. Dies spiegelte sich in einer weniger ausgeprägten Verdickung der Alveolarsepten in den histologischen Lungenpräparaten wider. Tiere, die mit Simvastatin behandelt wurden, boten ein signifikant ausgeprägteres pulmonales Ödem.

Bei der Untersuchung der Reinsubstanz ergaben sich proangiogene Effekte Pravastatins sowohl im Matrigel-Angiogenese- wie auch im Migrations-Assay als Ausdruck einer gesteigerten Endothelzellfunktion. Simvastatin zeigte sowohl im Migrations- als auch im Matrigel-Assay konzentrationsabhängig stark antiangiogene Eigenschaften, in der durchflusszytometrischen Analyse konnte eine erhöhte Anzahl avitaler Endothelzellen nachgewiesen werden.

In der Literatur finden sich mehrere Studien, die sich mit dem Einfluss von Statinen auf die COX-2 befassen. Auch in dieser Arbeit wurde die endotheliale COX-2-Expression unter Einfluss von Simva- und Pravastatin untersucht. Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass Simvastatin zu einer massiven Erhöhung des COX-2-Protein-Levels führt, Pravastatin hingegen nicht. Bei der funktionellen COX-2-Blockade mit Valdecoxib im Matrigel-Angiogenese-Assay zeigte sich unter Co-Inkubation mit Simvastatin keine Aufhebung der antiangiogenen Effekte, bei Co-

Inkubation mit Pravastatin wurden proangiogene Effekte aufgehoben. Auch konnte gezeigt werden, dass die proangiogenen Effekte Pravastatins durch AKT und ERK-vermittelte Signaltransduktion bedingt sind. Die hohen Protein-Levels der endothelialen COX-2 unter der Einwirkung von Simvastatin könnten als Ausdruck einer starken inflammatorischen Komponente interpretiert werden, was auch mit der erhöhten Apoptose bzw. Nekrose in der durchflusszytometrischen Analyse in Zusammenhang stehen könnte.

Diese Arbeit verdeutlicht einerseits die Notwendigkeit weiterer intensiver Forschungsbemühungen, um die immer noch schlechte Prognose von Patienten mit einem Herz-Kreislaufstillstand zu verbessern. Andererseits unterstreicht sie das Potential Pravastatins hinsichtlich seiner Wirkung jenseits der Cholesterinsenkung als möglicher Teil zukünftiger Therapiestrategien, beispielsweise im Rahmen der kardiopulmonalen Reanimation. Darüber hinaus zeigt sie die differentielle Wirkweise verschiedener Statine. In weiteren Untersuchungen muss der Frage nachgegangen werden, inwiefern die ungünstigen Effekte Simvastatins auf dessen chemische Eigenschaften der Lipophilität zurückzuführen sind und damit auch für andere lipophile Statine gelten könnten.

6. Literaturverzeichnis

- Acquavella, N.; Quiroga, M. F.; Wittig, O.; Cardier, J. E. (2010): Effect of simvastatin on endothelial cell apoptosis mediated by Fas and TNF-alpha. In: *Cytokine* 49 (1), S. 45–50
- Adams, J. A. (2006): Endothelium and cardiopulmonary resuscitation. In: *Critical Care Medicine* 34 (Suppl), S. S458–S465
- Aird, W. C. (2003): The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. In: *Blood* 101 (10), S. 3765–3777
- Aird, W. C. (2004): Endothelium as an organ system. In: *Crit. Care Med.* 32 (5 Suppl), S. S271-279
- Aktories, K. (2006): Repetitorium Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Mit 68 Tabellen. 1. Aufl. München [u.a.]: Elsevier, Urban & Fischer
- Antonopoulos, A. S.; Margaritis, M.; Shirodaria, C.; Antoniades, C. (2012): Translating the effects of statins: From redox regulation to suppression of vascular wall inflammation. In: *Thromb Haemost* 108 (5), S. 840–848
- Asakage, M. Tsuno, N. H.; Kitayama, J.; Kawai, K.; Okaji, Y.; Yazawa, K. et al. (2004): 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitor (pravastatin) inhibits endothelial cell proliferation dependent on G1 cell cycle arrest. In: *Anticancer Drugs* 15 (6), S. 625–632
- Backer, D.; Orbegozo C. D.; Donadello, K.; Vincent, J. (2013): Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. In: *Virulence* 5 (1), S. 73–79
- Baldwin, C.; Carette, S.; Pagnoux, C. (2015): Linking classification and therapeutic management of vasculitides. In: *Arthritis Res Ther* 17 (1), S. 187
- Bergt, S. et al (2012): Pravastatin verbessert die Überlebensrate und die funktionell-neurologische Regeneration von Mäusen nach Herz-Kreislaufstillstand und Reanimation. In: *Anästhesiologie & Intensivmedizin* 2012
- Bergt, Stefan; Grub, Andrea; Wagner, Steffen; Engelke, Hauke; Nöldge-Schomburg, Gabriele; Vollmar, Brigitte et al. (2017): Pravastatin but not Simvastatin improves survival and neurofunctional outcome after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation. In: *JACC: Basic to Translational Science* 2 (2), S. 149–159

- Björkhem-Bergman, Linda; Lindh, Jonatan D.; Bergman, Peter (2011): What is a relevant statin concentration in cell experiments claiming pleiotropic effects? In: *British Journal of Clinical Pharmacology* 72 (1), S. 164–165
- Blum, A.; Shamburek, R. (2009): The pleiotropic effects of statins on endothelial function, vascular inflammation, immunomodulation and thrombogenesis. In: *Atherosclerosis* 203 (2), S. 325–330
- Carden, D. L.; Granger, D. Neil (2000): Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. In: *J. Pathol.* 190 (3), S. 255–266
- Carmeliet, P. (2000): Mechanism of angiogenesis and arteriogenesis. In: *nature medicine*, S. 389–395
- Carmeliet, Peter; Jain, Rakesh K. (2011): Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. In: *Nature* 473 (7347), S. 298–307
- Chen, J.-C.; Huang, K.-C.; Wingerd, B.; Wu, W.-T.; Lin, W.-W. (2004): HMG-CoA reductase inhibitors induce COX-2 gene expression in murine macrophages: role of MAPK cascades and promoter elements for CREB and C/EBP β . In: *Experimental Cell Research* 301 (2), S. 305–319
- Cooke, J. P. (2000): The endothelium: a new target for therapy. In: *Vascular Medicine* 5 (1), S. 49–53
- Davignon, J.; Ganz, P. (2004): Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. In: *Circulation* 109 (23_suppl_1), S. III-27-III-32
- Day, A. P.; Bellavia, S.; Jones, O. T. G.; Stansbie, D. (1997): Effect of Simvastatin therapy on cell membrane cholesterol content and membrane function as assessed by polymorphonuclear cell NADPH oxidase activity. In: *Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry and laboratory medicine* 34 (3), S. 269–275
- Dayeh, Nour R.; Ledoux, Jonathan; Dupuis, Jocelyn (2016): Lung capillary stress failure and arteriolar remodelling in pulmonary hypertension associated with left heart disease (Group 2 PH). In: *Progress in Cardiovascular Diseases* 59 (1), S. 11–21
- Dharmashankar, K.; Widlansky, M.E. (2010): Vascular endothelial function and hypertension: insights and directions. In: *Curr Hypertens Rep* 12 (6), S. 448–455

- Fink, K.; Schwarz, M.; Feldbrügge, L.; Sunkomat, J. N.; Schwab, T.; Bourgeois, N. et al. (2010): Severe endothelial injury and subsequent repair in patients after successful cardiopulmonary resuscitation. In: *Crit Care* 14 (3), S. R104
- Gill, S. E.; Rohan, M.; Mehta, S. (2015): Role of pulmonary microvascular endothelial cell apoptosis in murine sepsis-induced lung injury in vivo. In: *Respir Res* 16 (1), S. 1303
- Go, A. S.; Mozaffarian, D.; Roger, V. L.; Benjamin, E. J.; Berry, J. D.; Borden, W. B. et al. (2013): Heart disease and stroke statistics--2013 update: a report from the American Heart Association. In: *Circulation* 127 (1), S. e6–e245
- Gould, V. E.; Miller, J. (1975): Sclerosing alveolitis induced by cyclophosphamide. Ultrastructural observations on alveolar injury and repair. In: *The American Journal of Pathology* (December), S. 513–530
- Hagel, S.; Brunkhorst, F. (2011): Sepsis. In: *Intensivmed* 48 (1), S. 57–73
- Herold, G. (2014): Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges für die Ärztliche Prüfung ; mit ICD-10 Schlüssel im Text und Stichwortverzeichnis. Köln: Herold
- Huet, O.; Dupic, L.; Batteux, F.; Matar, C.; Conti, M.; Chereau, C. et al. (2011): Postresuscitation syndrome: Potential role of hydroxyl radical-induced endothelial cell damage*. In: *Critical Care Medicine* 39 (7), S. 1712–1720
- li, M.; Losordo, D. W. (2007): Statins and the endothelium. In: *Vascular Pharmacology* 46 (1), S. 1–9
- Kain, Vasundhara; Kapadia, Bandish; Misra, Parimal; Saxena, Uday (2015): Simvastatin may induce insulin resistance through a novel fatty acid mediated cholesterol independent mechanism. In: *Sci Rep* 5 (1), S. 936
- Katsiki, N.; Tziomalos, K.; Chatzizisis, Y.; Elisaf, M.; Hatzitolios, A. I. (2010): Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on vascular cell apoptosis: beneficial or detrimental? In: *Atherosclerosis* 211 (1), S. 9–14
- Kaufmann, P.; Török, M.; Zahno, A.; Waldhauser, K. M.; Brecht, K.; Krähenbühl, S. (2006): Toxicity of statins on rat skeletal muscle mitochondria. In: *Cell. Mol. Life Sci.* 63 (19-20), S. 2415–2425

- Kuwano, Takashi; Nakao, Shintaro; Yamamoto, Hidetaka; Tsuneyoshi, Masazumi; Yamamoto, Tomoya; Kuwano, Michihiko; Oono, Mayumi (2004): Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. In: *The FASEB Journal* 18 (2), S. 300–310
- Liao, J. K.; Laufs, U. (2005): Pleiotropic effects of statins. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, S. 89–118
- Liekens, Sandra; Clercq, Erik de; Neyts, Johan (2001): Angiogenesis: regulators and clinical applications. In: *Biochemical Pharmacology* 61 (3), S. 253–270
- Liu, Q.; Rehman, H.; Harley, R. A.; Lemasters, J. J.; Zhong, Z. (2012): small-for-size liver transplantation increases pulmonary injury in Rats: Prevention by NIM811. In: *HPB Surgery* 2012 (1), S. 1–13
- Lüllmann-Rauch, R. (2006): Taschenlehrbuch Histologie. 10 Tabellen. 2. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme
- Massaro, M.; Zampolli, A.; Scoditti, E.; Carluccio, M. A.; Storelli, C.; Distanti, A.; Caterina, R. de (2010): Statins inhibit cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human endothelial cells: anti-angiogenic actions possibly contributing to plaque stability. In: *Cardiovascular Research* 86 (2), S. 311–320
- Matute-Bello, Gustavo; Downey, Gregory; Moore, Bethany B.; Groshong, Steve D.; Matthay, Michael A.; Slutsky, Arthur S.; Kuebler, Wolfgang M. (2011): An official american thoracic society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. In: *Am J Respir Cell Mol Biol* 44 (5), S. 725–738
- Melo, A. C.; Valença, S. S.; Gitirana, L. B.; Santos, J. C.; Ribeiro, M. L.; Machado, M. N. et al. (2013): Redox markers and inflammation are differentially affected by atorvastatin, pravastatin or simvastatin administered before endotoxin-induced acute lung injury. In: *International Immunopharmacology* 17 (1), S. 57–64
- Mihos, C. G.; Salas, M. J.; Santana, O. (2010): The pleiotropic effects of the Hydroxy-Methyl-Glutaryl-CoA reductase inhibitors in cardiovascular disease. In: *Cardiology in Review* 18 (6), S. 298–304
- Muldoon, Matthew F.; Ryan, Christopher M.; Sereika, Susan M.; Flory, Janine D.; Manuck, Stephen B. (2004): Randomized trial of the effects of simvastatin on

cognitive functioning in hypercholesterolemic adults. In: *The American Journal of Medicine* 117 (11), S. 823–829

Nakao, T.; Shiota, M.; Tatemoto, Y.; Izumi, Y.; Iwao, H. (2007): Pravastatin induces rat aortic endothelial cell proliferation and migration via activation of PI3K/Akt/mTOR/p70 S6 kinase signaling. In: *J Pharmacol Sci* 105 (4), S. 334–341

Neukamm, J.; Gräsner, J.-T.; Schewe, J.-C.; Breil, M.; Bahr, J.; Heister, U. et al. (2011): The impact of response time reliability on CPR incidence and resuscitation success: a benchmark study from the German Resuscitation Registry. In: *Crit Care* 15 (6), S. R282

Neumar, R. W.; Nolan, J. P.; Adrie, C.; Aibiki, M.; Berg, R. A.; Bottiger, B. W. et al. (2008): Post-cardiac arrest syndrome: epidemiology, pathophysiology, treatment, and prognostication a consensus statement from the International Liaison Committee on Resuscitation (American Heart Association, Australian and New Zealand Council on Resuscitation, European Resuscitation Council, Heart and Stroke Foundation of Canada, InterAmerican Heart Foundation, Resuscitation Council of Asia, and the Resuscitation Council of Southern Africa); the American Heart Association Emergency Cardiovascular Care Committee; the Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; the Council on Cardiopulmonary, Perioperative, and Critical Care; the Council on Clinical Cardiology; and the Stroke Council. In: *Circulation* 118 (23), S. 2452–2483

Nichols, M.; Townsend, N.; Scarborough, P.; Rayner, M. (2014): Cardiovascular disease in Europe 2014: epidemiological update. In: *European Heart Journal* 35 (42), S. 2950–2959

Nolan, J. P.; Soar, J.; Perkins, G. D. (2012): Cardiopulmonary resuscitation. In: *BMJ* 345 (oct03 1), S. e6122

Oliveira, K. A. P.; Zecchin, K. G.; Alberici, L. C.; Castilho, R. F.; Vercesi, A. E. (2008): Simvastatin inducing PC3 prostate cancer cell necrosis mediated by calcineurin and mitochondrial dysfunction. In: *J Bioenerg Biomembr* 40 (4), S. 307–314

Patterson, Carolyn E.; Lum, Hazel (2009): update on pulmonary edema: the role and regulation of endothelial barrier function. In: *Endothelium* 8 (2), S. 75–105

Roewer, N.; Thiel, H. (2010): Taschenatlas der Anästhesie. 4. Aufl. Stuttgart [u.a.]: Thieme

Schmidt, R. F. (Hg.) (2007): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie ; mit 77 Tabellen ; [+ IMPP-Fragen Physiologie online]. 30. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch)

Shiota, M.; Hikita, Y.; Kawamoto, Y.; Kusakabe, H.; Tanaka, M.; Izumi, Y. et al. (2012): Pravastatin-induced proangiogenic effects depend upon extracellular FGF-2. In: *J. Cell. Mol. Med.* 16 (9), S. 2001–2009

Sigma-Aldrich: Safety Data Sheet Pravastatin

Sigma-Aldrich: Safety Data Sheet Simvastatin

Thirunavukkarasu, M.; Selvaraju, V.; Dunna, N. R.; Foye, J. L.C; Joshi, M.; Otani, H.; Maulik, N. (2013): Simvastatin treatment inhibits hypoxia inducible factor 1-alpha-(HIF-1alpha)-prolyl-4-hydroxylase 3 (PHD-3) and increases angiogenesis after myocardial infarction in streptozotocin-induced diabetic rat. In: *International Journal of Cardiology* 168 (3), S. 2474–2480

Urbano, Francesca; Bugliani, Marco; Filippello, Agnese; Scamporrino, Alessandra; Di Mauro, Stefania; Di Pino, Antonino et al. (2017): Atorvastatin but not pravastatin impairs mitochondrial function in human pancreatic islets and rat β -cells. direct effect of oxidative stress. In: *Sci Rep* 7 (1), S. 331

van Ierssel, S. H.; Jorens, P. G.; van Craenenbroeck, E. M.; Conraads, V. M. (2014): The endothelium, a protagonist in the pathophysiology of critical illness: focus on cellular markers. In: *BioMed Research International* 2014 (7), S. 1–10

Vivanco, I.; Sawyers, C. L. (2002): The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. In: *Nat. Rev. Cancer.* 2 (7), S. 489–501

Wagner, N.-M; Bierhansl, L.; Nöldge-Schomburg, G.; Vollmar, B.; Roesner, J. P. (2013): Toll-Like Receptor 2-blocking antibodies promote angiogenesis and induce ERK1/2 and AKT signaling via CXCR4 in endothelial cells. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33 (8), S. 1943–1951

Wagstaff, Leslie R.; Mitton, Melinda W.; Arvik, Beth McLendon; Doraiswamy, P. Murali (2003): Statin-associated memory loss: analysis of 60 case reports and review of the literature. In: *Pharmacotherapy* 23 (7), S. 871–880

- Wang, L.; Taneja, R.; Wang, W.; Yao, L.-J.; Veldhuizen, R. A. W.; Gill, S. E. et al. (2013): Human alveolar epithelial cells attenuate pulmonary microvascular endothelial cell permeability under septic conditions. In: *PLoS ONE* 8 (2), S. e55311
- Yedjou, C. G. (2013): Detection of apoptosis induced by new type gosling viral enteritis virus in vitro through fluorescein annexin V-FITC/PI double labeling. In: *PP* 04 (01), S. 93–99
- Zachary, I. (2003): VEGF signalling: integration and multi-tasking in endothelial cell biology. In: *Biochim. Soc. Trans.* 31 (6), S. 1171–1177
- Zhang, C. (2005): TNF- α contributes to endothelial dysfunction in ischemia/reperfusion injury. In: *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26 (3), S. 475–480
- Zhang, Z.; Zhang, M.; Li, Y.; Liu, S.; Ping, S.; Wang, J. et al. (2013): Simvastatin inhibits the additive activation of ERK1/2 and proliferation of rat vascular smooth muscle cells induced by combined mechanical stress and oxLDL through LOX-1 pathway. In: *Cellular Signalling* 25 (1), S. 332–340
- Zhu, X.-Y.; Daghini, E.; Chade, A. R.; Napoli, C.; Ritman, E. L.; Lerman, A.; Lerman, L. O. (2007): Simvastatin prevents coronary microvascular remodeling in renovascular hypertensive pigs. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 18 (4), S. 1209–1217

7. Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

ALI	= Acute Lung Injury
ARDS	= Acute Respiratory Distress Syndrome
BSA	= bovines Serumalbumin
Clino	= Clinoleic
COX-2	= Cyclooxygenase-2
CPR	= Cardiopulmonary Resuscitation
DMSO	= Dimethylsulfoxid
ERK	= extracellular signal-regulated kinase
FCS	= Fetal Calf Serum
FR	= FR180204
GAPDH	= Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HE	= Hämatoxylin-Eosin
HIF1 α	= hypoxieinduzierbarer Faktor 1 α
HMG-CoA	= 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HPMEC	= human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells
HRP	= horseradish peroxidase
HUVEC	= human umbilical vein endothelial cells
KHK	= koronare Herzkrankheit
LDL	= Low-Density-Lipoprotein
LPS	= Lipopolysaccharid
LY	= LY294002
NaCl	= Natriumchlorid
pAVK	= periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	= Phosphate Buffered Saline

PI3K	= Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase
Prava	= Pravastatin
SDS	= Sodium Dodecyl Sulfate
Simva	= Simvastatin
Std	= Stunde
T	= time
TNF α	= Tumornekrosefaktor- α
Valde	= Valdecoxib
VEGF	= Vascular Endothelial Growth Factor

7.2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln von Prava- und Simvastatin.....	6
Abbildung 2: Histologische Schnitte muriner Lungen.....	16
Abbildung 3: Zunahme der Dicke von Alveolarsepten post reanimationem	16
Abbildung 4: Relative alveoläre Leukozyteninfiltration nach Reanimation	17
Abbildung 5: In-vitro-Angiogenese nach acht Stunden bei steigender Konzentration von Pravastatin.....	18
Abbildung 6: In-vitro-Angiogenese nach acht Stunden bei steigender Konzentration von Simvastatin	20
Abbildung 7: Endothelzellmigration unter dem Einfluss von Simva- und Pravastatin nach acht Stunden	21
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Analyse von Endothelzellen bei Inkubation mit Pravastatin.....	22
Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse von Endothelzellen bei Inkubation mit Simvastatin	23
Abbildung 10: Einfluss von Statinen auf den endothelialen COX-2-Protein-Level	24
Abbildung 11: In-vitro-Angiogenese bei steigender Valdecoxibkonzentration	25
Abbildung 12: Co-Inkubation von Endothelzellen mit Valdecoxib und Statinen	26
Abbildung 13: Einfluss von ERK- und PI3K-Inhibition auf Pravastatin-vermittelte Angiogenese in vitro	28
Abbildung 14: In-vitro-Angiogenese nach Reanimation	29

7.3. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Differentielle Effekte von Prava- und Simvastatin auf das Lungenödem post reanimationem und die Endothelzellularfunktion“ selbständig angefertigt habe und dass mir darüber hinaus keine weitere Hilfe zuteilgeworden ist.

Ich versichere, dass ich bei der Anfertigung der Dissertation keine anderen als die in der Arbeit genannten Hilfsmittel benutzt habe.

Münster im Oktober 2018

Hauke Engelke

7.4. Danksagungen

Ich danke Frau **Prof. Dr. med. Gabriele Nöldge-Schomburg**, emeritierte Direktorin der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universität Rostock, sowie ihrem Nachfolger, Herrn **Prof. Dr. med. Daniel Reuter**, dass ich in ihrer Klinik meine Dissertation verfassen durfte.

Meinem Doktorvater, Herrn **Prof. Dr. med. Jan Patrick Roesner**, Chefarzt der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Klinikum Südstadt in Rostock, bin ich zu besonderem Dank verpflichtet. Für meine Promotion habe ich ein sehr spannendes Thema erhalten und jederzeit eine hervorragende Betreuung und Unterstützung erfahren, auch dann noch, als Professor Roesner nicht mehr Mitarbeiter der Universitätsklinik für Anästhesiologie u. Intensivtherapie war und seinen beruflichen Werdegang als Chefarzt der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Klinikum Südstadt in Rostock fortsetzte.

Diese Arbeit wäre nicht möglich gewesen ohne die intensive Unterstützung durch meine Betreuerin, Frau **Priv.-Doz. Dr. med. Nana-Maria Wagner**, die mit mir zusammen viele Stunden im Labor verbracht hat und für Fragen immer ein offenes Ohr hatte, unabhängig von Uhrzeit und Wochentag, und der mein größter Dank gilt. Mit konstruktiver Kritik und Anregungen gelang es ihr auch noch aus den USA, mich über die gesamte Zeit meiner Promotion zur Arbeit zu motivieren und durch ihre große Expertise in der Laborarbeit konnte ich viel lernen, wovon ich über die Dissertation hinaus profitieren werde. Inzwischen arbeitet Frau Dr. Wagner in der Klinik für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie der Westfälischen Wilhelmsuniversität Münster.

Dr. med. Stefan Bergt, damals Oberarzt der Intensivstation der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie der Universitätsmedizin Rostock und inzwischen Chefarzt der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin im MediClin Müritz-Klinikum, möchte ich für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien danken sowie für zahlreiche Ideen, die diese Arbeit inhaltlich sehr bereichert haben.

Frau **Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar**, Direktorin des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, danke ich dafür, dass ich meine Experimente in ihrem Institut durchführen konnte. Darüber hinaus bin ich dankbar für viele wertvolle Ratschläge und Anmerkungen, die diese Arbeit bereichert haben.

Als Student ist die Arbeit in einem wissenschaftlichen Labor ohne Hilfe unmöglich, deshalb will ich mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für experimentelle Chirurgie der Universität Rostock bedanken, insbesondere bei **Berit Blendow, Dorothea Franz, Eva Lorbeer-Rehfeld** und **Maren Nerowski**, ohne deren aktive Unterstützung diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Zuletzt möchte ich mich noch bei **meinen Freunden** und **meiner Familie**, insbesondere **meinen Eltern**, bedanken.

7.5. Thesen

1. Pravastatin vermindert die Ausprägung eines postreanimatorischen Lungenödems in einem murinen Reanimationsmodell.
2. Pravastatin fördert die Angiogenese humaner Endothelzellen *in vitro*.
3. Simvastatin induziert bei humanen Endothelzellen konzentrationsabhängig Nekrose und unterdrückt die Angiogenese *in vitro*.
4. Simvastatin induziert *in vitro* hohe endotheliale COX-2 Protein-Level als Ausdruck einer inflammatorischen Reaktion der humanen Endothelzellen.