

Aus der Medizinischen Klinik  
mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

**Beatmungsassoziierter Lungenschaden bei  
Pneumokokkenpneumonie –  
therapeutisches Potenzial von Adrenomedullin**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Daniel Will  
aus Ravensburg

Datum der Promotion: 16. Juni 2018

Für meine Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung/ Summary .....</b>	<b>5</b>
1.1 Zusammenfassung .....	5
1.2 Summary .....	7
<b>2 Einleitung.....</b>	<b>8</b>
2.1 Ventilator-Induced Lung Injury (VILI) .....	9
2.2 Pathophysiologie des Ventilator-Induced Lung Injury .....	9
2.2.1 Barotrauma .....	9
2.2.2 Biotrauma .....	10
2.3 Acute Respiratory Distress Syndrome .....	18
2.4 Ambulant erworbene Pneumonie .....	19
2.5 Pneumogene Sepsis mit septischem Organversagen .....	20
2.6 Adrenomedullin .....	22
<b>3 Herleitung der Aufgabenstellung.....</b>	<b>25</b>
<b>4 Materialien und Methoden.....</b>	<b>26</b>
4.1 Materialien .....	26
4.1.1 Geräte und Apparaturen .....	26
4.1.2 Chemikalien/ Reagenzien .....	27
4.1.3 Durchflusszytometrie .....	28
4.1.4 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (Real-Time-qPCR) .....	28
4.1.5 Precision Cut Lung Slices (PCLS) .....	28
4.1.6 ELISA.....	29
4.1.7 BIOPLEX .....	29
4.1.8 Histologie und Apoptose .....	29
4.1.9 Immunhistochemie.....	30
4.1.10 Verbrauchsmaterialien .....	30
4.1.11 Versuchstiere .....	31
4.2 Methoden .....	32
4.2.1 Infektion mit <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	32
4.2.2 Künstliche Beatmung und Behandlung mit Adrenomedullin .....	33
4.2.3 Einteilung in Versuchsgruppen .....	35
4.2.4 Bestimmung der alveolokapillären Permeabilität .....	35
4.2.5 Bestimmung von Leukozyten in Lungengewebe und Blut.....	36
4.2.6 Quantifizierung von Zytokinen in Lungengewebe und Blut .....	38

4.2.7	Bakterienlast .....	40
4.2.8	Untersuchung der pulmonalen Genexpression von AM und seinen Rezeptorkomponenten .....	40
4.2.9	Untersuchung der hypoxischem Vasokonstriktion in Precision cut lung slices .....	44
4.2.10	Immunhistochemische Darstellung der Expression von Adrenomedullin im Lungengewebe .....	46
4.2.11	Kreatinin, AST, ALT, NGAL .....	48
4.2.12	Histologie und Apoptose .....	48
4.2.13	Datenanalyse .....	49
<b>5</b>	<b>Ergebnisbeschreibung .....</b>	<b>50</b>
5.1	Pulmonale Expression von Adrenomedullin und seinen Rezeptorkomponenten unter maschineller Beatmung bei Pneumonie	50
5.2	Lungenschaden bei Pneumonie: Exazerbation durch Beatmung und Schutz durch Adrenomedullin	53
5.3	Beatmung erhöhte die Produktion von Entzündungsmediatoren bei Pneumonie	56
5.4	Beatmung hatte keinen Einfluss auf das pulmonale Bakterienwachstum und die Entwicklung einer Bakteriämie bei der Pneumonie	58
5.5	Beatmung aggravierte die systemische Entzündungsreaktion bei Pneumonie	59
5.6	Beatmung induzierte eine Leukopenie bei Pneumonie	60
5.7	Adrenomedullin schützte Mäuse mit Pneumonie vor der Entwicklung eines Beatmungs-induzierten Multiorganversagen	62
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>66</b>
	Ausblick	77
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>95</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis	95
8.2	Abbildungsverzeichnis	99
8.3	Tabellenverzeichnis	99
	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>100</b>
	<b>Anteilerklärung an erfolgten Publikationen .....</b>	<b>101</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>102</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>103</b>

# 1 Zusammenfassung/ Summary

## 1.1 Zusammenfassung

Die maschinelle Beatmung ist eine alternativlose Intervention bei respiratorischem Versagen, welches zu einem Großteil durch schwere Pneumonien verursacht wird. Bei der Beatmung von vorgeschädigten Lungen kommt es zu einer Aggravierung der Lungenschädigung („Second Hit“), dessen Mechanismen noch weitestgehend ungeklärt sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Modell der invasiven Beatmung bei Mäusen mit einer bestehenden Pneumokokkenpneumonie etabliert. Hierbei wurde insbesondere der Fokus auf *Ventilator-Induced Lung Injury* (VILI) und das daraus resultierende *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) mit Multiorganversagen (MOV) gelegt.

Ein weiteres Ziel war die Untersuchung der Wirksamkeit des Polypeptids Adrenomedullin (AM) als möglicher therapeutischer Ansatz in diesem Modell während der Beatmungsperiode. Der Fokus der Untersuchung lag dabei auf der pulmonalvaskulären Permeabilität, der pulmonalen und systemischen Entzündungsreaktion, sowie der Apoptoserate in peripheren Organen als Zeichen eines Multiorganversagens (MOV).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass sogar eine sogenannte „lungenprotektive“ Beatmung mit Begrenzung der Beatmungsdrücke und -volumina und positivem End-expiratorischem Druck (PEEP) den Lungenschaden bei Mäusen mit Pneumonie verschlechtert und die Progression der Pneumonie hin zu schwerem ARDS sowie zu Sepsis und MOV fördert. Es zeigten sich erhöhte Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen sowohl in der Lunge, als auch im Blut, eine erhöhte alveolokapilläre Permeabilität und ein reduzierter P/F-Quotient als Zeichen einer verminderten Sauerstoffaufnahmekapazität. Ferner wurde extrapulmonal ein erhöhtes Aufkommen von apoptotischen Zellen im Leber- und Ileumgewebe als Zeichen des MOV dokumentiert.

Exogen verabreichtes AM hatte eine Barriere-stabilisierende Wirkung und konnte die Lungencompliance verbessern. Außerdem zeigte sich unter AM-Behandlung eine

reduzierte Apoptoserate in Ileum und Leber. Folglich hatte die Therapie mit AM einen protektiven Effekt gegenüber der Entwicklung eines MOV.

Es ergaben sich hingegen keine Hinweise dafür, dass AM die Immunantwort des Wirtes beeinträchtigte. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützten die Empfehlung des Committee for Orphan Medicinal Products (COMP) der European Medicines Agency (EMA), die im Jahre 2011 die Zuerkennung des Status für AM als ein Orphan Medicinal Product zur Behandlung des ARDS (EMA/COMP/169921/2010) ausgesprochen hat.

AM ist ein vielversprechender Kandidat für eine adjuvante Therapie der schweren Pneumonie mit ARDS, Sepsis und extrapulmonaler Organschädigung durch Verringerung von Morbidität und Mortalität. Weitere Studien sind notwendig, um die genaueren Wirkweisen von AM und die Indikationen für einen therapeutischen Einsatz zu eruieren.

## 1.2 Summary

Mechanical ventilation is an essential intervention in case of respiratory failure which is often caused by severe pneumonia. Particularly pre-injured lungs are susceptible to ventilator-induced lung injury (VILI; “second hit”). However, the underlying mechanisms are still not fully understood. In this study, an experimental second-hit model of mechanical ventilation for six hours of mice with pneumococcal pneumonia was established. Analyses focused on ventilator-induced lung injury (VILI) and the resulting acute respiratory distress syndrome (ARDS) with multi organ deficiency syndrome (MODS).

A second goal was to investigate the therapeutic effect of adrenomedullin (AM) in this model. Analyses focused on lung permeability, pulmonary and systemic inflammation and extrapulmonary organ injury.

The results of this study showed that even lung-protective mechanical ventilation worsened lung injury in mice with pneumonia. Ventilation induced progression of pneumonia into ARDS with severe sepsis and MODS. This was demonstrated by increased lung permeability, pro-inflammatory cytokine levels, and a reduced P/F-ratio. Furthermore, mechanical ventilation increased the number of apoptotic cells in extrapulmonary tissue (liver, ileum).

Exogenous adrenomedullin was able to stabilize the endothelial barrier of the lung and thereby improve lung compliance. Additionally, AM reduced the number of apoptotic cells in extrapulmonary tissue. Thus, treatment with AM was protective against development of MODS.

There were no signs for an effect of AM on the host immune response. The current results gave rise to a positive opinion from the Committee for Orphan Medicinal Products of the European Medicines Agency (EMA) recommending the granting of the development of AM as an orphan drug for the treatment of ARDS in 2011.

AM could be a promising therapeutic agent for the treatment of severe pneumonia and ARDS, sepsis and MODS through reduction of morbidity and mortality. Further studies are necessary to evaluate the mechanisms of action of AM and its indication as a therapeutic agent.

## 2 Einleitung

Die maschinelle Beatmung ist eine lebensrettende, alternativlose Intervention bei respiratorischem Versagen, kann aber auch Lungenschaden auslösen bzw. aggravieren. Man spricht vom beatmungs-induzierten Lungenschaden (VILI – *Ventilator-Induced Lung Injury*). VILI trägt zur Mortalität bei akutem Lungenversagen bei (englisch = *acute respiratory distress syndrome*, ARDS) (1-3), und erhöht die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Multiorganversagens (MOV) bei Patienten mit ARDS (4, 5). Vor diesem Hintergrund wurden Strategien zur lungenprotektiven Beatmung entwickelt, um beatmungsassoziierte Lungenschädigung und deren systemische Folgen zu minimieren. Lungenprotektive Beatmung beinhaltet nach den Empfehlungen des ARDS Network eine Reduktion des applizierten Tidalvolumens auf 6 ml/kg Körpergewicht, den Einsatz eines positiven endexpiratorischen Drucks (PEEP), der sich an der notwendigen inspiratorischen Sauerstoffkonzentration bemisst, und den Einsatz inspiratorischer Plateaudrücke unterhalb von 30 cmH<sub>2</sub>O (1). Über die Empfehlungen hinaus sind aber die idealen Einstellungen des Beatmungsgerätes hinsichtlich des PEEP, des inspiratorischen Gasflusses, der Inspirationszeiten etc. noch nicht genau definiert und daher noch Gegenstand von Untersuchungen.

Lungenprotektive Beatmung ist bis heute die zentrale supportive Therapie beim ARDS. Allerdings ist auch unter lungenprotektiver Beatmung VILI nicht sicher zu vermeiden (6). Dies scheint insbesondere bei strukturell oder entzündlich „vorgeschädigtem“ Lungengewebe der Fall zu sein. So wurde beispielsweise beobachtet, dass im Kaninchenmodell säure-induzierter Lungenschaden durch Beatmung aggraviert wird (7).

Die physikalischen Kräfte, die durch die Beatmung auf das Lungengewebe wirken, werden in biologische Signale übersetzt, die u.a. zu Inflammation, pulmonalvaskulärer Schrankenstörung oder auch zu fibrotischem Umbau der Lunge führen. Daraus lässt sich ableiten, dass über die konsequente Anwendung lungenprotektiver Beatmung hinaus pharmakologische adjuvante Therapiestrategien, die beispielsweise die endotheliale Schrankenstörung reduzieren, VILI weiter minimieren und damit potentiell das Überleben von Patienten mit ARDS verbessern könnten.

Die Pneumonie ist die häufigste Ursache für ein akutes Lungenversagen (8) und verläuft in ihrer schweren Verlaufsform häufig als pneumogene Sepsis mit assoziiertem MOV. Der Einfluss von VILI auf die Progression der Pneumonie hin zum ARDS und MOV ist noch nicht hinreichend verstanden.

Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von VILI auf die Entstehung von pneumogener Sepsis und das damit assoziierte Organversagen, sowie der therapeutische Nutzen von Adrenomedullin als adjuvante pharmakologische Therapie bei VILI im Kontext von Pneumonie und Multiorganversagen untersucht.

## **2.1 Ventilator-Induced Lung Injury (VILI)**

Die Ursachen des Beatmungsschadens während der Überdruckbeatmung beruhen auf mehreren Mechanismen. Selten kommt es zu einer direkten mechanischen Schädigung des Gewebes gekennzeichnet durch Luft außerhalb der originär luftleitenden Strukturen, wie beim Pneumothorax – genannt Barotrauma (9, 10). Zentral ist der Pathomechanismus des sog. Biotraumas. Dahinter steht das Phänomen der Mechanotransduktion, wobei die Lunge die beatmungsvermittelte Dehnung u.a. in eine biologische Reaktion übersetzt und diese eine Schädigung der Lunge auslöst. Das Biotrauma ruft darüber hinaus auch eine systemische Reaktion hervor, die an der Entstehung eines Multiorganversagens beteiligt ist (4, 10-14).

Adjuvante Pharmakotherapien stellen somit eine rationale Perspektive dar, um VILI über lungenprotektive Beatmung hinaus therapeutisch zu begegnen.

Ein entscheidender Vorteil bei der Entwicklung pharmakologischer Therapiekonzepte bei VILI ist, dass der Zeitpunkt des Beatmungsbeginns als Beginn der Entwicklung von VILI sicher zu definieren ist und somit eine Therapie noch vor Etablierung des eigentlichen Schadens begonnen werden könnte.

## **2.2 Pathophysiologie des Ventilator-Induced Lung Injury**

### **2.2.1 Barotrauma**

Barotrauma ist definiert als eine Luftansammlung außerhalb der originären luftleitenden Atemwege, wie es beim Pneumothorax der Fall ist. Bestimmte Erkrankungen prädisponieren für ein Barotrauma. Hierzu zählen Erkrankungen des Lungengerüsts,

wie eine Pneumonie durch *Pneumocystis jirovecii* (PJP) (15), interstitielle Lungenerkrankungen (16) oder das ARDS (17, 18).

Schon vor der Reduktion der Tidalvolumina bei Beatmung von ARDS-Patienten, was zur Verbesserung des Überlebens geführt hat, stellte das Barotrauma eine seltene Komplikation dar (1). Für die Prognose der ARDS-Patienten ist das Barotrauma unter der heute gängigen Beatmung daher von untergeordneter Bedeutung.

## **2.2.2 Biotrauma**

Biotrauma fasst die durch die Beatmung ausgelösten und in ihrer Konsequenz potentiell schädigenden biologischen Reaktionen des Lungengewebes zusammen. Hierzu zählt beispielsweise eine Entzündungsreaktion oder eine direkt ausgelöste pulmonalvaskuläre Hyperpermeabilität. Zu den dadurch verursachten pathologischen Veränderungen des Lungengewebes gehören die Entwicklung eines Permeabilitätsödems (19, 20), Surfactantverlust und -deaktivierung, sowie Leukozyteninfiltration (insbesondere durch neutrophile Granulozyten) (21, 22). Diese zelluläre Infiltration ist mit einer Freisetzung proinflammatorischer Zytokine verbunden und verursacht letztendlich die Bildung von hyalinen Membranen in den Alveolen (22) und die Apoptose von Epithel- und Endothelzellen.

### **2.2.2.1 Mechanosensing und Mechanotransduktion**

Das Prinzip des Mechanosensing und der Mechanotransduktion steht am Anfang des Biotraumas. Es beschreibt die Umwandlung physikalischer Kräfte in biochemische Signale. Dazu zählt beispielsweise die Zelldeformation (21).

Zum Mechanosensing-Apparat gehören u.a. Integrine, fokale Adhäsionsplaques, das Zytoskelett (23) und mechanosensible Ionenkanäle in der Zellmembran (21, 24). Diese können zelluläre Deformation wahrnehmen (25). Integrine zählen zu den transmembranösen Rezeptoren. Sie stehen in enger Verbindung mit Proteinen, wie der fokalen Adhäsionskinase (FAK), Paxillin, Talin, Tensin, Src-Kinasen, Mikrofilamenten und Mikrotubuli (25), welche als Anpassungsmoleküle das Zytoskelett und die Mikrotubuli mit der Plasmamembran verankern. Bei veränderter Anordnung der Integrine, beispielsweise aufgrund von mechanischer Belastung, aktivieren diese FAK

und im Weiteren Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK). Diese wiederum aktiviert die Transkriptionsfaktoren c-fos und Heterodimere von NF- $\kappa$ B p65/p50. Diese binden an dehnungs-sensible Elemente an den Produktionsstätten der IL-8 mRNA in den Zellkernen, woraufhin die Produktion von IL-8 stimuliert wird (25). Mechanosensible Calciumkanäle können zusätzlich direkt mikrovaskuläre Permeabilität vermitteln (26).

Aus der dehnungsvermittelten Aktivierung der Zelle resultiert eine vermehrte Transkription von proinflammatorischen Genen und konsekutiv eine erhöhte Produktion von Zytokinen (25) und anderen pro- und antiinflammatorischen Molekülen (21). Zellen ordnen in Folge von Dehnung ihr Zytoskelett und die Struktur ihrer Plasmamembran um (21, 27), verändern die Expression ihrer Oberflächenrezeptoren (28) und modifizieren Wachstumsmuster und Lebensdauer (29). Darüber hinaus können Zellen Signale nach der Dehnung an umgebende Zellen durch interzelluläre Kanäle (*Gap Junctions*) weiterleiten (30, 31) und einen Umbau der extrazellulären Matrix triggern (30, 31).

#### **2.2.2.2 Zytokine**

Zytokine sind eine Gruppe von Peptiden, welche im Organismus als Mediatoren fungieren. Sie koordinieren damit u.a. die Immunantwort. Sie werden von myeloiden und lymphatischen Zellen des Immunsystems, aber auch von Endothelzellen, Epithelzellen oder Fibroblasten (21, 32) produziert. Mit hoher Affinität binden sie an Oberflächenrezeptoren, über die sie ihre Wirkung vermitteln. Einzelne Zytokine sind relevant für die Entwicklung von VILI.

In experimentellen VILI-Modellen (33-35) und bei Untersuchungen am Menschen (1, 4) konnte nach Beatmung ein Anstieg verschiedener Zytokine in Lunge und Blut nachgewiesen werden. Mehrere Versuche zeigten unter Beatmung erhöhte Spiegel von Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p40, KC (Keratinocyte-derived cytokine), Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1 $\alpha$ , MIP-2 und MCP-1 in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) (19, 36-39) und im Plasma (37, 38). Lungenprotektive Beatmung reduzierte die Freisetzung dieser potenziell schädigenden Mediatoren (4, 7, 14, 40).

Für einige Mediatoren konnte eine funktionelle Relevanz für die Entwicklung von VILI nachgewiesen werden. TNF- $\alpha$  Spiegel steigen beispielsweise unter maschineller Beatmung beim Menschen sowie im Tierversuch bei Mäusen und Ratten an (4, 33, 34,

41, 42). Durch Antagonisierung von TNF- $\alpha$  mit TNF- $\alpha$ -Antikörpern bei Kaninchen (41) und mit p55-spezifischen Antikörpern bei Mäusen (43) wird VILI reduziert. P55 ist ein Oberflächenrezeptor, über welchen TNF-Signale vermittelt werden. So zeigte sich bei Blockade der TNF- $\alpha$ -Rezeptoren eine Reduktion der Rekrutierung von PMN in die Lunge (35, 44), eine verminderte alveolokapilläre Permeabilität sowie ein geringerer Lungenschaden (43). Der Effekt, dass VILI zu erhöhter vaskulärer Permeabilität der Lunge und im Darm von beatmeten Ratten führte, konnte durch die Gabe von TNF- $\alpha$ -Antikörpern abgeschwächt werden (45).

Interleukin-1 $\beta$  hat bedeutende proinflammatorische Eigenschaften (46, 47). Dies ist auch bei VILI der Fall. IL-1 $\beta$  induziert die Expression von IL-8 und ICAM-1 via Aktivierung von NF-Kappa B. Somit wird die Rekrutierung der PMN aus dem Kreislauf in die Lunge aktiviert (48). Eine Blockade des IL-1-Rezeptors (IL-1R) durch einen IL-1-Rezeptorantagonisten (IL-1Ra) reduziert den pulmonalen Einstrom von Leukozyten und die Permeabilität der alveolokapillären Barriere (49).

IL-6 hat pro- und antiinflammatorische Eigenschaften, wobei seine genaue Rolle im VILI noch nicht abschließend geklärt ist (50, 51). Sowohl protektive Effekte bei VILI (52) als auch proinflammatorische Funktionen (53) wurden beschrieben. Meduri et al. zeigten, dass erhöhte Spiegel von IL-6 mit niedrigerer Überlebensrate beim ARDS assoziiert sind (54). Zirkulierende Spiegel an IL-6 korrelieren sowohl mit dem Schweregrad des ARDS als auch mit der Mortalität im septischen Schock (55, 56).

IL-10 wird eine potenziell protektive Rolle während des ARDS zugeschrieben (25, 47). Es inhibiert die Zytokin-Produktion von Makrophagen. Eine intratracheale Gabe von IL-10 konnte im VILI-Modell bei Ratten einen beatmungsinduzierten Anstieg von MIP-2 und IL-1 $\beta$  in BALF und Plasma reduzieren und die Überlebensrate verbessern (57). Erhöhte Konzentrationen von IL-10 beim Menschen korrelierten außerdem mit erhöhter Überlebensrate beim ARDS (58).

KC ist ein Zytokin, das in der Maus die Funktion des beim Menschen vorhandenen IL-8 übernimmt. Die Gabe von KC-neutralisierenden Antikörpern bei Mäusen verhinderte einen Anstieg des KC. Dadurch war die PMN-Infiltration und die Bildung von Ödemen in Lunge und Leber mit hämorrhagischen Schock vermindert (59).

Auch im VILI resultiert die Antagonisierung von Macrophage inflammatory protein 2 (MIP-2/ CXCL2/3) (39, 60) und Keratinozyten-abgeleitetes Zytokin (KC/ CXCL1), via CXCR2 (61) in einer reduzierten pulmonalen Neutrophilenrekrutierung und führt letztendlich zu weniger ausgeprägtem VILI (60).

### 2.2.2.3 Leukozyten

Chemotaktische Zytokine vermitteln bei VILI eine Infiltration der Lunge durch Leukozyten. Leukozyten selbst scheinen für einen Teil der Schädigung des Lungengewebes verantwortlich zu sein (20, 62, 63). Eine Depletion der Makrophagen mit liposomalem Clodronat im Rattenmodell verringerte die beatmungsinduzierte Erhöhung der Permeabilität und Entwicklung eines Lungenödems (64). Das genaue Zeitprofil der Leukozytenrekrutierung und -aktivierung ist jedoch weitgehend unbekannt. In der initialen Phase von VILI werden vorwiegend alveoläre Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen aktiviert (65, 66). Makrophagen können dann die weitere Entzündung über eine initiale Ausschüttung von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  orchestrieren und PMN aktivieren. PMN werden zwar auch in der frühen Phase der Entzündungsreaktion rekrutiert (67), sind aber zu großen Teilen abhängig von der Aktivierung residenter Alveolarmakrophagen. Die späte Phase des VILI ist durch die Migration der PMN sowohl in den Alveolarraum (68) als auch in das Lungengewebe (19, 37, 38, 60, 67, 69, 70) charakterisiert. Die im Vergleich zu den Plasmazellen und den Erythrozyten verzögerte Migration der PMN wird der Tatsache zugeschrieben, dass sich die PMN einer Deformierung unterziehen müssen, um normale pulmonale Kapillaren passieren zu können (71). Die Rekrutierung aus den Blutgefäßen wird durch Zytokine und Chemokine, wie MIP-2 (CXCL2/3) (60), KC (CXCL1), via CXCR2 (61) und TNF- $\alpha$  vermittelt. Eine Rekrutierung findet über vier Stufen statt (initialer Kontakt, *Rolling*, *Firm Adhesion* und Transmigration).

In der Lunge wird die Migration der PMN durch CD11/CD18-abhängige und CD11/CD18-unabhängige Wege charakterisiert (71, 72). Der CD11/CD18-abhängige Weg scheint über NF-Kappa B eine Produktion von inflammatorischen Zytokinen (einschließlich TNF- $\alpha$ ) und ICAM-1 durch Endothelzellen der Lungenkapillaren zu induzieren. Der CD11/CD18-unabhängige Weg im Mausmodell ist typisch bei einer Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* und findet bei der akuten Inflammation insbesondere in der Lunge und im Peritoneum statt (72). Hierbei erfolgt die Transmigration ohne eine Beteiligung von ICAM-1 und möglicherweise in Abhängigkeit von Interferon- $\gamma$  (71).

Insbesondere den PMN und deren Produkten wird eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des ARDS zugeschrieben (69, 73-75). Durch die PMN werden unselektiv Proteasen und reaktive Sauerstoffspezies (Reactive oxygen species – ROS) sezerniert.

Die Freisetzung von ROS, wie beispielsweise  $H_2O_2$ , erfolgt nach Aktivierung bei Migration in den Lungenkreislauf. PMN vermitteln so direkt oder indirekt mikrovaskuläre Permeabilität (76). Dies scheint auch bei VILI relevant zu sein, da nach Depletion der PMN im Kaninchenmodell sich relevant weniger VILI in den Versuchstieren entwickelte (69, 77).

Auf ähnliche Weise wie die PMN werden die GR-1-positiven ( $GR-1^{high}$ ) Monozyten durch Beatmung in die Lunge rekrutiert und beteiligen sich an der Entstehung von VILI (38). Der überwiegende Teil der  $GR-1^{high}$  Monozyten bei Mäusen nach intratrachealer LPS-Applikation ist im Lungengefäßsystem zu finden (78). Beatmung selbst induziert einen Anstieg der Aktivität der GR-1-positiven Monozyten, welches an vermehrter CD11b- und verminderter L-Selektin-Expression an den Zelloberflächen erkennbar ist. Diese stellen zwei Adhäsionsmoleküle auf GR-1-positiven Monozyten dar. Durch eine Depletion der Monozyten mit liposomalem Clodronat im Mausmodell konnte ein LPS-induziertes Lungenödem nach 24h reduziert werden (79).

#### **2.2.2.4 Danger-associated Molecular Patterns (DAMPs)**

*Pathogen Recognition Receptors* (PRRs) stellen einen grundlegenden Teil der angeborenen Immunität dar und tragen wesentlich zu inflammatorischen Reaktionen bei, welche letztendlich zur erhöhten Permeabilität der Lunge führen (80). Zu den PRRs zählen u.a. Toll-like-Rezeptoren (TLR), NOD-like-Rezeptoren (NLR), RIG-I-like-Rezeptoren (RLR) und DNA-Sensoren. Auf der einen Seite erkennen PRRs hochkonservierte molekulare Strukturen von Bakterien oder Viren, durch welche Pneumonien verursacht werden. Bei Gewebeschädigung aktivieren durch verletzte Zellen sezernierte endogene DAMPs (Danger-associated Molecular Patterns) ebenfalls bestimmte PRRs. Zu den DAMPs zählen beispielsweise das High-mobility Group Box Protein 1 (HMGB1), welches TLR2 aktiviert und im Weiteren eine Aktivierung von NF-Kappa B initiiert. Die Konzentration von HMGB1 in der BALF zeigte sich um ein Vielfaches höher bei Beatmung mit hohen Tidalvolumina. Eine Blockade von HMGB1 führte zu einer verbesserten Oxygenierung und Reduktion von mikrovaskulärer Permeabilität und Neutrophilenrekrutierung in den Alveolarraum (81). Die Aktivierung der PRRs initiiert die Produktion von inflammatorischen Zytokinen, Interferon und Chemokinen und induziert so eine pulmonale Entzündungsreaktion.

### 2.2.2.5 Pulmonalvaskuläre Permeabilität

Pulmonalvaskuläre Permeabilität resultiert u.a. aus der Entzündungsreaktion der Lunge aufgrund von Zytokinausschüttung und Leukozyteninvasion. Permeabilität kann aber auch direkt durch mechano-sensible Calciumkanäle ohne eine vorab ausgelöste Entzündungsreaktion verursacht werden. Permeabilität führt letztendlich zur Bildung eines Lungenödems und vermittelt so die schwere im ARDS auftretende Oxygenierungsstörung.

Das Endothel reguliert den Flüssigkeitsaustausch und den Transport kleiner Moleküle durch trans- und parazelluläre Passage. Es stellt eine semipermeable Barriere dar, die Intravasalraum und Interstitium der Lunge trennt. Ultrastrukturelles Korrelat vaskulärer Permeabilität ist die Bildung von Poren zwischen den Endothelzellen. Diese Porenbildung ist ein aktiver Prozess, der feinen Regulationsmechanismen zwischen Kontraktionskräften der Zelle und Adhäsionskräften im Zellverband unterliegt (82).

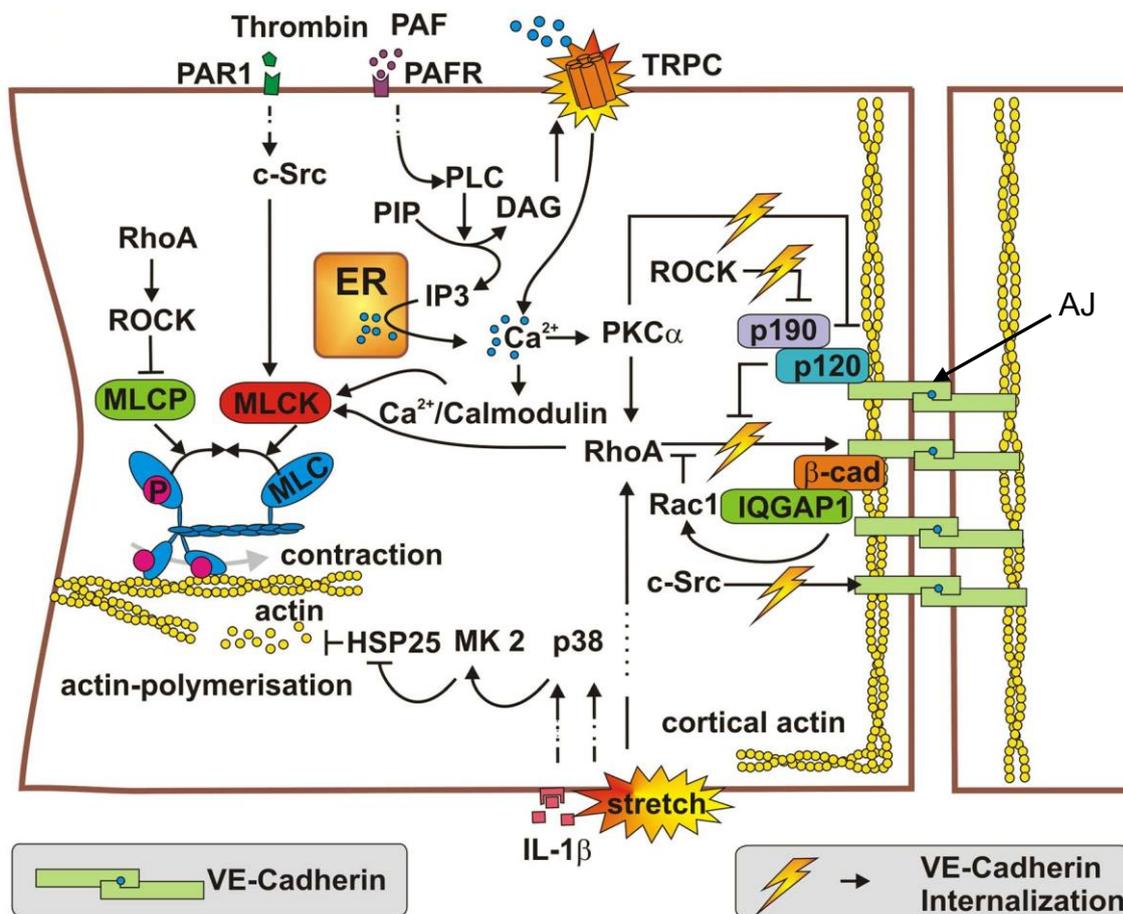
Zonula adherens und Zonula occludens sind diejenigen Strukturen, die interzelluläre Barrierefunktion vermitteln. Ein Hauptbestandteil der Adherens Junction ist VE-Cadherin, welches zusammen mit verschiedenen Cateninen die interzellulären Verbindungen herstellt (83). VE-Cadherin ist ein wesentlicher Bestandteil vaskulärer Integrität (84). Wenn sich die *Adherens Junctions* durch Internalisierung des VE-Cadherins lösen, entstehen Lücken zwischen Endothelzellen, die eine erhöhte Permeabilität des Endothels bedingen (83).

Myosin-light Chain Kinase (MLCK) wird über einen  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle aktiviert und phosphoryliert im Weiteren MLC. So wird eine Kontraktion der Zelle vermittelt und somit eine erhöhte parazelluläre Permeabilität verursacht (85-87). In MLCK-defizienten Mäusen entwickelt sich VILI weniger ausgeprägt und eine Inhibition der MLCK *in vivo* reduziert VILI (88). Auch direktes Mechanosensing von Calciumkanälen löst eine Barrierestörung aus (24, 26).

Pulmonalvaskuläre Permeabilität in der Lunge resultiert in Ödembildung im Interstitium sowie in der Alveole (89, 90). Dies bewirkt das Auswaschen des Surfactant von der alveolären Oberfläche mit einer daraus resultierenden erhöhten Kollapsneigung der Alveolen. Kollabierte Lungenregionen beinhalten zum einen eine verringerte

Gasaustauschfläche und verursachen zum anderen ein erhöhtes Shuntvolumen. Zusätzlich verändern sie die Lungenmechanik (Compliance). Belüftete Lungenbereiche werden in diesem Falle überbläht und erleiden ein Barotrauma. Das zyklische Öffnen der Atelektasen in der Inspiration führt zu extremen transpulmonalen Drücken, die auch einen Lungenschaden verursachen (91, 92). Die durch Ödeme vorhandenen Plasmaproteine vermitteln eine Surfactantdeaktivierung und eine daraufhin vermehrte Atelektasenbildung. Dies sind die entscheidenden Mechanismen der Oxygenierungsstörung bei ARDS und VILI (19, 37, 38, 77, 89, 92).

Die gezielte Reduktion von Permeabilität durch beispielsweise adjuvante Pharmakotherapien wäre vor diesem Hintergrund ein erstrebenswertes Therapieziel.



**Abb. 1**

**Regulation endothelialer Permeabilität durch verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden (aus Müller-Redetzky et al. (93))**

Endotheliale Kontraktion resultiert aus der Interaktion von Aktin und Myosin nach MLC-Phosphorylierung, welche durch die MLCK und MLCP reguliert wird. MLCP wird durch den RhoA-ROCK Signalweg inhibiert, während MLCK durch c-Src, RhoA und  $Ca^{2+}$  / Calmodulin aktiviert wird.  $Ca^{2+}$  gelangt über das endoplasmatische Retikulum (ER) oder den Extrazellulärraum in das Zytosol. Über Platelet activating factor (PAF) und PAF Rezeptor (PAFR), hydrolysiert Phospholipase C (PLC) Phosphatidyl inositol Bisphosphat (PIP) in Inositol 1,4,5-Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG). IP3 vermittelt die Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus dem ER, während DAG Transient receptor potential canonical (TRPC) in der Zellmembran öffnet. Der daraus resultierende Anstieg von  $Ca^{2+}$  führt zu einer Aktivierung von Proteinkinase C (PKC)  $\alpha$ , zu einer weiteren Aktivierung von RhoA und zu  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-Komplexen, welches schließlich in einer Aktivierung von MLCK mündet. Die Polymerisation von Aktin führt zur Bildung von Belastungsfasern, die mit endothelialer Kontraktion assoziiert sind. Verschiedene Stimuli wie IL-1 $\beta$  oder mechanische Belastung aktivieren die mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) p38 (p38), was zur Aktivierung der MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 führt (MK2), welche heat shock protein 25 (HSP25) phosphoryliert und zur Aktin-Polymerisation führt. Adherens Junctions (AJ) sind für die Verbindung interzellulärer Kontakte obligat. Die Phosphorylierung von VE-cadherin führt zu einer Internalisierung des VE-cadherins und somit zu erhöhter Permeabilität. RhoA und c-Src phosphorylieren VE-cadherin. Rac-1 und p190RhoAGAP (p190) antagonisieren funktionell die Aktivität des RhoA. P190RhoAGAP wird von p120-Catenin (p120) in die AJ rekrutiert. P120 selbst inhibiert die VE-Cadherin Internalisierung. ROCK inhibiert p190RhoAGAP und PKC $\alpha$  inaktiviert p120-Catenin und erhöht somit die Destabilisierung der AJ. IQGAP1 rekrutiert und stabilisiert Rac-1, womit es vor einer Internalisierung des VE-Cadherins schützt.

## 2.3 Acute Respiratory Distress Syndrome

Der Begriff des *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) wurde im Jahre 1967 durch Ashbaugh und Kollegen eingeführt (94), um ein allgemeines klinisches, pathophysiologisches und pathologisches Bild des akuten Lungenversagens zu beschreiben. Es wurde als ein Syndrom beschrieben, welches durch ein akutes Auftreten von Tachypnoe, Hypoxämie, den Verlust der Lungencompliance sowie eine fehlende Ansprechbarkeit auf damals herkömmliche Therapiemethoden charakterisiert war.

Das ARDS wird heute durch klinische Kriterien definiert (95). Diese beinhalten eine eingeschränkte Oxygenierungsfähigkeit zusammen mit radiologischen und echokardiographischen Kriterien bei Ausschluss eines primär kardiogenen Lungenödems. Die American-European Consensus Conference (AECC) formulierte im Jahr 1994 eine Definition, die aktuell 2012 modifiziert wurde.

Diese aktuelle „Berlin-Definition“ des ARDS lautet wie folgt:

**Tab. 1**  
**Definition des akuten Lungenversagens (Acute Respiratory Distress Syndrome, ARDS)**  
 (nach AECC – American-European Consensus Conference, 2012 (96))

Mildes ARDS	Moderates ARDS	Schweres ARDS
Akute Entwicklung (innerhalb 1 Woche)		
Beidseitige Infiltrationen im Röntgen-Thorax-Bild oder Thorax-Computertomographie		
Ausschluss eines kardiogenen Lungenödems mittels Echokardiographie		
Pa O <sub>2</sub> /Fi O <sub>2</sub> = 201-300 mmHg bei PEEP ≥ 5 cmH <sub>2</sub> O	Pa O <sub>2</sub> /Fi O <sub>2</sub> 101-200 mmHg bei PEEP ≥ 5 cmH <sub>2</sub> O	Pa O <sub>2</sub> /Fi O <sub>2</sub> <100 mmHg bei PEEP ≥ 5 cmH <sub>2</sub> O

Der zentrale Pathomechanismus des ARDS ist die Entwicklung eines Permeabilitätsödems aufgrund einer akuten Schädigung der alveolokapillären Barriere (97). Die Pneumonie stellt die häufigste Ursache des ARDS dar (95).

Der oben genannten Schädigung der alveolokapillären Barriere folgt ein Einstrom von protein- und mediatorreicher Flüssigkeit in die Alveole, wobei man von einem Permeabilitätsödem spricht. Diese resultierende Verminderung der pulmonalen

Compliance führt zur Atelektasenbildung, was über die Diffusionsstörung hinaus eine absolute Reduktion der Gasaustauschfläche, sowie bei gestörter hypoxischer Vasokonstriktion (98) zu einem Perfusions-Ventilations-Missverhältnis führt. Durch positive Beatmungsdrücke und pulmonale Vasokonstriktion steigt die rechtskardiale Nachlast bei ARDS, was zu rechtsventrikulärer Dysfunktion führen (99) und zur extrapulmonalen Organinsuffizienz beitragen kann.

Nur ein kleiner Teil der Patienten mit ARDS verstirbt an respiratorischem Versagen (100, 101). Die Mortalität der Patienten mit ARDS ist vielmehr entscheidend durch das Multiorganversagen (MOV) bedingt. Deshalb ist die Beachtung der extrapulmonalen Organfunktion bei der Entwicklung adjuvanter Therapieverfahren für Patienten mit ARDS relevant.

## **2.4 Ambulant erworbene Pneumonie**

Pneumonien sind die häufigste Ursache für ARDS und Sepsis (8, 102, 103). *Streptococcus pneumoniae* gehört zu den alpha-hämolysierenden grampositiven Streptokokken und ist mit 30 % der weltweit häufigste Erreger der ambulant erworbenen Pneumonie (englisch = *community-acquired pneumonia*, CAP) (104-106).

Die Mortalität der CAP beläuft sich insgesamt auf ca. 5 %, kann jedoch bei der schweren ambulant erworbenen Pneumonie (sCAP) mit Lungenversagen bis über 30 % betragen (107).

Etwa jeder zweite Westeuropäer und US-Amerikaner ist asymptomatischer Träger von *Streptococcus pneumoniae* in der Mundhöhle und im Nasopharynx und zumeist ist die Pneumokokkenpneumonie eine endogene Infektion (104). Die Wahrscheinlichkeit einer Infektion nimmt zu, wenn die Erregerdosis die körpereigene Abwehr überfordert (108). Besonders betroffen von Infektionen durch Pneumokokken sind Kleinkinder, ältere Menschen und Patienten mit prädisponierenden Bedingungen, wie Asplenie, chronischen Erkrankungen oder Immunsuppression, wie z.B. bei Erkrankung durch Infektion mit Humanem Immundefizienz-Virus (HIV) (109).

Pneumokokken kennzeichnen sich durch zahlreiche spezifische Virulenzfaktoren, wie das Pneumolysin oder das Cholin-bindende Protein A (CbPA). Verschiedene Stämme

sind mit unterschiedlichen Virulenzfaktoren ausgestattet. Das Exotoxin Pneumolysin ist an der Pathophysiologie der Kolonisierung des Wirts beteiligt (110). Pneumolysin induziert die Ausschüttung von Zytokinen während der Entzündung (109, 111). Es wirkt zytotoxisch auf die Zilien-Zellen des Bronchialepithels (109), verlangsamt die Zilientätigkeit und zerstört *Tight Junctions* und *Adherens Junctions*, was zur Entwicklung einer Störung der mukoziliären Clearance und der endoepithelialen Barrierefunktion führt und schließlich in einem Permeabilitätsödem mündet (112-114). Pneumolysin hat bei Mäuselungen *ex vivo* direkten Einfluss auf die Endothelkonstriktion über eine Phosphorylierung von MLC initiiert durch Platelet-activating factor (PAF) (115). Durch die Barrierefunktionsstörung wird die Translokation der Erreger ins Gewebe und auch in das Blut begünstigt (109).

## 2.5 Pneumogene Sepsis mit septischem Organversagen

Die schwere Sepsis hat in der Bevölkerung eine Inzidenz von ca. 110/100.000 pro Jahr (116). Die Letalität dieser beläuft sich auf etwa 29 % (102). Die häufigste Todesursache bei ARDS mit Sepsis ist nicht das respiratorische Versagen, sondern das septische MOV (12). Die unkontrollierte systemische Hyperinflammation scheint dafür partiell verantwortlich zu sein (10).

Unter mechanischer Beatmung werden in der Lunge vermehrt Zytokine wie TNF $\alpha$ , IL-8/KC und MIP-2 gebildet und freigesetzt (33, 35, 44). Versuche an isoliert ventilert und perfundierten Mäuselungen zeigten, dass beatmungsbedingt Zytokine aus der Lunge in die systemische Zirkulation übertreten können (34, 42). *In vivo* konnte ebenfalls ein systemischer Anstieg von Zytokinen unter Beatmung nachgewiesen werden (117).

Die Konzentration an IL-6 im Plasma korreliert in experimentellen und klinischen Studien durch akute Inflammation mit der Mortalität (55, 118). Auch unter Beatmung ist die Konzentration an IL-6 im Plasma mit MOV und insbesondere mit Nierenversagen assoziiert (5). Dies legt nahe, dass Beatmung den Verlauf einer Sepsis relevant beeinflussen könnte.

Im Rahmen der Sepsis kann sich sowohl eine Leukozytose als auch eine Leukozytopenie aufgrund eines „Leukozytenverbrauches“ entwickeln. Die Ursache der Leukozytopenie liegt in der Sequestration von Leukozyten am entzündlich aktivierten Endothel (119). Von dort migriert dann ein beträchtlicher Teil der PMN auch in das Gewebe (70), den Alveolarraum und die Lungenkapillaren (79, 105).

Eine Bakteriämie ist bei der humanen Pneumokokkenpneumonie häufig und im Mausmodell, welches in dieser Arbeit verwendet wurde, beginnt diese etwa 24 Stunden nach Infektion (120). Auf Bakteriämie folgen Zeichen von Sepsis mit vermindertem systemischem arteriellen Blutdruck und einem Anstieg des Laktat als Zeichen der Gewebsminderperfusion im septischen Schock (105, 121). Mikroperfusionsstörungen sind durch mehrere Faktoren bedingt. Hypotension, reduzierte Deformabilität der Erythrozyten und mikrovaskuläre Thrombosen tragen zur verminderten Sauerstofftransportfähigkeit beim septischen Schock bei. Thrombosen sind durch gleichzeitige Aktivierung der Gerinnung, Abschwächung von antikoagulatorischen Mechanismen und zusätzlich eine Unterdrückung der Fibrinolyse bedingt (119). Mitochondrien-Schädigung durch oxidativen Stress verschlechtert auch den zellulären Sauerstoffverbrauch (122). Verletzte Mitochondrien setzen DAMPs mit mitochondrialer DNA frei und bilden Peptide, welche die PMN aktivieren und somit weiteren Gewebsschaden verursachen können (123).

In der Genese von Multiorganversagen spielt auch der programmierte Zelltod (Apoptose) eine wichtige Rolle (124). Apoptose kann u.a. durch den löslichen Fas-Ligand (FasL) induziert werden, der im VILI vermehrt in der Lunge freigesetzt wird und ins Blut übertritt (14). Im VILI wird vermehrt Apoptose des Nierenepithels beobachtet, die mit einer Nierendysfunktion einhergeht (14, 125).

Eine Neutralisation von FasL durch Antikörper schützt vor Nierenepithelzellapoptose und Nierendysfunktion im Tierexperiment (14). Auch beim Menschen korreliert Nierenversagen ausgelöst durch VILI mit der Konzentration von FasL im Plasma (14).

Die Therapie der schweren Sepsis besteht aus Antibiose, gegebenenfalls mit chirurgischer Fokussanierung, und supportiver Intensivtherapie. Die Intensivtherapie beinhaltet unter anderem die Gabe von Flüssigkeit, eventuell Verabreichung von Albumin, Noradrenalin und mechanischer Beatmung. Die Beatmung sollte lungenprotektiv sein und niedriges Tidalvolumen, PEEP und ggf. Bauchlagerung beinhalten (119). Eine spezifische pharmakologische adjuvante Therapie der Sepsis existiert bislang nicht.

## 2.6 Adrenomedullin

Technisch sind der lungenprotektiven Beatmung Grenzen gesetzt, da eine weitere Senkung der Tidalvolumina durch die Entwicklung von Hyperkapnie und damit Azidose limitiert ist. ARDS, VILI und Sepsis haben, wie beschrieben, teilweise sich überschneidende Pathophysiologien. Vor diesem Hintergrund entwickelte adjuvante pharmakotherapeutische Ansätze wären eine mögliche Option, um das Outcome von Patienten mit schwerer beatmungspflichtiger Pneumonie zu verbessern. Das endogene Peptid Adrenomedullin (AM) könnte eine solche Therapieoption darstellen.

AM besteht aus 52 Aminosäuren und gehört zu der Familie der *Calcitonin gene-related peptides* (CGRP) (126). *Calcitonin receptor-like receptor* (CRLR) und Receptor activity modifying protein 2 und 3 (RAMP2/ RAMP3) bilden gemeinsam einen spezifische AM-Rezeptor (127). RAMPs sind notwendig, um CRLR an der Zelloberfläche zu präsentieren (128) und damit Signalkaskaden in der Zelle zu aktivieren. Die Produktion von AM erfolgt im Nebennierenmark, in vaskulären glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen, Endothelzellen der Lunge und in Leukozyten (insbesondere Monozyten).

Im Dünndarm wird eine große Menge an AM während der akuten polymikrobiellen Sepsis in der Ratte sezerniert (129). Insbesondere findet sich AM im Bindegewebe der Mukosa und Submukosa des Dünndarms, sowie im intestinalen Nervengeflecht um intestinale Drüsen und kleine Blutgefäße. Eine relevante Ausschüttung von AM in der Lunge konnte bei Endotoxinämie (130) und auch bei mildem ARDS – induziert durch Hypoxie und Lipopolysaccharid (LPS) (131) – nachgewiesen werden. Proinflammatorische Zytokine, wie IL-1 $\beta$ , bakterielle Produkte wie LPS oder Hypoxie sind dabei u.a. Ursache für den Anstieg der AM-Ausschüttung in verschiedenen Zellen (132-134).

AM ist an zahlreichen Funktionen des Körpers beteiligt, wie beispielsweise Vasodilatation, Bronchodilatation, Regulierung der Hormonsekretion, Wachstum, Apoptose, Angiogenese, antimikrobiellen Aktivitäten (126, 135) und bei der Regulierung endothelialer Permeabilität (37, 136, 137).

Die barriere-stabilisierende Wirkung des AM beruht dabei auf mindestens zwei unterschiedlichen Mechanismen. Zum einen stabilisiert AM *Tight Junctions* und *Adherens Junctions*, indem der Verlust von VE-Cadherinen verhindert und nach längerfristiger AM-Exposition vermehrt Claudin-5 gebildet wird (138, 139). Zum anderen vermindert AM die Phosphorylierung der MLC, wodurch die aktive Porenbildung im Endothelverband durch Zellkontraktion reduziert wird (140, 141).

Damit wird Permeabilität und Ödembildung verringert, was beim Lungenödem zu einer Verbesserung der Oxygenierung führt (37). Applikation von AM verbessert das Überleben im Tiermodell bei Sepsis (142), und scheint in diesem Modell auch antiinflammatorisch zu wirken (143).

AM reduziert im Tiermodell vaskuläre und epitheliale Hyperpermeabilität mit Ödembildung in der Lunge und im Darm (37, 137, 141), wirkt einer Hypoperfusion des Darmes – verursacht durch das Alphatoxin von *Staphylococcus aureus* – entgegen (144) und verbessert das Überleben beim septischen Schock bei Ratten (136).

Darüber hinaus wirkt AM protektiv bei VILI und damit verbundener Nierenschädigung im Mausmodell (37).

Studien am Menschen zeigten, dass AM auch im Zusammenhang mit chronischer Herzinsuffizienz (145) und pulmonalerterieller Hypertonie die hämodynamische Funktion verbessert (146-148), ohne relevante Nebenwirkungen zu haben.

Vor diesem Hintergrund hat das Committee for Orphan Medicinal Products (COMP) der EMA (European Medicines Agency) im Jahre 2011 eine Empfehlung zur Zuerkennung des Status für AM als ein Orphan Medicinal Product zur Behandlung des ARDS (EMA/COMP/169921/2010) ausgesprochen.

Die Pneumonie ist die häufigste Ursache für die Entwicklung von ARDS und Sepsis. Beatmung ist lebensrettend für Patienten mit respiratorischem Versagen bei Pneumonie.

Entzündlich vorgeschädigtes Gewebe scheint für die Entwicklung von VILI deutlich empfänglicher zu sein. Auch für die Pneumonie gibt es diesbezüglich bereits Hinweise. Beatmungsschaden und Pneumonie-assoziierte Lungenschädigung sind bei schwerer Pneumonie mit ARDS somit immer koinzidentell und die Interaktion zwischen

Pneumonie und Beatmung hinsichtlich des Lungenschadens und extrapulmonalen Organversagens ist noch nicht ausreichend verstanden. Adjuvante Therapien sollten sich aus diesem Verständnis entwickeln und in präklinischen Modellen evaluiert werden, die diese Koinzidenz berücksichtigen.

### 3 Herleitung der Aufgabenstellung

Die Pneumonie ist die häufigste Ursache für ARDS und Sepsis. *Streptococcus pneumoniae* ist wiederum der häufigste Erreger der schweren ambulant erworbenen Pneumonie (sCAP). Patienten mit schwerer Pneumonie und Lungenversagen werden oft maschinell beatmet. Um adjuvante pharmakologische Therapien für Patienten mit (pneumogenem) ARDS präklinisch zu charakterisieren, sollten Tiermodelle die klinische Situation berücksichtigen und auch extrapulmonale Organschädigung abbilden.

Adrenomedullin (AM) ist bekannt für seinen stabilisierenden Effekt auf die endotheliale Barrierefunktion und Mikrozirkulation. Aufgrund dieses Effektes könnte AM eine vielversprechende adjuvante Therapieoption bei VILI und Pneumonie mit Sepsis darstellen.

In dieser Arbeit wurden folgende Hypothesen untersucht:

1. Maschinelle Beatmung aggraviert die Lungenschädigung bei Pneumonie und führt zu Progression der Pneumonie mit schwerer Sepsis und extrapulmonalem Organversagen.
2. AM schützt vor der Entwicklung eines VILI auch bei bestehender Pneumonie und vor extrapulmonalem Organversagen.
3. AM beeinflusst die pulmonale Abwehrkompetenz des Wirtes gegenüber *S. pneumoniae* nicht.
4. AM reduziert bei Mäusen mit pneumogener Sepsis den Schweregrad des Multiorganversagens.

## 4 Materialien und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Geräte und Apparaturen

Autoklav Tuttnauer Systec 2540 EL	Systec GmbH (Wettenberg)
Druckluft und medizinischer Sauerstoff	Abteilung Technische Gase, Charité – Universitätsmedizin Berlin (Berlin)
Beatmungssoftware Pulmodyn, Version 1.1.1.121	Ing. Büro Kegler und Guhr (Gross- Zimmern)
BGA-Gerät ABL-800	Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Blutdruckmessgerät PPG	Servomed (Berlin)
Brutschrank (Heraeus, Typ BB6220 O <sub>2</sub> )	Kendro Laboratory Products (Hanau)
CellQuest™ Pro, Software, Version 4.0	BD Biosciences (Heidelberg)
Differential Pressure Transducer MPX, Type 399/2 und P75 Typ 379	Hugo Sachs Elektronik (March- Hugstetten)
Differential Pressure Transducer Validyne DP45-14	Hugo Sachs Elektronik (March- Hugstetten)
Druckabnehmer Blutdruck	Servomed (Berlin)
FACSCalibur	BD Biosciences (Heidelberg)
Gefrierschrank -80 °C	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Kleine Epi-Zentrifuge (Galaxy Mini Centrifuge)	VWR International GmbH (Darmstadt)
Kühlschrank +4 °C (Liebherr Profi line)	Engmann Kühlsysteme (Mannheim)
Magnetrührer (Variomag Elektronikrührer Mono)	H+P Labortechnik GmbH (Oberschleißheim)
Megafuge 1.0R, kin. Energie 26kJ	Kendro Laboratory Products (Hanau)
Mikroskop Stemi DV 4	Carl Zeiss MicroImaging GmbH (Göttingen)
MiniVent Type 845 Mouse Ventilator	Hugo Sachs Elektronik (March- Hugstetten)
Spritzenpumpe MiniMed	Medtronic (Minneapolis, MN, USA)
Neubauer Zählkammer (Bright-Line)	LO-Laboroptik GmbH (Friedrichsdorf)
Photometer (UVIKON <sub>XS</sub> )	BioTek Instruments (Bad Friedrichshall)
Präparationsbesteck	Fine Science Tools GmbH (Heidelberg)
Radiometer ABL-800	Radiometer (Kopenhagen, Dänemark)
Rektalsonde (physitemp Model BAT-12)	Physitemp Instruments Inc. (Clifton, NJ, USA)
Schüttelwasserbad GFL Typ 1083	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel)
Sicherheitsarbeitsbank (Heraeus Sorvall, Typ HS12)	Kendro Laboratory Products (Hanau)

Statistiksoftware Prism, Version 4	GraphPad Software, Inc. (La Jolla, CA, USA)
Sondenthermometer physitemp Model BAT-12	Physitemp Instruments Inc. (Clifton, NJ, USA)
Surgivet Isotec 4 (für Isofluran)	Smiths Medical (Dublin, OH, USA)
Vortex-Genie 2 Model: G-560E	Scientific Industries Inc. (Bohemia, NY, USA)
Waage Model CS200 (200g x 0,1g)	Ohaus Corporation (Parsippany, NJ, USA) über VWR
Wärmematte Homeothermic Blanket Control Unit	Harvard apparatus (Holliston, MA, USA)
Zentrifuge Heraeus (Biofuge fresco)	Kendro Laboratory Products (Hanau)

#### 4.1.2 Chemikalien/ Reagenzien

Bacto™ Hefeextract 0,5 %, (Yeast Extract)	BD Biosciences (Heidelberg)
Bacto™ Todd-Hewitt-Bouillion	BD Biosciences (Heidelberg)
Collagenase Type 2, 308 µ/mg	Worthington biochemical corporation (Lakewood, NJ, USA)
DNase I 100mg from bovine pancreas grade II	Roche (Grenzach-Wyhlen)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
Humanes Serum-Albumin	Baxter (Deerfield, Illinois, USA)
Hyaluronidase	Sigma (Deisenhofen)
Murines Adrenomedullin	Phoenix (Burlingame, CA, USA)
Steriles fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Dulbecco's PBS without Ca und Mg	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) 1640 with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)
Fentanyl 0,5mg/ 10 ml	Janssen (Beerse, Belgien)
Heparin (5000 I.E./ml)	Rotexmedica GmbH (Trittau)
Medetomidin 1mg/ml	Provet AG (Lyssach, Schweiz)
Midazolam 10 % (5mg/ml)	Roche Pharma AG (Grenzach-Wyhlen)
Ketamin 10 %, 100 mg/ml Injektionslösung für Hunde und Katzen	WDT (Garbsen)
Rompun 2 %, Xylazin Injektionslösung für Rinder, Pferde, Hunde, Katzen	Bayer Vital GmbH (Leverkusen)

#### 4.1.3 Durchflusszytometrie

CD3e Pharmingen™ FITC Hamster Anti-Mouse CD3e, Clone: 145-2C11, 0,5mg/ml	BD Biosciences (Heidelberg)
CD45 Pharmingen™ PerCP Rat Anti-Mouse CD45 (30-F11), 0,2mg/ml	BD Biosciences (Heidelberg)
CellWASH	BD Biosciences (Heidelberg)
F4/80 Invitrogen™ Anti-Mouse F4/80, Allophycocyanin Conj. 0,5ml	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
GR1 Pharmingen™ PE Rat Anti-Mouse Ly-6G and Ly-6C, Clone: RB6-8C5, 0,2mg/ml	BD Biosciences (Heidelberg)

#### 4.1.4 Quantitative Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (Real-Time-qPCR)

I-Cycler IQ detection system	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
IQ SYBR Green Real-Time PCR Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Oligo(dT) als Primer	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)
RNeasy mini kit	Qiagen (Hilden)
Superscript H <sup>-</sup> reverse transcriptase	Invitrogen GmbH (Karlsruhe)

#### 4.1.5 Precision Cut Lung Slices (PCLS)

70 % EtOH for disinfection	Stockmeier Chemie (Dillenburg)
Aufrechtes Invertiertes Mikroskop, ausgestattet mit 4x, 10x, 20x und 40x Objektiven	Leica (Wetzlar)
CaCl <sub>2</sub> 2 H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt)
CCD-Kamera	Stemmer Imaging (Puchheim)
Durchflussskammer (Engl. flow-through superfusion chamber)	Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten)
Glucose D-(+)	Sigma (Deisenhofen)
Heparin-sodium	Ratiopharm (Ulm)
HEPES-Ringer-Lösung	Sigma (Deisenhofen)
hypoxic gas mixture (1 % O <sub>2</sub> , 5,3 % CO <sub>2</sub> , 93,7 % N <sub>2</sub> )	Linde (Hildesheim)
KCl	Merck (Darmstadt)
Low melting point agarose, 1,5 %	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
MgCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt)
Mikrowelle	Bosch (Frankfurt)
NaCl	Roth (Karlsruhe)

Peristaltische Pumpe Minipuls 3	Gilson, (Limburg-Offheim)
Phenolred-free minimal essential medium (MEM)	Invitrogen (Darmstadt)
Sekundenkleber	UHU (Bühl/Baden)
sodium nitroprusside (Nipruss)	Schwarz Pharma (Monheim)
Software Optimas 6,5	Stemmer Imaging (Puchheim)
SPSS 19	AskNet (Karlsruhe)
U46619 (Thromboxan-Analagon)	Calbiochem/Merck (Darmstadt)
Universal Wasserbad Isotem 205	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Vibratom "Microm HM 650 V"	Microm/Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Vibratom, VT1000S	Leica (Bensheim)
Wärmeschrank	Heraeus/Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

#### 4.1.6 ELISA

Anthos ht2 Mikroplatten Photometer	Ankos Mikrosysteme GmbH (Krefeld)
ELISA zur NGAL-Bestimmung	BioPorto (Gentofte, Dänemark)
Human Albumin ELISA Quantitation Set, Cat. No. E80-129, (Components: A80-129A-9, RS10-110-3, A80-129P-21)	Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, TX, USA)
Software Win-Read Anthos	Ankos Mikrosysteme GmbH (Krefeld)

#### 4.1.7 BIOPLEX

Bioplex Handbuch Version 4.2.2	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Bio-Plex™ Millipore	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Bio-Plex™ Plex Zytokine Reagent Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Bio-Plex™ Workstation	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Cell-Lysis-Kit	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)
Cytokine Multiplex Assay Technique	Bio-Rad Laboratories GmbH (München)

#### 4.1.8 Histologie und Apoptose

Diaminobenzidin	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Hämatoxylin	Leica Biosystems (Wetzlar, Deutschland)
Polyklonaler anti-cleaved Caspase-3 Antikörper, Asp175, 1:50	Cell Signaling Technology (Frankfurt)

#### 4.1.9 Immunhistochemie

0,4 µg/µl 4',6-Diamidino-6-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Sigma (Deisenhofen)
Anti CD31 endothelialer Marker Klon MEC 13,3, 1µg/ml	BD Biosciences (Heidelberg)
biotinyliertes Lycopersicum esculentum Lektin, LEL; 1:3200	Vector Laboratories (Burlingame, CA, USA)
Cy3-konjugiertes Esel anti-Hasen IgG, 1:2000	Dianova (Hamburg)
Cy3-konjugiertes Ziegen anti-humanes IgG F(ab)2, 1:500	Dianova (Hamburg)
Dinatriumcarbonat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
FITC-markiertes Streptavidin, 1:500	Sigma (Deisenhofen)
Fluoreszenzmikroskop, Axioplan 2	Zeiss (Jena)
Glycerol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Isopentan	Fluka, Sigma (Taufkirchen)
Kryostat, Leica CM 1900	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar)
Natriumhydrogencarbonatlösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Paraformaldehyd 4 %	Merck (Darmstadt)
Phosphatpuffer	Merck (Darmstadt)
Primärantikörper (Adrenomedullin Mensch, monoklonal, Fab-Fragment)	MorphoSyS (Martinsried/ Planegg)
Primärantikörper (CD31 Ratte, monoklonal, biotinyliert)	BD Biosciences (Heidelberg)
Rinderserum (BSA) (0,1 %)	Merck (Darmstadt)
Schweineserum (10 %),	Merck (Darmstadt)
SuperFrost Plus Objektträger	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Tissue-Tek® O.C.T.™	Sakura (Zoeterwoude, Holland)
Tween 20 (0,5 %)	Merck (Darmstadt)

#### 4.1.10 Verbrauchsmaterialien

0,5ml Safe Seal Gefäß	Sarstedt (Nümbrecht)
1,5ml Safe Seal Gefäß	Sarstedt (Nümbrecht)
ABI Prism® 96-Well-Optical-Reaction-Plate	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
BD BlueMAX Falcon 50ml Konisches Röhrchen, Polypropylen, 30 x 115mm style	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Discardit™ II, Spritze 2ml	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon 352052, 5ml Rundbodenröhrchen, Polystyrol, 12 x 75mm style	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Falcon Konisches Röhrchen 15ml,	BD Biosciences (Heidelberg)

Polypropylen, 17 x 120mm style	
BD Falcon Zellsieb (100µm/ 50µm)	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Microlance™ Kanüle 3 27G ¾ - Nr. 20, 0,4 x 19mm	BD Biosciences (Heidelberg)
BD Plastipak™ Spritze 1ml	BD Biosciences (Heidelberg)
Columbia Agarplatten mit 5 % Schafblut	BD Biosciences (Heidelberg)
Handschuhe DermaClean	Ansell Healthcare Europe (Anderlecht, Belgien)
NaCl 0,9 %, Isotone Natriumchloridlösung	B Braun AG (Melsungen)
Pipetten (10µl/ 100µl/ 200µl /1000µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitze 10µl, farblos (für Infektion)	Sarstedt (Nümbrecht)
Röhren, Tubes, 5ml, 75 x 13mm, PP	Sarstedt (Nümbrecht)
Rotilabo® Spritzenfilter	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe)
Serologische Pipetten (2ml/ 5ml/ 10ml/ 25ml)	BD Biosciences (Heidelberg)
Sterile Einmal-Impfschlingen (farblos, 1µl)	Nunc GmbH & Co KG (Wiesbaden)
Trucount-Röhrchen, Trucount Tubes	BD Biosciences (Heidelberg)

#### 4.1.11 Versuchstiere

Die Tierexperimente wurden im Rahmen eines vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin genehmigten Versuchsvorhabens durchgeführt (Antragsnummer G0383/08, Bewilligung 2008).

Zur Durchführung der Versuche wurden weibliche Wildtyp-Mäuse aus SPF-Haltung vom Inzuchtstamm C57Bl/6N in einem Alter von 8-10 Wochen mit einem Körpergewicht zwischen 18 und 20 g verwendet. Die Tiere wurden von Charles River Laboratories (Niederlassung Sulzfeld, Deutschland) bezogen und in geschlossenen Käfigen mit Filterhaube (Typ II-L, EHRET, Emmendingen, Deutschland) gehalten. Ihnen wurde zu jeder Zeit freier Zugang zu pelletiertem Futter und Wasser gewährleistet. Die tägliche Dauer der Beleuchtungsphase zur Simulation von Tageslicht betrug 12 Stunden.

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*

#### 4.2.1.1 Vorbereitung der Nährmedien

Für das Nährmedium wurden 30 g Bacto™ Todd Hewitt Boullion unter Zusatz von 5 g Bacto™ technischem Hefeextrakt in einem Liter destilliertem Wasser so lange auf dem Magnetrührer durchmischt, bis eine klare Lösung entstand (Todd Hewitt Yeast - THY). Im Anschluss wurde diese Flüssigkeit in sterile Glasflaschen umgefüllt und für 10 Minuten bei 115 °C autoklaviert.

Für das benötigte sterile fetale Kälberserum (FCS) wurde FCS bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviert. Im Anschluss erfolgte die sterile Aliquotierung in 50 ml-Falcons und die anschließende Lagerung bei -20 °C. Unmittelbar vor Gebrauch erfolgte eine Sterilfiltration des aufgetauten Serums unter Verwendung eines sterilen Rotilabo® Spritzenfilters mit einer Porengröße von 0,45 µm.

#### 4.2.1.2 Bakterien

Für die Infektion der Mäuse wurde *Streptococcus pneumoniae* verwendet. Vorab wurde ein Arbeitsstock angelegt, aus welchem alle Bakterien für diese Studie zur Infektion angezüchtet wurden. Nach einer Aussaat der Pneumokokken und Anzucht auf Columbia Blutagar-Platten mit 5 % Schafblut wurden die Bakterien als Arbeitsstock in 1,5 ml Einfriermedium, bestehend aus 80 % Bacto™ Todd-Hewitt-Bouillion (mit einem Zusatz von 0,5 % Hefeextrakt) und 20 % Glycerol bei einer Temperatur von -80 °C gelagert.

#### 4.2.1.3 Anzucht

Aus dem Arbeitsstock wurde mit einer Kunststofföse die Bakteriensuspension auf Columbia Blutagar-Platten ausgestrichen. Nach zehn Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % Vol. CO<sub>2</sub> wurden die Kolonien mit einem sterilen Watte-Tupfer abgenommen und in 20 ml des Wachstumsmediums, bestehend aus 2 ml steril filtrierte FCS und 18 ml autoklaviertem THY, eingerührt. Durch die Bestimmung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm wurde das Wachstum der Bakterien im Nährmedium überwacht und die Anzahl der Bakterien pro Milliliter Nährmedium berechnet. Die

Bakterien wurden in der exponentiellen Wachstumsphase bei einer OD von 0,3 – 0,4 der Kultur zur Infektion verwendet.

Aus dem Volumen der Suspension und der OD wurde die Menge an Bakterien berechnet. Eine OD von 0,1 entsprach hierbei einer Bakterienkonzentration von  $1 \cdot 10^8$  Koloniebildenden Einheiten (KbE) pro Milliliter. Durch Abzentrifugieren der Bakterien mit 2009 g und Einstellung einer entsprechenden Verdünnung wurde die Suspension zur Infektion hergestellt. Pro Maus wurden insgesamt  $5 \cdot 10^6$  KbE *Streptococcus pneumoniae* in einem Volumen von 10 µl pro Nasenloch verabreicht.

#### **4.2.1.4 Infektion der Tiere**

Die Infektion der Tiere erfolgte 24 Stunden vor Beginn der sechsständigen Beatmung. Zunächst wurden Körpergewicht und Körpertemperatur jedes Tieres bestimmt und dokumentiert. Im Anschluss wurde die Narkose intraperitoneal mit 50 bis 70 µl eines Gemisches (3 ml 10 % Ketamin, 3 ml 0,9 % NaCl, 2,4 ml 2 % Rompun) eingeleitet. Zum Schutz der Kornea vor Austrocknung erhielten die Tiere Dexpanthenol-Salbe auf beide Augen. Nach Erreichen der erforderlichen Narkosetiefe wurden jeweils 10 µl Bakteriensuspension pro Nasenloch appliziert. Kontrolltiere erhielten 10 µl 0,9%ige Kochsalzlösung pro Nasenloch. Im Anschluss wurden die Tiere zurück in den Käfig gelegt und während ihrer Aufwachphase in einer ruhigen Umgebung mit einer Rotlichtlampe gewärmt und regelmäßig überwacht.

#### **4.2.1.5 Überwachung der infizierten Tiere und Beurteilung**

Nach der Infektion erfolgte eine Überwachung des klinischen Zustandes der Tiere im 12-Studentakt mit Messung des Körpergewichtes und der Körpertemperatur mit Hilfe einer Rektalsonde.

#### **4.2.2 Künstliche Beatmung und Behandlung mit Adrenomedullin**

24 Stunden nach Infektion der Tiere bzw. Instillation von PBS in den nicht infizierten Vergleichsgruppen erfolgte die sechsständige Beatmung. Zunächst wurden zur Einleitung Fentanyl (75 µg/kg), Midazolam (1,5 mg/kg) und Medetomidin (0,75 mg/kg) intraperitoneal verabreicht. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurden Fentanyl (16

$\mu\text{g/kg}$ ), Midazolam (0,33 mg/kg) und Medetomidin (0,16 mg/kg) über einen intraperitonealen Katheter gegeben. Die ausreichende Narkosetiefe wurde anhand des Zwischenzehenreflexes kontrolliert.

Nach der Narkoseeinleitung erfolgte die Präparation der Tiere. Die Körpertemperatur wurde über die gesamte Zeit bei 37 °C durch ein Heizkissen, kontrolliert durch eine Rektalsonde, beibehalten. Nach Tracheotomie und Intubation wurden Mäuse mit 70 % vol. Sauerstoffanteil mit einem MiniVent-Beatmungsgerät beatmet. Es wurden ein Tidalvolumen von 6 ml/kg Körpergewicht, eine Atemfrequenz von 240 pro Minute und ein PEEP von 6 cmH<sub>2</sub>O eingestellt. Ein Katheter wurde in die *Arteria carotis communis* zur kontinuierlichen arteriellen Blutdruckmessung gelegt. Über diesen Katheter erfolgte auch die kontinuierliche Gabe einer 0,9%igen Natriumchloridlösung versetzt mit 100 mmol/l HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> mit einer Laufrate von 350  $\mu\text{l/h}$ . Nach der Präparation erfolgte ein Rekrutierungsmanöver durch das Anheben des PEEP bis zu einem inspiratorischen Atemwegsspitzenndruck von 35 cmH<sub>2</sub>O für 5 Sekunden. Die Mäuse wurden nun für sechs Stunden mit einem Tidalvolumen ( $V_t$ ) von 12 ml/kg Körpergewicht, einer Atemfrequenz von 120 pro Minute und einem PEEP von 2 cmH<sub>2</sub>O beatmet. Während des Versuches wurden alle zehn Minuten Blutdruck, Herzfrequenz, Atemwegsdruck und Temperatur dokumentiert. Es wurde ein transurethraler Blasen Katheter gelegt. Die Urinproduktion wurde über die letzten 2 h des Versuches gemessen.

Fünf Minuten vor Beendigung des Experimentes wurde ein zweites Rekrutierungsmanöver durchgeführt. Die Mäuse wurden nach Vertiefen der Narkose durch Ausbluten euthanasiert. Das Blut wurde nach Sauerstoffoxygenierung ( $\text{paO}_2$ ) mittels Blutgasanalyse untersucht (ABL-800, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Es wurde die P/F-Ratio sowie der Quotient aus  $\text{paO}_2$  und  $\text{FiO}_2$  (inspiratorischer Sauerstoffanteil) berechnet.

In nicht-beatmeten Versuchsgruppen wurden die Mäuse 30 Stunden nach Instillation von PBS präpariert.

In den entsprechenden Gruppen wurde murines AM (0,05 mg/kg/h) beginnend mit der Beatmung kontinuierlich über den Karotis-Katheter infundiert.

### 4.2.3 Einteilung in Versuchsgruppen

Die Einteilung der Versuchstiere in der aktuellen Studie erfolgte in sechs Gruppen. Die Einteilung der Gruppen wird in Tab. 2 genauer erläutert.

**Tab. 2**  
**Einteilung der Tiere in sechs Versuchsgruppen.**  
(+), trifft zu; (-), trifft nicht zu.

Gruppen	1	2	3	4	5	6
<b>S.p.</b>	-	+	-	-	+	+
<b>6h vent.</b>	-	-	+	+	+	+
<b>AM</b>	-	-	-	+	-	+

(*S.p.*, *Streptococcus pneumoniae*; 6h vent., invasive Sechsstundenbeatmung; AM, Therapie mit Adrenomedullin.)

### 4.2.4 Bestimmung der alveolokapillären Permeabilität

Bei beatmeten Mäusen wurde Humanes Serum-Albumin (HSA) intravaskulär über einen Karotiskatheter, welcher zwischen Narkosebeginn und Beatmungsbeginn gelegt wurde, nach viereinhalbstündiger Beatmung appliziert. Bei nicht beatmeten Mäusen erfolgte die Applikation intravenös in die Schwanzvene.

Am Versuchsende und nach Entbluten des Tieres über den Karotiskatheter erfolgte nach medianer Thorakotomie die Ligation des linken Stammbronchus und im Anschluss die bronchoalveoläre Lavage (BAL) der rechten Lunge viermalig mit jeweils 400 µl PBS. Nach Abzentrifugierung bei 1011 g für 10 min bei 4 °C aller vier BALF-Proben, wurden aus den ersten beiden BALF-Proben jeweils 250 µl gepoolt und später für die Bestimmung der HSA-Konzentration verwendet. Die Rückstände aller BALF-Proben mit den enthaltenden Leukozyten wurden für die Durchflusszytometrie weiterverwendet.

Für die Gewinnung von Plasmaproben wurde zuvor Vollblut abzentrifugiert (1520 g, 10 min, 4 °C), und aus dem gewonnenen Plasma anschließend HSA bestimmt.

BALF und Plasma Konzentrationen des HSA (cHSA) wurden nach Herstellerangaben mit einem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Bethyl Laboratories Inc., USA) bestimmt.

Zur Bestimmung der pulmonalvaskulären Permeabilität wurde der Quotient aus den Konzentrationen des Humanen Serum-Albumins (HSA) in BALF und Plasma berechnet ( $cHSA_{BALF}/cHSA_{Plasma}$ ).

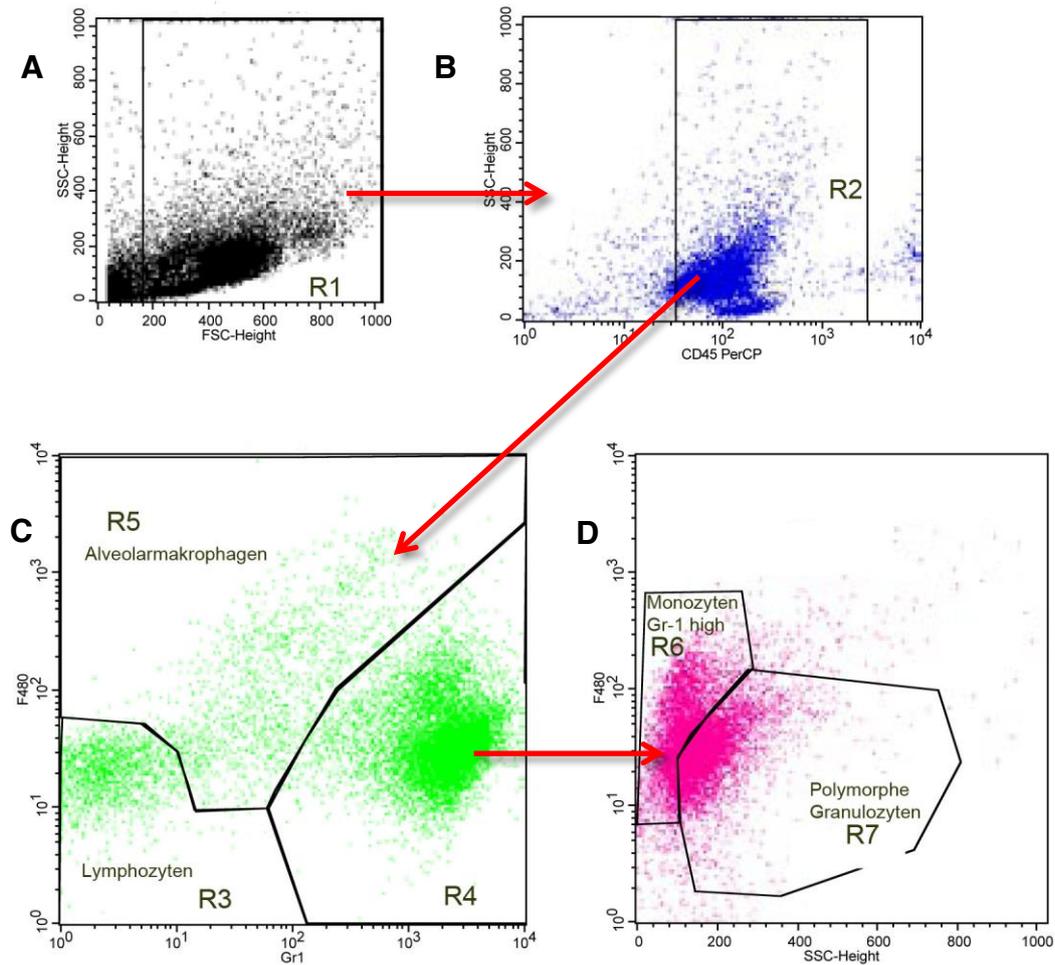
#### **4.2.5 Bestimmung von Leukozyten in Lungengewebe und Blut**

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (Fluorescence-Activated Cell Sorting, FACS) ist eine Zelltypisierung von Einzelzellen auf der Grundlage von Fluoreszenz- und Streulichteigenschaften möglich. Es wurden Leukozytenpopulationen im Lungengewebe und im Blut in der Durchflusszytometrie nach ihren Eigenschaften in der Seitwärtsstreuung (Side-Scatter – SSC) und in der Vorwärtsstreuung (Forward-Scatter – FSC) sowie der Expression von CD45, Gr-1 und F4-80 (Lunge) und CD45, Gr-1 und CD3 (Blut) differenziert.

Für die Isolierung von Leukozyten aus dem Lungengewebe wurde zunächst 50 ml RPMI mit 1,5 mg DNase versetzt und auf 37 °C aufgewärmt. Von dieser Lösung wurden 5 ml abpipettiert und mit 0,7 mg Kollagenase versetzt. Im Anschluss wurde die zuvor entnommene linke Lunge in dieser Lösung mit der Präparierschere in möglichst gleichmäßig kleine Stückchen von ca. 1 mm<sup>3</sup> zerkleinert. Diese Suspension wurde dann über eine Stunde bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert.

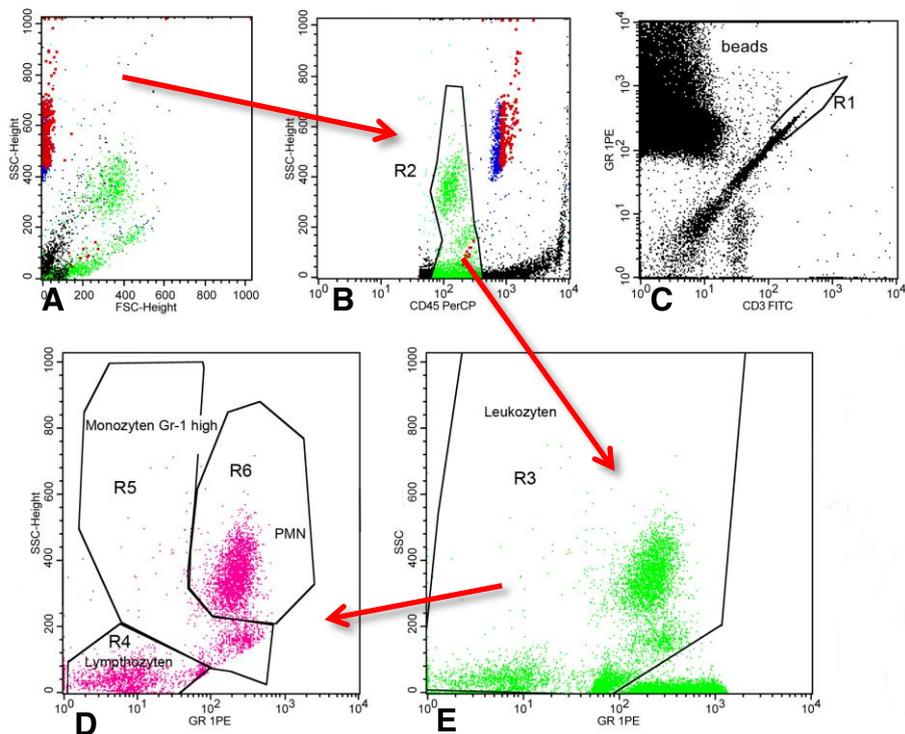
Danach wurde die Suspension mit dem zerkleinerten Lungengewebe sorgfältig durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 100 µm gedrückt. Zum Nachspülen wurde die übrige RPMI/DNase-Lösung verwendet, sodass das gesiebte Gewebe danach in 50 ml Flüssigkeit vorlag. Bei 301 g erfolgte nun eine Zentrifugierung dieser Lösung. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Zellpellet RPMI auf 3 ml Gesamtmenge aufgefüllt.

Für die Quantifizierung und Differenzierung von Leukozyten im Blut wurden 50 µl Vollblut in einem Trucountröhrchen mit den jeweiligen Antikörpern (CD3 FITC/ GR-1 PE/ CD45 PerCP/ CD19 APC) für 20 min inkubiert. Die Antikörperbindungen wurden mit BD-Lyse fixiert und die Zellen im Anschluss im Durchflusszytometer analysiert.



**Abb. 2**

**Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung pulmonaler Leukozyten mittels Durchflusszytometrie:** (A) Untersuchung der Gesamtleukozyten nach ihren Eigenschaften in der Seitwärtsstreuung (Side-Scatter – SSC) und in der Vorwärtsstreuung (Forward-Scatter – FSC). Der Auswahlbereich „R1“ wird in (B) weiter nach den Eigenschaften in SSC und dem Oberflächenantigen CD45 (PerCP) differenziert. Der Bereich „R2“ wird in (C) weiter nach den Oberflächenantigenen F4-80 und GR-1 differenziert. „R3“ beinhaltet die Lymphozytenpopulation, „R5“ die Population der Alveolarmakrophagen. Der Bereich „R4“ wird wiederum in (D) weiter nach Eigenschaften in der SSC und dem Oberflächenantigen F4-80 differenziert, wobei „R6“ die Gr-1<sup>high</sup>-Monozyten-Population und „R7“ die Polymorphen Granulozyten (PMN) darstellt.



**Abb. 3**  
**Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung von Leukozyten im Blut mittels Durchflusszytometrie:**

Quantifizierung und Differenzierung von Leukozyten im Blut nach o.g. Verfahren. **(A)** Untersuchung der Gesamtzellen nach ihren Eigenschaften in der Seitwärtsstreuung (Side-Scatter – SSC) und in der Vorwärtsstreuung (Forward-Scatter – FSC). In **(B)** werden Zellen nach ihren Eigenschaften im SSC und dem Oberflächenantigen CD45 differenziert. Der Auswahlbereich „R2“ in **(B)** wird in **(E)** weiter nach den Eigenschaften in SSC und dem GR1 differenziert. Der Auswahlbereich „R3“ beinhaltet dabei alle Leukozyten. Diese werden in **(D)** auch nach SSC und GR-1 differenziert. Der Auswahlbereich „R4“ beinhaltet dabei die Lymphozyten, „R5“ die Gr-1<sup>high</sup>-Monozyten-Population und „R6“ die Polymorphen Neutrophilen Granulozyten (PMN). In **(C)** werden die verwendeten Kügelchen in R1 gated (Beads).

#### 4.2.6 Quantifizierung von Zytokinen in Lungengewebe und Blut

Die quantitative Analyse der Zytokine in Lungenhomogenat und Blut erfolgte mittels Multiplex-ELISA-Assay. Der Multiplex-ELISA-Assay ermöglicht die Bestimmung und Quantifizierung mehrerer Zytokine in einem Messverfahren. Antikörper sind an Polystyrenkügelchen (Beads) gekoppelt und anhand der unterschiedlichen Fluoreszenz der Beads können die jeweiligen Zytokine/Chemokine im „Bio-Plex Array Reader“ simultan identifiziert werden. Ein zweiter Antikörper ermöglicht die Quantifizierung der jeweiligen Zytokine. Streptavidin-gekoppeltes Phycoerythrin (PE) dient als Färbemittel. Durch Vergleich der Intensität der Fluoreszenz des Fluorchromes PE lässt sich die Konzentration des vorhandenen Zytokins/Chemokins ableiten. Es werden zwei Laser

zur Messung verwendet. Ein grüner Laser (525 nm) misst die PE-vermittelte Emission, ein roter Laser (635 nm) die verschiedenen Beads.

Es wurden folgende Zytokine in der Lunge bestimmt: Interleukin-1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-6, Keratinozyten-abgeleitetes Zytokin (keratinocyte-derived cytokine – KC) und IL-10. Im Plasma wurden IL-6, KC und IL-10 bestimmt.

Für die Analyse mussten die Lungen zuvor homogenisiert werden. Hierzu wurden die gefrorenen Lungenproben in einem mit Keramikkügelchen gefüllten Eppendorf-Tube bei 300 U/min für 30 sek zentrifugiert (FastPrep®-Zentrifuge). Hierbei erfolgt die Zerkleinerung des Gewebes mit Entfernung des zellulären Anteils. Anschließend wurde die Konzentrationsbestimmung des Proteinanteils nach Bradford durchgeführt.

### **Durchführung**

Die Durchführung der Zytokinbestimmung erfolgte nach Herstelleranleitung (Bio-Plex™ Cytokine Assay). Zuerst wurden die Zytokinstandards für 2 bis 3 Minuten durchmischt und danach in 50  $\mu$ l sterilem Aqua dest. aufgelöst. Nach 30-minütiger Lagerung auf Eis wurden 450  $\mu$ l Standard Diluent hinzugefügt. Für eine Standardkurve wurde die im Kit enthaltene Stocklösung (500 ng/ml) in Standard Diluent auf folgende Konzentrationen verdünnt: 32.000 pg/ml; 16.000 pg/ml; 8.000 pg/ml; 2.000 pg/ml; 500 pg/ml; 125 pg/ml; 31,5 pg/ml; 7,8 pg/ml und 1,95 pg/ml.

Die Serumproben wurden mit Serum Diluent und die Lungenhomogenat-Proben mit Sample Diluent so lange verdünnt, bis ein Proteingehalt von 100  $\mu$ g/ $\mu$ l erreicht war.

Eine Bio-Plex™ flat-bottom Platte mit 96 Vertiefungen wurde jeweils mit 100  $\mu$ l Assay Buffer A befüllt. Anschließend wurde mittels Vakuumsauggerät bei einem Sog von 1-2 mmHg die Flüssigkeit durch einen Filter am Grund abgesaugt. Danach wurde für 3 Minuten die Partikellösung aufgeschüttelt. Die Menge von 240  $\mu$ l der Lösungen wurden mit 5760  $\mu$ l des Assay Buffer A gemischt, 50  $\mu$ l wurden in jede Vertiefung (Well) gefüllt. Im Anschluss erfolgten zwei Waschungen mit jeweils 100  $\mu$ l Wash Buffer A. Im nächsten Schritt wurden in jedes Well 50  $\mu$ l der Standardverdünnung und 50  $\mu$ l der Probe gegeben, wobei unbehandeltes Medium als Negativkontrolle diente. Nach Abdecken der Platte mit Alufolie inkubierte diese zunächst bei Raumtemperatur für eine Minute bei 1000 Umdrehungen pro Minute und danach für 90 Minuten bei 300 U/min

auf einer Rüttelplatte. Es folgte ein erneutes dreimaliges Waschen mit 100 µl Wash Buffer A. In 288 µl Antibody Diluent wurde der Zytokindetektionsantikörperansatz gelöst, wovon dann 25 µl pro Well hinzugefügt wurden. Nach einer erneuten Inkubation und anschließenden Waschung wurden Streptavidin-PE im Verhältnis 1:100 mit Assay Buffer A verdünnt und jeweils 50 µl pro Well zugefügt. Es erfolgte eine erneute Inkubation für 10-30 Minuten mit anschließender Waschung. Danach wurde ein weiteres Mal 125 µl Assay Buffer A hinzugefügt, wonach die Proben im Kühlschrank aufbewahrt werden konnten. Vor der Messung erfolgte eine 30-sekündige Schüttelung bei 1100 U/min.

### **Auswertung**

Anhand der Standardkurven der Zytokine wurde die jeweilige Zytokinkonzentration in den Proben ermittelt.

### **4.2.7 Bakterienlast**

BALF-, Milz- und Blutproben wurden auf Columbia-Blutagarplatten aufgetragen und bei 37 °C mit 5 % Vol. CO<sub>2</sub> für 24 Stunden inkubiert, um danach die Kolonie-bildenden Einheiten – KbE auszuzählen. Das Milzgewebe wurde in PBS gelegt, für den Versuch zuvor durch einen Zellsieb mit 100 µm Porengröße gedrückt und mit PBS ausgespült, sodass am Ende eine Suspension in 20 ml PBS vorlag. 10 µl der Suspension wurden auf die Blutagarplatte aufgetragen und ausgestrichen

### **4.2.8 Untersuchung der pulmonalen Genexpression von AM und seinen Rezeptorkomponenten**

#### **4.2.8.1 Isolierung der RNA aus Mauslungen**

Mit PBS blutfrei perfundiertes, nicht lavagiertes Lungengewebe wurde nach Entnahme in Flüssigstickstoff schockgefroren.

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von RNeasy mini Kit nach Anleitung des Herstellers aus den Lungen isoliert. Um eine DNA-Kontamination zu beseitigen, wurden isolierte RNA-Proben mit einer Einheit (Unit – U) DNase/µg RNA für 15 min bei 37 °C inkubiert.

#### 4.2.8.2 Durchführung der Reversen Transkription

Für eine weitere Verarbeitung der isolierten Lungenproben in der quantitativen PCR musste die gewonnene RNA im nächsten Schritt in komplementäre DNA (*complementary* DNA, cDNA) transkribiert werden. Hierfür war eine RNA-abhängige DNA Polymerase (reverse Transkriptase) nötig. Diese synthetisiert ausgehend von der einzelsträngigen RNA zunächst einen RNA-DNA-Hybridstrang. Im weiteren Schritt wurde der RNA-Anteil von einer anderen Untereinheit desselben Enzyms mit Exoribonukleaseaktivität abgebaut.

Für die Umschreibung der RNA in cDNA wurde das Superscript H-reverse Transcriptase-Kit (200 U/ $\mu$ g RNA) der Firma Invitrogen GmbH gemäß Herstellerangaben verwendet.

Eine Menge von 2,5  $\mu$ g der RNA wurde in ein Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l versetzt, um cDNA zu synthetisieren. Die Komponenten setzten sich aus 10  $\mu$ l des RNA-Primer-dNTPs und 10  $\mu$ l des Synthesemixes (siehe Tab. 3) zusammen. Es wurden dabei 50  $\mu$ M von oligo(dT) als Primer und 10 nM dNTP-Mix verwendet. Dieser Mix wurde im Anschluss bei 65 °C für 5 min inkubiert und direkt im Anschluss für mindestens 1 Minute auf Eis gelegt.

**Tab. 3**  
**Zusammensetzung des Synthese-Mixes für die reverse Transkription der RNA in cDNA**

RNaseOUT <sup>TM</sup> (40 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4 $\mu$ l
10x RT Puffer	2 $\mu$ l
0,1 M DTT	2 $\mu$ l
Super Script III Reverse Transcriptase	1 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen pro Reaktionsansatz:</b>	<b>10 <math>\mu</math>l</b>

(DTT – DL-Dithiothreitol)

Der Mix aus cDNA Synthese-Mix und RNA-Primer-dNTP wurde kurz zentrifugiert und im Anschluss erfolgte die Reaktion der reversen Transkription der Proben in einem Thermocycler über 50 min bei 42 °C. In der terminalen Reaktion wurden die Proben zur Enzyminaktivierung bei 85 °C für 5 min erhitzt. Nach kurzer Zentrifugierung wurde zu

jeder Probe anschließend 1 µl des RNase H hinzugefügt und für 20 min bei 37 °C inkubiert, um die noch vorhandene RNA zu deaktivieren.

Die cDNA wurde im Thermocycler bis zur Entnahme bei 4 °C aufbewahrt, falls die PCR unmittelbar erfolgte. Ansonsten konnten die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert werden.

#### 4.2.8.3 Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR

Ausgehend von der nun vorliegenden cDNA erfolgte die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Es wurde die Expression der Gene *mouse AM*, *mouse CRLR*, *mouse RAMP1*, *mouse RAMP2* und *mouse RAMP3* untersucht.

Die qRT-qPCR wurde mit dem I-Cycler IQ detection system in Kombination mit dem IQ SYBR Green Real-Time PCR Supermix durchgeführt.

**Tab. 4**  
**Zusammensetzung des Master Mixes für die quantitative Real-Time-PCR**

IQ SYBR Green supermix	10 µl
Primer	300 nM
cDNA	100 ng – 100 fg
DNase freies Wasser	Zum Endvolumen von 20 µl aufgefüllt
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>

Nach dem Auftauen des Supermixes auf Raumtemperatur wurde dieser vorsichtig durchgemengt und zunächst auf Eis und im Dunkeln gelagert. Danach wurde ein Master-Mix für die Reaktionen nach der o.g. Tabelle angefertigt. In jedes qPCR-Röhrchen wurden gleiche Mengen des Supermixes aliquotiert. Im nächsten Schritt wurden den Röhrchen DNA-Proben hinzugefügt und diese mit DNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Als nächstes wurden die Röhrchen versiegelt und für mindestens 30 Sekunden gevortext, damit sich alle Komponenten gleichmäßig verteilen.

Die PCR wurde mit folgendem Protokoll durchgeführt: Initiale Denaturierung in einem Zyklus von 10 min bei 95 °C gefolgt von 40 Zyklen von je 20 Sekunden bei 95 °C, 20 Sekunden bei 60 °C und 20 Sekunden bei 72 °C.

Zur relativen Quantifizierung der Genexpression wurde die delta-delta-CT-Methode verwendet. Hierbei wird zunächst die Expression des Targetgens (Gene of Interest; GOI) auf die Expression eines nicht regulierten Referenzgens (Housekeeping Gene; HKG) bezogen und so für jede Probe der delta-CT-Wert gebildet (siehe Formel 1). Der sogenannte „cycle threshold“ (CT) gibt dabei die Zyklusanzahl an, bei der das Fluoreszenzsignal einen festgelegten Schwellenwert überschreitet.

Formel 1:  $\Delta CT = CT_{GOI} - CT_{HKG}$ .

Als Targetgene wurden AM, CRLR und RAMP-1 bis RAMP3 untersucht.  $\beta$ -Aktin diente als Referenzgen.

Im zweiten Schritt wurde aus den delta-CT-Werten der Versuchs- und Kontrollgruppen der delta-delta-CT-Wert gebildet (siehe Formel 2). Um den Expressionsunterschied zwischen zwei Gruppen (Ratio) zu ermitteln, wurde dieser delta-delta-CT-Wert dann in die nachfolgende Formel (Formel 3) eingesetzt.

Formel 2:  $\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Versuchsgruppe} - \Delta CT \text{ Kontrollgruppe}$

Formel 3:  $\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta CT}$

Als Versuchsgruppen wurden jeweils die Gruppen *S.p.*, 6h vent. und *S.p.* + 6h vent. gewählt, während die native Gruppe ohne Infektion und Beatmung als Kontrollgruppe diente.

**Tab. 5****Primer Sequenzen der quantitativen real-time Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)** $\beta$ -Aktin diente als Haushaltsgen (Housekeeping Gene – HKG).

<b>Gen</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Produkt (Basenpaare)</b>
AM	Forward GAAGCCCACATTCGTGTCA Reverse TGCCGTCCTTGTCTTTGTC	138 bp (434-572)
$\beta$ -Aktin	Forward GTGGGAATGGGTCAGAAGG Reverse GGCATACAGGGACAGCACA	299 bp (212-511)
CRLR	Forward GCAGGACCCCATTCACA Reverse GGATGCCGAAACCAGTGT	185 bp (169-345)
RAMP1	Forward ATGGTGTGACTGGGGAAAGA Reverse CAATGAAAGGGCAGAGGATG	205 bp (205-410)
RAMP2	Forward TCCCTGAACCAATCTCTTCC Reverse GTCGCTGTAATGCCTGCTAA	185 bp (260-445)
RAMP3	Forward GCAACGAGACAGGGATGC Reverse GCCACAGTCAGCACGACA	312 bp (116-428)

(AM, Adrenomedullin; RAMP, Receptor-activity modifying protein; G, Guanin; A, Adenin; C, Cytosin; T, Thymin)

**4.2.9 Untersuchung der hypoxischem Vasokonstriktion in Precision cut lung slices**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation euthanasiert, das Blut durch Infusion mit Hepes-Ringer-Lösung, 250 IU/ml Heparin und 75  $\mu$ M Nipruss mit einer Temperatur von 37 °C über den rechten Ventrikel aus dem Gefäßsystem der Lunge gespült. Im Anschluss wurden die Luftwege mit 1,5%iger Agarose mit niedrigem Schmelzpunkt („low melting point agarose“) gefüllt. Diese Agarose war 30 min zuvor durch kurzes Aufkochen in der Mikrowelle in Ringer-Lösung gelöst worden und dann in einem Wärmeschrank auf 37 °C heruntergekühlt. Für das Befüllen der Lungen wurden die Speicheldrüsen und die kleinen infrahyalen Muskeln im ventralen Bereich der Trachea entfernt, ein etwa 10 cm langer Zwirnfaden zwischen Ösophagus und Trachea platziert und mit einer kleinen Schere zwischen zwei benachbarten Knorpelspangen ein kleines Loch in die Luftröhre gesetzt. Durch dieses kleine Loch erfolgte die Applikation der flüssigen Agarose bis sich beide Lungen wieder bis zu einem der *in vivo* Situation ähnlichen Volumen ausgedehnt hatten.

Die Lungen und das Herz wurden nach Abtrennung der Trachea kranial der Ligatur in einem Stück entnommen und in eine eiskalte Vollelektrolytlösung gelegt, welches zu einer Aushärtung der Agarose führte. Im Anschluss wurden die einzelnen Lungenlappen voneinander getrennt und mittels Sekundenkleber auf dem Probenhalter

eines sog. Vibratoms fixiert. Jetzt konnte das Schneiden der Lungen mit dem Vibratom in 200 µm dicke Scheiben erfolgen (Einstellungen: Geschwindigkeit 12 = 1,2 mm/sek Frequenz 100/min; Amplitude 1,0).

Durch Inkubation der PCLS in phenolrot-freiem Minimalmedium (minimal essential medium - MEM) wurde die Agarose entfernt. Dabei wurden die Präparate kontinuierlich mit 21 % Vol. O<sub>2</sub>, 5 % Vol. CO<sub>2</sub> und 74 % Vol. N<sub>2</sub> für mindestens 2 Stunden bei 37 °C begast.

### **Videomorphometrie**

Um die Vasoreaktivität der einzelnen intra-azinären Arterien mit einem minimalen inneren Durchmesser von 40 µm zu analysieren, wurden PCLS in eine Durchflussskammer (engl. flow-through superfusion chamber) gelegt. Diese Kammer war auf einem mit einer Kamera ausgestatteten Mikroskop fixiert. Die Schnitte wurden dabei an Nylon-Fäden fixiert. Prä-azinäre Gefäße mit Innendurchmessern von >40 µm verlaufen in der Nachbarschaft von Bronchien und Brochiolen, die kleinen, intra-azinären Arterien mit Innendurchmessern von ≤ 40 µm sind an den Alveolarsepten aufgespannt.

Jeweils zu Beginn des Versuchs erfolgte die Bestimmung des Innendurchmessers der Arterie. Während einer „Anpassungsphase“ wurde die Perfusionskammer („flow-through superfusion chamber“) mit normoxisch begastem Medium durchspült (Flussrate: 0,7 ml/min; 10 min). Anschließend wurde durch eine Inkubation der Lungenschnitte mit 0,1 µM U46619 (kein Fluss; 10 min) die Viabilität der Gefäße überprüft. Nach dem Herauswaschen des U46619 mit normoxisch begastem Medium (Flussrate: 6 ml/min; 10 min) erfolgte eine Dilatation der Arterie durch Zugabe des NO-Donators Nipruss (Endkonzentration 25 µM; kein Fluss; 10 min). Wiederum wurde die Substanz mit normoxisch begastem Medium (zunächst Flussrate: 6 ml/min; 10 min; anschließend 0,7 ml/min; 10 min) herausgewaschen. Die hypoxische Vasokonstriktion (HPV) wurde durch Zugabe von hypoxisch vorbegastem Medium (1 % O<sub>2</sub>, 5,3 % CO<sub>2</sub>, 93,7 % N<sub>2</sub>) induziert (Flussrate: 0.7 ml/min; 40 min). Durch ein zusätzliches Schlauchsystem wurde auch in den Luftraum der Perfusionskammer das hypoxische Gasgemisch eingeleitet. Um den Einfluss von AM auf die HPV zu untersuchen, wurden dies 15 min nach Beginn der „hypoxischen Phase“ dem Medium zugesetzt. AM wurde mit Endkonzentrationen von jeweils 500 nM verwendet. Den Kontroll-Inkubationen wurde das entsprechende

Volumen des Lösungsmittels (H<sub>2</sub>O) zugesetzt. Nach 40 min wurde die Perfusionskammer mit normoxisch begastem Medium gespült (6 ml/min; 20 min) und anschließend der Lungenschnitt mit 0,01 µM U46619 ohne oder mit 500 nM AM (kein Fluss; 20 min) inkubiert. Während des gesamten Versuchs wurde alle 2 Minuten mittels der auf dem Mikroskop montierten Kamera ein Foto aufgenommen.

### **Quantifizierung der Vasoreaktivität**

Veränderungen der luminalen Fläche der Gefäße über die Zeit wurden als Maß der Vasoreaktivität quantifiziert. Eine Veränderung der Fläche bedeutete Dilatation bzw. Kontraktion des Gefäßes. Die Größe der luminalen Fläche zu Beginn des Experiments wurde als 100 % definiert und Veränderungen dieser Fläche über die Zeit als relative Werte ausgedrückt.

Um mehrere Experimente zusammenzufassen, wurde für jeden Zeitpunkt aus den Werten der relativen luminalen Fläche der Mittelwert +/- Standardfehler (SEM) berechnet. Für eine graphische Darstellung der Ergebnisse wurden diese Werte gegen die Zeit aufgetragen.

#### **4.2.10 Immunhistochemische Darstellung der Expression von Adrenomedullin im Lungengewebe**

Für die Immunhistochemie wurden die Lungen samt Trachealtubus entnommen, mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) in Phosphatpuffer transtracheal gespült und anschließend in einem Bad aus diesen Komponenten bei Raumtemperatur über 12 Stunden fixiert.

Anschließend wurden die Proben mehrere Male in 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen und dann über Nacht in 0,1 M Phosphatpuffer mit 18 % Saccharose inkubiert. Danach wurden die Lungen mit Tissue-Tek® O.C.T.™ bedeckt und auf Filterpapier im schmelzenden Isopentan schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80° C gelagert.

Mit einem Kryostaten (Leica CM 1900) wurden bei -20 °C 12 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Objektträger (SuperFrost Plus) aufgezogen. Diese Objektträger waren mit einer speziellen Adhäsionslösung beschichtet. Nach einer Trocknung von einer Stunde bei Raumtemperatur wurden die unspezifischen Proteinbindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in Schweineserum (10 %), Rinderserum (BSA) (0,1 %) und Tween 20 (0,5 %) in PBS geblockt.

Im nächsten Schritt erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht die Inkubation der Schnitte mit den primären Antikörpern (AM und CD31) beziehungsweise dem biotinylierten *Lycopersicon esculentum*-Lektin in entsprechender Verdünnung (siehe 4.1.9 „Immunhistochemie“).

Bei der Doppeldarstellung wurde der Primärantikörper CD31 mit Anti-CD31 aus Ratten zur gleichen Zeit aufgetragen. CD31 stellt einen endothelialen Zellmarker dar (149). Am Folgetag erfolgte für 10 min eine dreimalige Waschung der Schnitte in PBS und die Inkubation mit den Cy3-konjugierten sekundären Antikörpern beziehungsweise FITC-markierten Streptavidin (1:500) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Zur zusätzlichen Markierung der Zellkerne wurde zu den Sekundärreagenzien optional 0,4 µg/µl 4',6-Diamidino-6-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) hinzugefügt.

Als nächstes erfolgte erneut dreimalig ein zehnmütiges Waschen in PBS, woraufhin die Objektträger für zehn Minuten in 4 % PFA-Lösung getaucht wurden. Dadurch wurden die Bindungen zwischen primären und sekundären Antikörpern fixiert. Abschließend wurden die Objektträger erneut für zehn Minuten gewaschen, mit karbonatgepuffertem Glycerol (pH 8,6; siehe unten) bedeckt und bei 4 °C bis zur Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan 2) gelagert.

Es wurden Spezifitätskontrollen der Primärantikörper durch Präadsorption mit synthetischem Peptid (AM) in einer Konzentration von 2,5 µg/ml für eine Stunde bei Raumtemperatur durchgeführt. Ersatzweise für den Primärantikörper wurden monoklonale Isotypen der gleichen Spezies (für humane Antikörper gegen AM (Verdünnung 1:1600) sowie für den monoklonalen Ratten-CD31-Antikörper (1 µg/ml)) oder normales Kaninchenserum verwendet. Mögliche unspezifische Bindungen der Sekundärreagenzien wurden durch deren Applikation ohne vorherige Primärreagenzien getestet.

### **Gepuffertes Glycerol**

Glycerol wurde mit Puffer (50 ml 0,5 M Natriumhydrogencarbonatlösung, mit 0,5 M Dinatriumcarbonat) auf pH 8,6 eingestellt und im Verhältnis 2:1 gemischt.

#### **Paraformaldehyd (PFA) 4 % in 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2-7,4**

40 g PFA in 500 ml destilliertem H<sub>2</sub>O wurden langsam auf 70 °C erhitzt und im Anschluss mit einigen Tropfen 2 M NaOH zu einer klaren Lösung vermengt. Nach Erkalten wurden 500 ml 0,2 M Phosphatpuffer dazugegeben und der pH auf 7,4 eingestellt.

#### **4.2.11 Kreatinin, AST, ALT, NGAL**

Mit gängigen Methoden wurden im Zentrallabor der Charité – Universitätsmedizin Berlin Plasma-Spiegel von Kreatinin, Aspartat-Aminotransferase (AST) und Alanin-Aminotransferase (ALT) bestimmt. Im über die letzten zwei Stunden des Versuches gesammelten Urin wurde die Konzentration von Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), einem frühen Biomarker für renale Tubulusschädigung, mittels ELISA nach Herstellerangaben (BioPorto) gemessen.

#### **4.2.12 Histologie und Apoptose**

Es wurden Gewebeschnitte (Ileum und Leber) aus allen Gruppen gleichzeitig verarbeitet und die mikroskopischen Aufnahmen mit gleicher Belichtungszeit angefertigt.

Die Untersuchung der Apoptose erfolgte mittels cleaved Caspase 3 (CC3), eines Spaltproduktes der Caspase 3 (150). CC3 gilt als ein Indikator für programmierten Zelltod. Hierfür wurden Paraffinschnitte über Nacht mit einem polyklonalen Anti-CC3-Antikörper bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Sekundärantikörper mit 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) diente als Chromogen. Apoptotische Zellen stellten sich mit einer Braunfärbung dar. Die Gegenfärbung der Schnitte erfolgte mit Hämatoxylin.

Als Positivkontrolle diente Thymusgewebe, da dort Apoptose physiologisch auftritt.

#### 4.2.13 Datenanalyse

Die Daten zur pulmonalen Expression von Adrenomedullin und seinen Rezeptorkomponenten sowie zum Bakterienwachstum wurden als Boxplots dargestellt, wobei die Länge der Box dem Interquartilsabstand (25%-75% Quartil) entspricht und der Querstrich den Median markiert. Die sogenannten oberen und unteren „Whisker“ stellen die Verteilung im oberen und unteren Quartil mit jeweils dem Maximum und Minimum als Endpunkt dar.

Außerdem wurden Daten als Säulendiagramme dargestellt. Hierbei erfolgte zusätzlich die Darstellung der Daten als arithmetischer Mittelwert und Streuung des Standardfehlers (Standard error of mean – SEM). Um die Gruppen zu vergleichen, wurde der Mann-Whitney U-Test verwendet. p-Werte von  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant definiert. Für den Vergleich der Versuchsgruppen der PCLS-Experimente wurde die Fläche unter der Kurve jeder Phase jedes einzelnen Experimentes berechnet. Ein Vergleich zwischen den Gruppen wurde für jede Phase erneut mit dem Mann-Whitney-U-Test bestimmt. p-Werte von  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant definiert. Als Statistikprogramm diente Prism (Version 4, GraphPad Software, Inc, LaJolla, CA, USA).

## 5 Ergebnisbeschreibung

### 5.1 Pulmonale Expression von Adrenomedullin und seinen Rezeptorkomponenten unter maschineller Beatmung bei Pneumonie

Pneumonie und Beatmung führten jeweils zu einer erhöhten pulmonalen Expression von AM. Die Kombination von Beatmung und Pneumonie zeigte keinen additiven Effekt auf die Expression von AM (Abb. 4A).

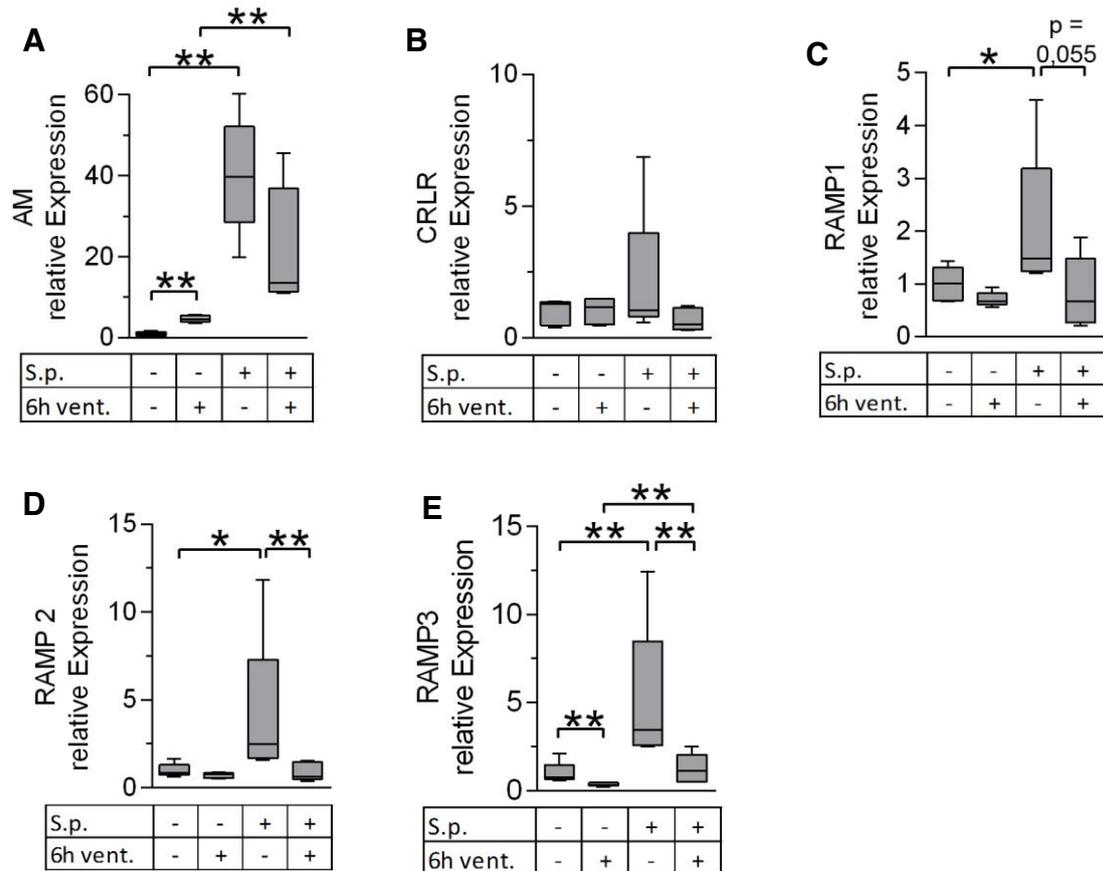
Mittels qRT-PCR wurde die Regulation der Expression der Komponenten des AM-Rezeptorkomplexes aus CRLR (Calcitonin receptor-like receptor) und RAMP (Receptor-activity modifying protein) 1-3 untersucht. Weder Beatmung noch Pneumonie oder die Kombination von beiden hatten einen Einfluss auf die Expression von CRLR. Bei infizierten, nicht beatmeten Tieren zeigte sich eine Hochregulation der Expression von RAMP1-3, wohingegen sich bei nicht-infizierten, beatmeten Tieren eher eine geringere oder unveränderte Expression im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte. Bemerkenswert war, dass die durch Pneumonie-induzierte Hochregulation der RAMP2- und RAMP3-Expression nach Beatmung wieder aufgehoben war (Abb. 4B – E).

Die Lokalisation von AM in der Lunge wurde mittels Immunfluoreszenztechnik untersucht. Im Lungengewebe war AM hauptsächlich in Alveolarmakrophagen und im Lungenendothel zu detektieren. Letzteres konnte durch eine Doppelfärbung von AM und dem endothelialen Marker CD31 gezeigt werden (Abb. 5).

Analog zur mRNA-Expression zeigte sich auch eine vermehrte AM-Protein-Expression im Lungenparenchym unter Beatmung. Bei Tieren mit Pneumonie zeigten sich die zellulären Infiltrate stark positiv für AM. Insbesondere rekrutierte Leukozyten zeigten eine deutliche Immunreaktivität (Abb. 6).

Die Immunfärbung von AM in den Infiltraten von Mäusen mit Pneumonie und Beatmung zeigte ein ähnliches Muster wie die Immunfluoreszenz bei den Tieren, welche nur infiziert und nicht beatmet worden waren.

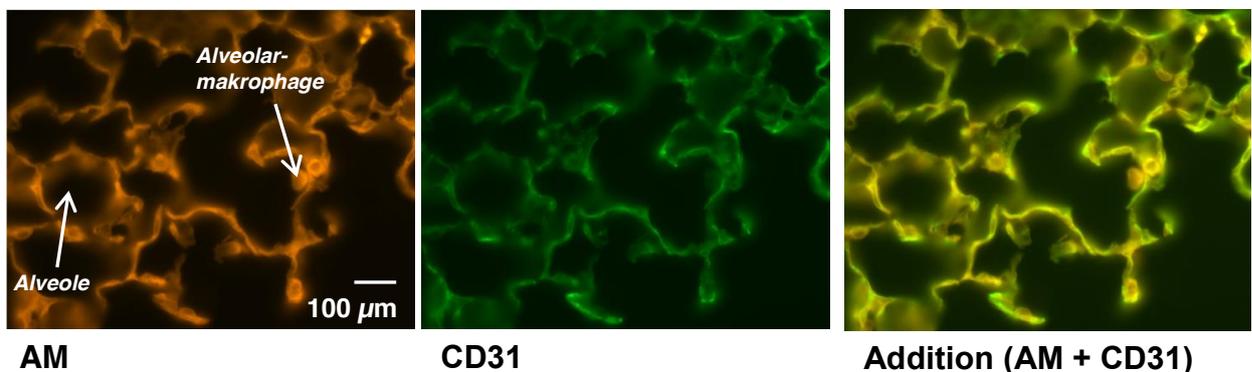
Die Spezifität des verwendeten Antikörpers für AM wurde durch Präadsorptionsexperimente bestätigt (Abb. 7).



**Abb. 4**

**Regulation der Expression von Adrenomedullin (AM) und seinen Rezeptorkomponenten unter Beatmung bei Pneumonie.**

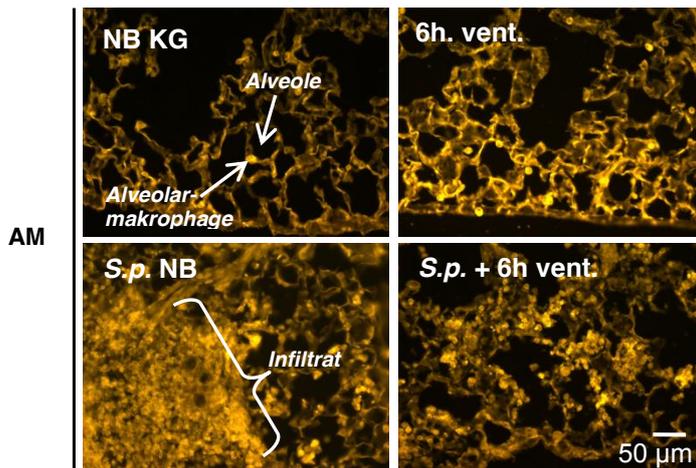
C57Bl/6N Mäuse wurden mit  $5 \times 10^6$  KbE *Streptococcus pneumoniae* (S.p.) oder PBS (Kontrolle) transnasal infiziert und 24h post infectionem (p.i.) für 6h beatmet (6h vent.). Nicht beatmete Mäuse wurden 30h p.i. euthanasiert. Die pulmonale Expression von AM (A) und seinen Rezeptorkomponenten calcitonin receptor-like receptor (CRLR) (B) sowie receptor activity-modifying protein 1-3 (RAMP1-3) (C-E) wurden mittels quantitativer Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) bestimmt. Die Daten sind als Boxplots mit Median, 25/75 Perzentilen und unterer/ oberer Whisker (Minimum/ Maximum) dargestellt (\*p < 0,05, \*\* p < 0,01, n = 5).



**Abb. 5**

**Immunfluoreszenz-Markierung von Adrenomedullin (AM) und dem endothelialen Zellmarker CD31 im Lungenparenchym.**

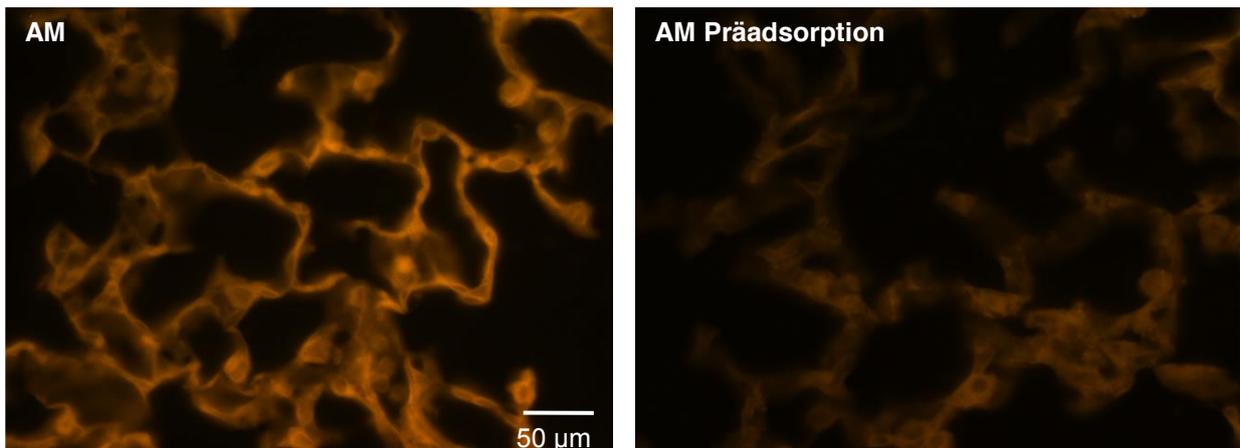
Es zeigte sich eine AM-Expression in Alveolarmakrophagen sowie im Lungenendothel, sichtbar durch Überlagerung beider Aufnahmen. Dargestellt sind Lungen gesunder, nicht behandelter Tiere. Der Maßstabsbalken ist gültig für alle Aufnahmen.



**Abb. 6**

**Expression von Adrenomedullin (AM) bei Pneumonie und unter Beatmung.**

C57Bl/6N Mäuse wurden mit  $5 \times 10^6$  KbE *Streptococcus pneumoniae* (S.p.) oder PBS (Kontrolle) transnasal infiziert und 24h *post infectionem* (p.i.) für 6h beatmet (6h vent.). Die Mäuse der nicht beatmeten Kontrollgruppe (NB KG) wurden 30h p.i. euthanasiert. Am Versuchsende wurden die Lungen für die Immunfluoreszenzmarkierung von AM entnommen und aufgearbeitet. Unter maschineller Beatmung zeigte sich eine stärkere Immunfärbung von AM im Gegensatz zur nicht beatmeten Kontrollgruppe. In pneumonischen Infiltraten zeigten sich Leukozyten in höherem Maße immunopositiv für AM. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von n=5 Tieren pro Gruppe. Der Maßstabsbalken ist gültig für alle Aufnahmen.



**Abb. 7**

**Spezifitätskontrolle des Antikörpers durch Präadsorption mit synthetischem Peptid Adrenomedullin (AM).**

Zur Validierung der Spezifität des verwendeten Antikörpers für Adrenomedullin (AM) in der Immunfluoreszenz im Lungengewebe erfolgte eine Präadsorption mit synthetischem AM. Der Maßstabsbalken ist gültig für alle Aufnahmen.

## 5.2 Lungenschaden bei Pneumonie: Exazerbation durch Beatmung und Schutz durch Adrenomedullin

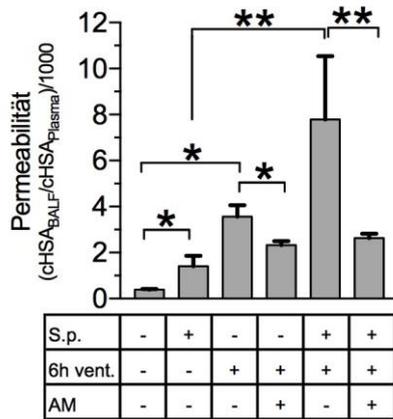
Der zentrale Pathomechanismus des ARDS ist die erhöhte pulmonalvaskuläre Permeabilität, die zur Bildung eines Lungenödems und Einschränkung des Gasaustausches führt.

Pneumonie sowie auch Beatmung allein führten zu einer erhöhten HSA BALF/Plasma-Ratio als Maß für die Permeabilität der alveolokapillären Barriere. Die Applikation von AM reduzierte die Permeabilität unter Beatmung. Mäuse mit Pneumonie, die zusätzlich künstlich beatmet wurden, zeigten einen weiteren Anstieg der alveolokapillären Permeabilität, der durch Behandlung mit AM deutlich abgeschwächt werden konnte (Abb. 8A).

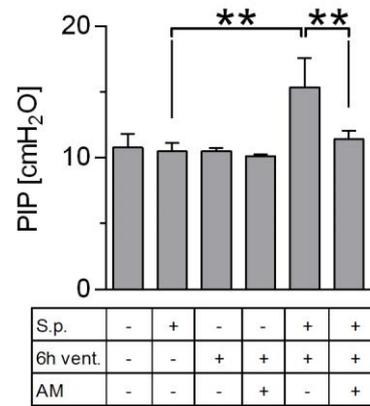
Unter volumenkontrollierter Beatmung spiegelte ein Anstieg des maximalen inspiratorischen Atemwegsdruckes (Peak inspiratory pressure – PIP) eine Reduktion der Lungen-Dehnbarkeit (Lungen-Compliance) wider. Ursächlich für den Abfall der Lungen-Compliance in dem verwendeten experimentellen Modell war primär das Permeabilitätsödem. Während Pneumonie und künstliche Beatmung jeweils allein im Vergleich zu gesunden Mäusen keinen Einfluss auf den PIP hatten, führte die Beatmung bei infizierten Mäusen (*S.p.* + 6h vent.) zu einem signifikanten Anstieg des PIP nach sechsstündiger Beatmung. Dieser PIP-Anstieg wurde durch die Therapie mit AM signifikant reduziert (Abb. 8B).

Während die Oxygenierung gemessen am arteriellen Sauerstoffpartialdruck weder durch Pneumonie noch Beatmung allein beeinflusst wurde, führte die Kombination von Pneumonie und Beatmung (*S.p.* + 6h vent.) zu einer schwerwiegenden Verschlechterung der Oxygenierung mit einem P/F-Quotienten (Quotient aus Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischem Sauerstoffanteil) von unter 200 mmHg. AM zeigte keinen Effekt auf den P/F-Quotienten (Abb. 8C).

Trotz der barriere-stabilisierenden Eigenschaften und der verbesserten Lungenmechanik zeigte die Behandlung mit AM keine Verbesserung der Oxygenierung. Vor diesem Hintergrund wurde der Effekt von AM auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion (HPV) untersucht. Der Thromboxanrezeptoragonist U46619, der auch vasokonstriktorisch wirkt, wurde als Positivkontrolle verwendet. In murinen Precision cut lung slices (PCLS) führte AM zu einer signifikanten Reduktion der HPV und U46619-induzierten Vasokonstriktion (Abb. 9).

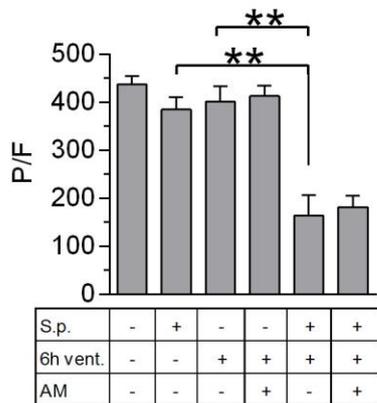


**A**



**B**

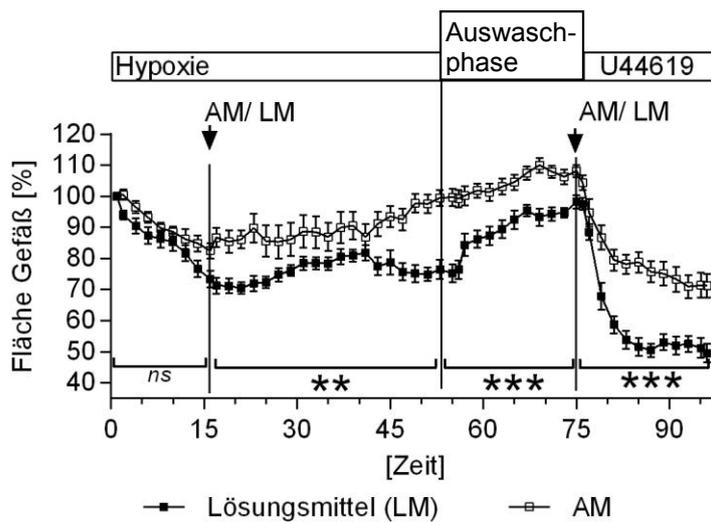
PIP (Peak inspiratory Pressure – Atemwegsspitzenruck)



**C**

**Abb. 8 Adrenomedullin schützte Mäuse mit Pneumonie vor beatmungs-induziertem Lungenschaden (VILI).**

Mäuse wurden 24 Stunden vor der sechsstündigen Beatmung (6h vent.) transnasal mit  $5 \times 10^6$  KbE *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*) infiziert, scheininfizierte Kontrollgruppen erhielten PBS. Nicht beatmete (NB) Mäuse wurden 30h p.i. euthanasiert. Mit dem Beginn der Beatmung wurde in entsprechenden Gruppen kontinuierlich Adrenomedullin (AM) infundiert (0,05 mg/kg/h). **(A)** Humanes Serumalbumin (HSA) wurde 90 Minuten vor dem Ende der Beatmung injiziert und die HSA-Konzentration (cHSA) im Plasma und in der Bronchoalveolären Lavageflüssigkeit (BALF) bestimmt. Der BALF/Plasma-Quotient diente als Marker von Lungenpermeabilität.  $n = 5$  (NB; 6h vent.; *S.p.* + 6h vent. + AM);  $n = 3$  (NB + *S.p.*);  $n = 4$  (6h vent. + AM);  $n = 7$  (6h vent. + *S.p.*). **(B)** Der maximale inspiratorische Atemwegsdruck (Peak inspiratory pressure, PIP) wurde nach sechsstündiger Beatmung nach einem Rekrutierungsmanöver bestimmt.  $n=5$  (NB; NB + *S.p.*);  $n=8$  (alle anderen Gruppen). **(C)** Der arterielle Sauerstoffpartialdruck wurde am Ende jeden Experimentes bestimmt und der Quotient aus Sauerstoffpartialdruck im Blut ( $\text{PaO}_2$  [mmHg]) und Fraktion des inspiratorischen Sauerstoffs ( $\text{FiO}_2$  [%]) (P/F-Quotient [mmHg]) berechnet.  $n=5$  (NB; NB + *S.p.*; 6h vent. + *S.p.*);  $n=6$  (6h vent.);  $n=7$  (6h vent. + AM);  $n=8$  (*S.p.* + 6h vent. + AM). Die Daten sind angegeben als MW und SEM (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

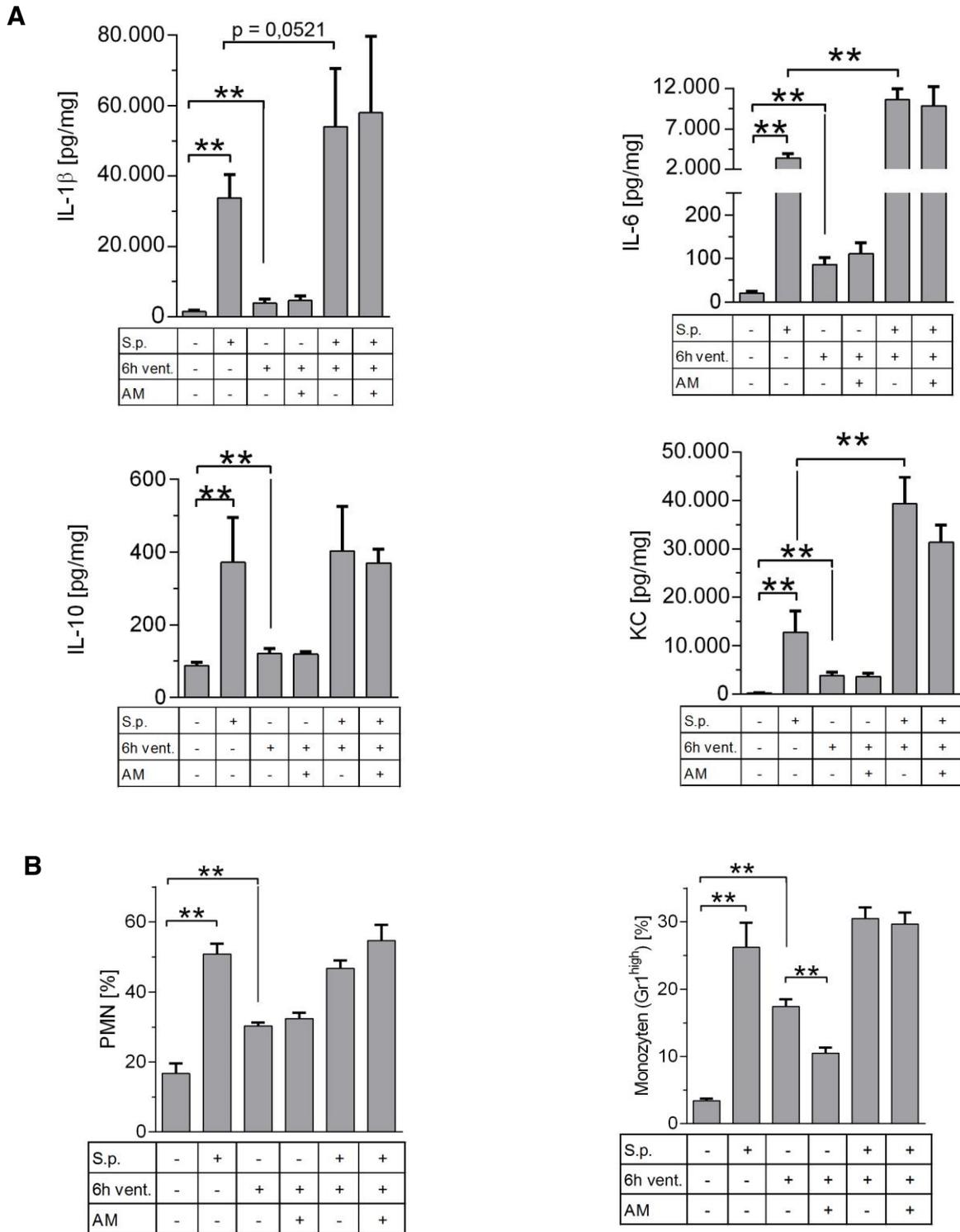


**Abb. 9**  
**Adrenomedullin reduzierte die Hypoxie- und U46619-induzierte Vasokonstriktion in Precision Cut Lung Slices.**  
 In Precision cut lung slices (PCLS) wurde eine Vasokonstriktion durch Hypoxie (Hypoxische pulmonale Vasokonstriktion) und durch den Thromboxanrezeptoragonisten U46619 in der Anwesenheit (AM) oder Abwesenheit (Lösungsmittel – LM) von AM (0,5 µM) induziert. Die luminale Fläche einzelner intra-azinärer pulmonaler Arterien wurde kontinuierlich durch Planimetrie gemessen und die Fläche unter der Kurve wurde für jedes Experiment berechnet. Die Daten sind angegeben als MW und SEM (ns, nicht signifikant; \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001; jeweils n = 10).

### **5.3 Beatmung erhöhte die Produktion von Entzündungsmediatoren bei Pneumonie**

Die Konzentration der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, KC und IL-10 im Lungenhomogenat wurde durch Pneumonie und Beatmung jeweils erhöht. Die Beatmung von Mäusen mit Pneumonie (*S.p.* + 6h vent.) führte zu einem weiteren deutlichen Anstieg der Spiegel von IL-1 $\beta$ , IL-6 und KC im Lungenhomogenat, während die IL-10 Konzentration unbeeinflusst blieb. Eine Behandlung mit AM hatte keine Auswirkung auf die analysierten Zytokin-Konzentrationen im Lungenhomogenat (Abb. 10A).

Aus dem Lungenhomogenat isolierte Leukozyten wurden in der Durchflusszytometrie differenziert. Die PMN (Polymorphe neutrophile Granulozyten) und Gr-1<sup>high</sup> Monozyten stiegen bei der Pneumonie (*S.p.*) und in geringerem Maße auch bei Beatmung (6h vent.) an. Die Kombination aus Beatmung und Pneumonie führte zu keiner weiteren Rekrutierung von PMN und Gr-1<sup>high</sup> Monozyten in die Lunge. AM verringerte bei nicht infizierten beatmeten Mäusen die Rekrutierung von Gr-1<sup>high</sup> Monozyten in die Lunge, jedoch nicht bei Mäusen mit Pneumonie und Beatmung (Abb. 10B).

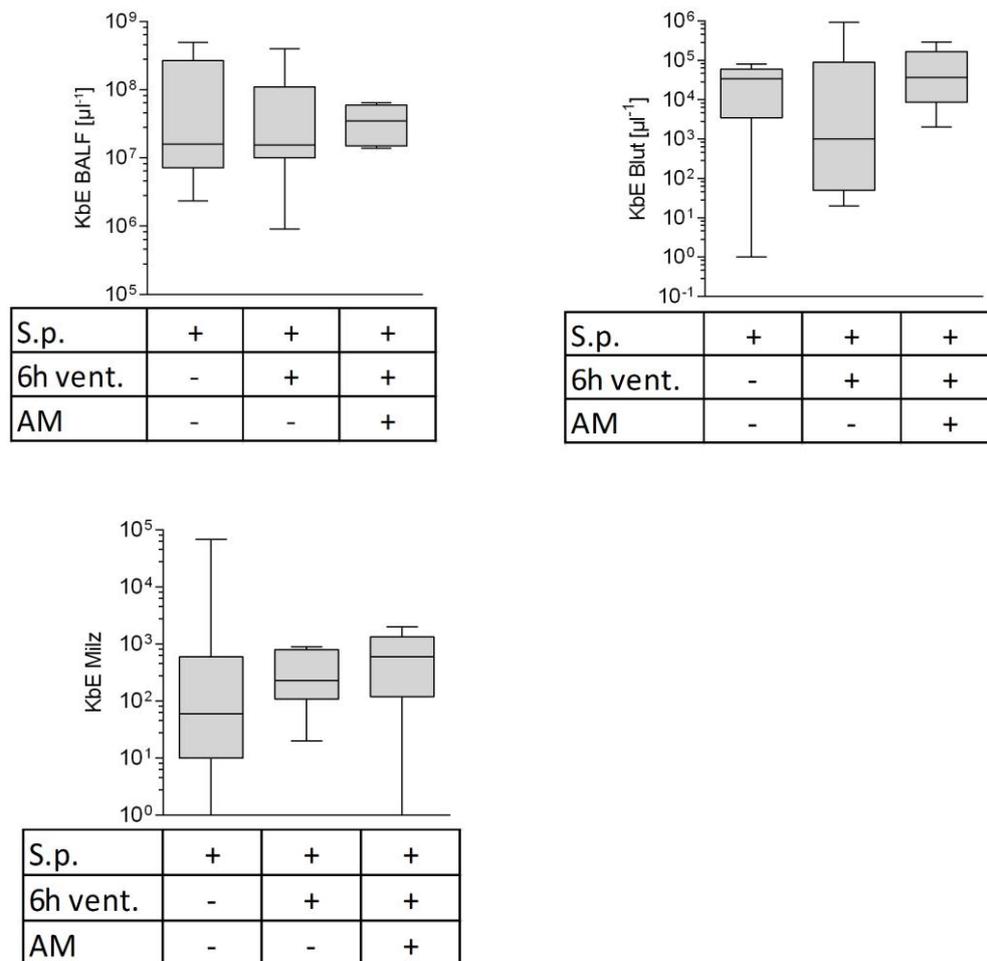


**Abb. 10**  
**Beatmung führte zu einer Erhöhung der pulmonalen Zytokinspiegel bei Pneumonie unabhängig von der Leukozytenzahl.**

Mäuse wurden 24 Stunden vor der sechsständigen Beatmung (6h vent.) transnasal mit  $5 \times 10^6$  KfE *Streptococcus pneumoniae* (S.p.) infiziert, scheininfizierte Kontrollgruppen erhielten PBS. Nicht beatmete Mäuse wurden 30h p.i. euthanasiert. Mit Beginn der Beatmung wurde in entsprechenden Gruppen kontinuierlich Adrenomedullin (AM) infundiert (0,05 mg/kg/h). **(A)** Zytokinspiegel von Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, Keratinozyten-abgeleitetes Zytokin (keratinocyte-derived cytokine – KC) und IL-10 wurden im Lungenhomogenat bestimmt. **(B)** Leukozyten wurden aus dem Lungenhomogenat isoliert, mittels Durchflusszytometrie differenziert und der prozentuale Anteil der polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) und der Monozyten an den Gesamtleukozyten bestimmt. Die Daten sind angegeben als MW und SEM; n = 6 (A), n = 5 (B); \*\* p < 0,01.

## 5.4 Beatmung hatte keinen Einfluss auf das pulmonale Bakterienwachstum und die Entwicklung einer Bakteriämie bei der Pneumonie

Es wurde die Bakterienlast in der BALF, im Blut und im Milzhomogenat bestimmt. Beatmung und AM hatten jeweils keine Auswirkung auf die pulmonale Bakterienlast, Bakteriämie oder die Absiedlung von Bakterien in die Milz bei der Pneumonie (Abb. 11).

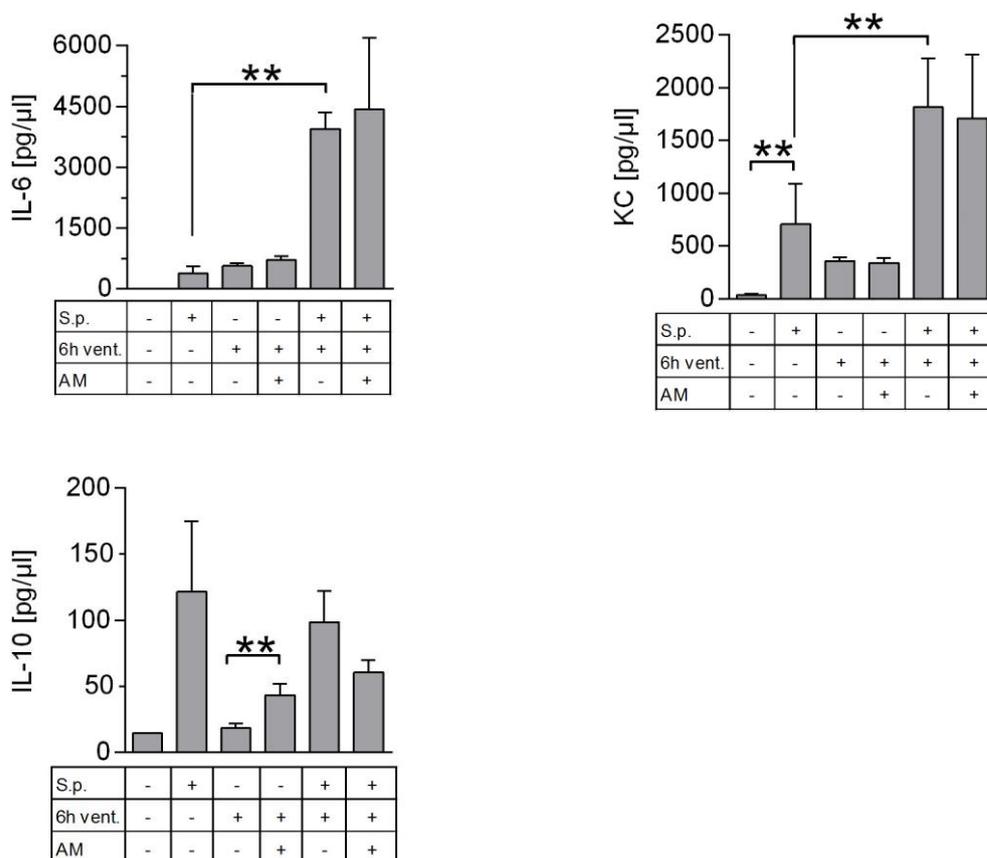


**Abb. 11**  
**Sechsstündige Beatmung hatte keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum und die systemische Bakterienverteilung.**

Mäuse wurden 24 Stunden vor der sechsstündigen Beatmung (6h vent.) mit  $5 \times 10^6$  KbE *Streptococcus pneumoniae* (S.p.) transnasal infiziert. Mit Beginn der Beatmung wurde in entsprechenden Gruppen kontinuierlich Adrenomedullin (AM) infundiert (0,05 mg/kg/h). Nicht-beatmete Tiere wurden 30 Stunden nach der Infektion euthanasiert. Verdünnungsreihen von Bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF), Milzhomogenat und Blut wurden auf Agarplatten ausgestrichen und Kolonie-bildende Einheiten (KbE) nach 24-stündiger Bebrütung ausgezählt. Das Milzgewebe lag in einer Suspension von 50  $\mu\text{l}$  PBS vor. Die Daten zeigen die KbE in der BALF, im Blut und in der gesamten Milz und sind als Boxplots mit Median, 25/75 Perzentilen und Whisker (Minimum/Maximum) dargestellt (n = 5-7).

## 5.5 Beatmung aggravierte die systemische Entzündungsreaktion bei Pneumonie

Pneumonie und Beatmung führten jeweils zu erhöhten Spiegeln von IL-6 und KC im Blut. Die Beatmung von Mäusen mit Pneumonie verursachte darüber hinaus einen weiteren deutlichen Anstieg der Spiegel von IL-6 und KC. In Mäusen mit Pneumonie zeigte sich ein deutlicher Anstieg der IL-10-Bloodspiegel, während Beatmung allein nur einen dezenten, statistisch nicht signifikanten Anstieg des IL-10 bedingte. Beatmung bei Pneumonie hatte keinen relevanten Einfluss auf die IL-10-Spiegel. Die Behandlung mit AM resultierte bei nur beatmeten Mäusen in höheren IL-10-Spiegeln. Darüber hinaus hatte AM keinen Einfluss auf die gemessenen Zytokinspiegel (Abb. 12).



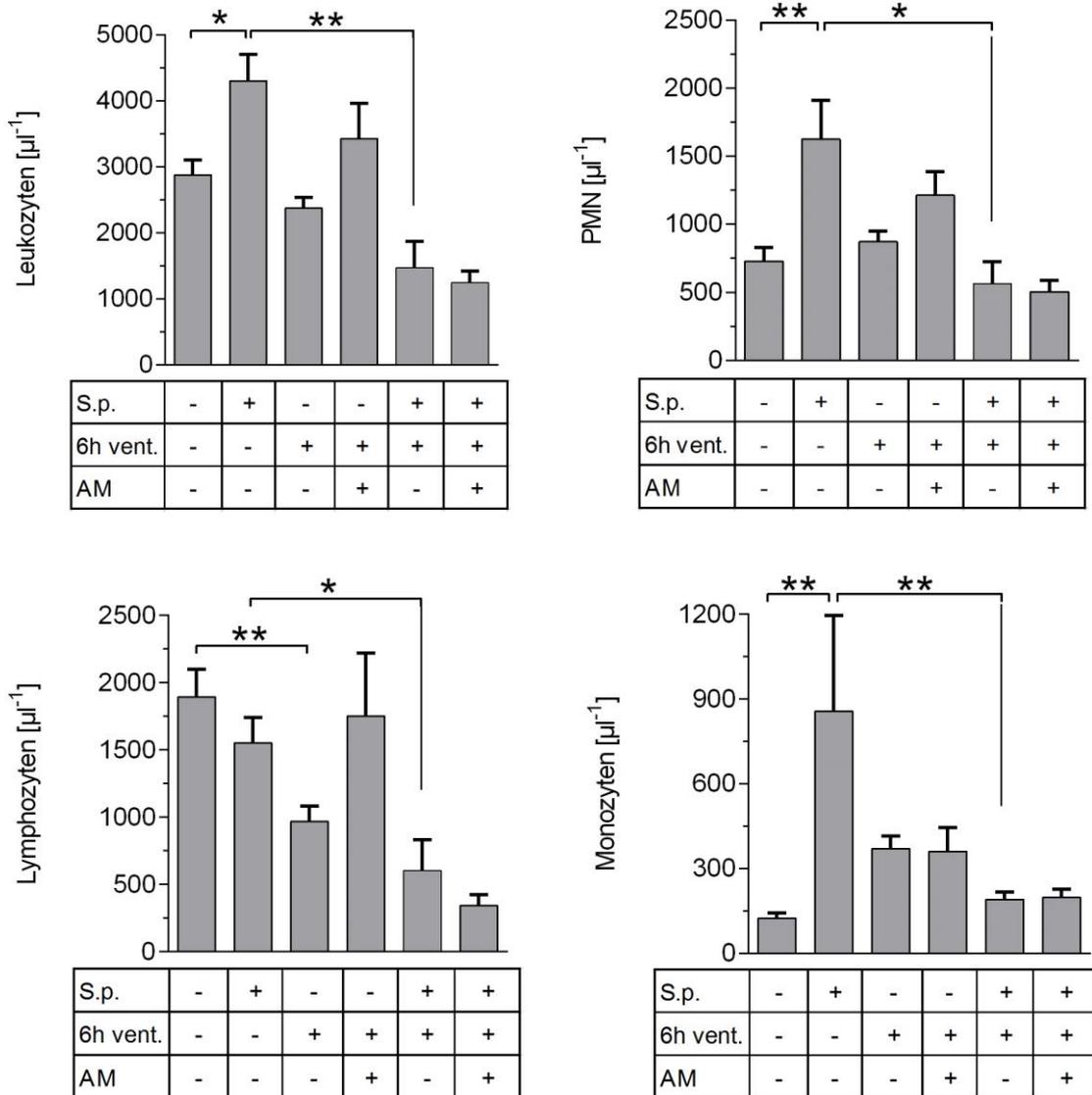
**Abb. 12**

### Sechsstündige Beatmung induzierte systemische Hyperinflammation bei Pneumonie.

Mäuse wurden mit  $5 \times 10^6$  KBE *Streptococcus pneumoniae* (S.p.) 24 Stunden vor der sechsstündigen Beatmung (6h vent.) transnasal infiziert, scheininfizierte Kontrollgruppen erhielten PBS. Mit dem Beginn der Beatmung wurde in entsprechenden Gruppen kontinuierlich Adrenomedullin (AM) infundiert (0,05 mg/kg/h). Nicht-beatmete Tiere wurden 30 Stunden nach der Infektion euthanasiert. Zytokinspiegel von IL-6, KC und IL-10 wurden im Blutplasma mit Hilfe eines Bioplex-Immunoassays gemessen. Die Daten sind angegeben als MW und SEM (\*\* p < 0,01; n = 5-6).

## 5.6 Beatmung induzierte eine Leukopenie bei Pneumonie

24 Stunden nach Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* (*S.p.*) zeigte sich eine erhöhte Anzahl an Leukozyten im Blut, vornehmlich durch einen Anstieg von zirkulierenden neutrophilen Granulozyten (PMN) und Monozyten bedingt. Beatmung allein führte zu einer Reduktion der Anzahl zirkulierender Lymphozyten, hatte aber keinen Effekt auf die Population anderer Blutleukozyten. Infizierte und beatmete Mäuse zeigten eine signifikant geringere Blutleukozytenzahl im Vergleich zu nicht beatmeten Mäusen mit Pneumonie, bedingt durch ein Absinken aller differenzierten Zellpopulationen (PMN, Monozyten und Lymphozyten). Die Behandlung mit AM hatte keinen Einfluss auf die Leukozytenzahl im Blut (Abb. 13).



**Abb. 13**

**Sechsstündige Beatmung induzierte eine Leukopenie bei Pneumonie.**

Mäuse wurde 24 Stunden vor der sechsstündigen Beatmung (6h vent.) mit  $5 \times 10^6$  KBE *Streptococcus pneumoniae* (S.p.) transnasal infiziert, scheininfizierte Kontrollgruppen erhielten PBS. Mit dem Beginn der Beatmung wurde in entsprechenden Gruppen kontinuierlich Adrenomedullin (AM) infundiert (0,05 mg/kg/h). Nicht-beatmete Tiere wurden 30 Stunden nach der Infektion euthanasiert. Leukozyten aus Gesamtblut wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt und differenziert. Die Daten sind angegeben als MW und SEM (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; jeweils  $n = 5$ ). Abkürzungen: PMN, Polymorphkernige neutrophile Granulozyten.

## **5.7 Adrenomedullin schützte Mäuse mit Pneumonie vor der Entwicklung eines Beatmungs-induzierten Multiorganversagen**

Aufgrund des beobachteten Zusammenhangs zwischen maschineller Beatmung und der Progression der Pneumonie zu ARDS und Sepsis, erfolgte im nächsten Schritt die Untersuchung von extrapulmonalem Organversagen bzw. -schaden. Hierfür wurden AST, ALT und Kreatinin-Spiegel im Blut sowie NGAL im Urin als Marker für eine Schädigung von Leber, Nieren und Ileum bestimmt (Abb. 14 und Abb. 15). Zudem wurden histopathologische Analysen sowie eine Analyse parenchymaler Apoptose durchgeführt.

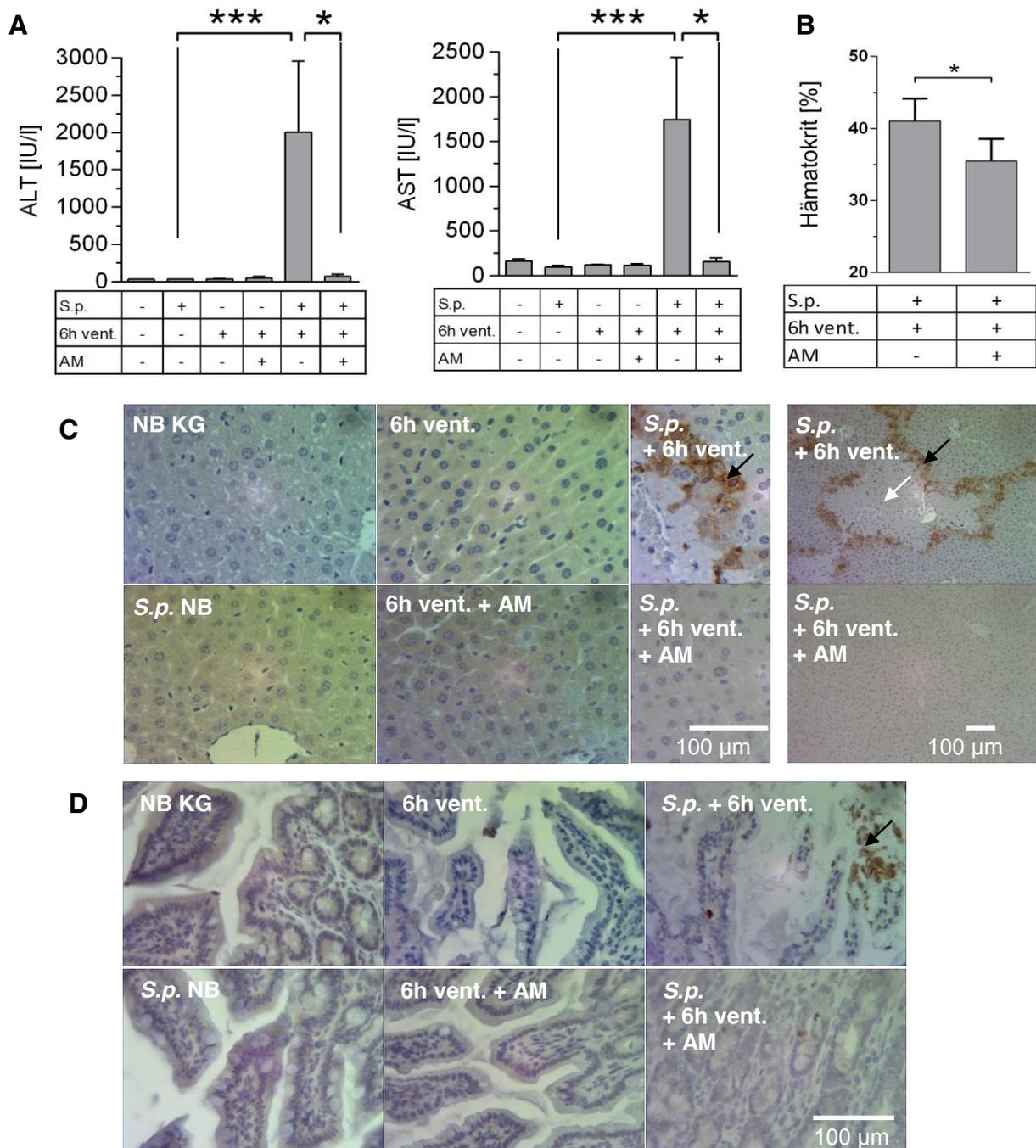
Während die Blutspiegel von AST und ALT durch Pneumonie oder Beatmung allein nicht beeinflusst wurden, führte die Kombination aus Beatmung und Pneumonie zu einem dramatischen Anstieg von AST- und ALT-Werten im Blutplasma. Dieser wurde fast vollständig durch eine Behandlung mit AM verhindert (Abb. 14A). Analog dazu stellte sich in histopathologischen Analysen eine ausgedehnte Leberschädigung nur bei Beatmung in Kombination mit Pneumonie dar (Abb. 14C). Auch eine Induktion von Apoptose in der Leber wurde ausschließlich in Mäusen mit Pneumonie nach maschineller Beatmung beobachtet. Unter der Therapie mit AM trat dieser Schaden bei Pneumonie und Beatmung nicht auf.

In den Ileumpräparaten wurden CC3<sup>+</sup>-Zellen als Zeichen für eine parenchymale Apoptose ebenfalls fast ausschließlich in der beatmeten Pneumonie-Gruppe beobachtet. Unter Behandlung mit AM zeigten sich nur vereinzelt CC3<sup>+</sup>-Zellen (Abb. 14D). In allen anderen Gruppen konnten nur sporadisch einzelne apoptotische Zellen gefunden werden, was dem physiologischen Umsatz der Epithelzellen entspricht.

In der beatmeten Pneumonie-Gruppe zeigten sich im Urin erhöhte Werte für NGAL (Neutrophil gelatinase-associated Lipocalin), einem Biomarker für die frühe Phase der renalen Tubulusschädigung (Abb. 15A). Pneumonie und Beatmung allein führten zu erhöhten Kreatinin-Spiegeln im Blut im Vergleich zu scheininfizierten, nicht-beatmeten Mäusen. Die Beatmung von Mäusen mit Pneumonie führte zu einem weiteren Anstieg des Kreatinin im Blut (Abb. 15B). Diese Unterschiede waren allerdings statistisch nicht signifikant.

In keiner der untersuchten Gruppen konnten morphologische Zeichen einer Nierenschädigung oder parenchymale Apoptose als Zeichen einer Gewebeschädigung festgestellt werden. Die Urinausscheidung war in allen Gruppen mit maschineller Beatmung vergleichbar. Zusammenfassend konnte nur eine frühzeitige tubuläre Schädigung in beatmeten Mäusen mit Pneumonie detektiert werden (Abb. 15A und D). Eine Therapie mit AM zeigte aber keinen messbaren Effekt auf diese tubuläre Schädigung.

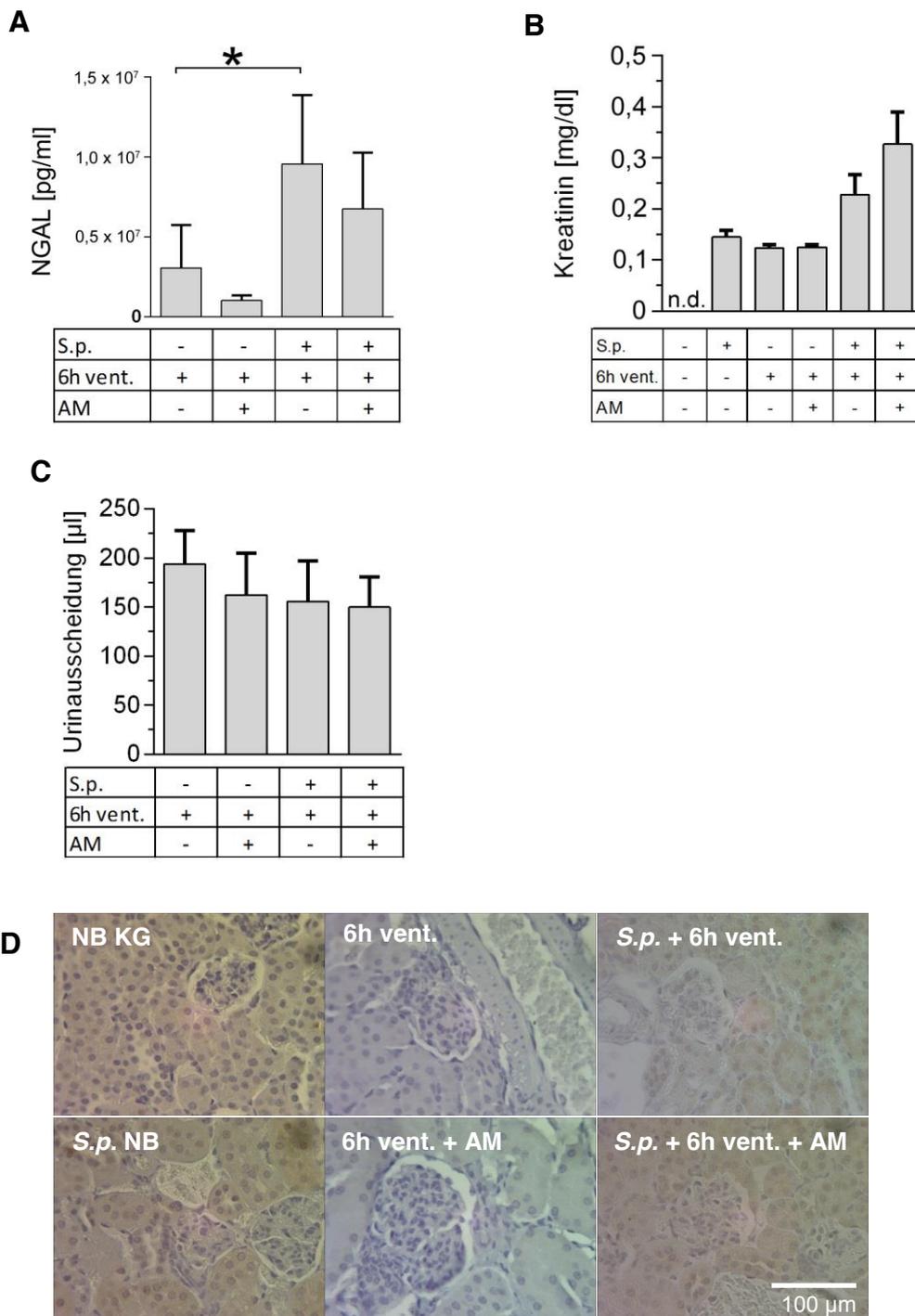
Der Hämatokrit in der beatmeten Pneumonie-Gruppe, welche mit AM therapiert wurde, war signifikant niedriger im Vergleich zur nicht-therapierten, infizierten und beatmeten Gruppe (Abb. 14B).



**Abb. 14**

**Adrenomedullin schützte vor beatmungsinduzierter Leber- und Darmschädigung bei Mäusen mit Pneumonie.**

Mäuse wurden 24 Stunden vor der sechsständigen Beatmung (6h vent.) mit  $5 \times 10^6$  KbE *S. pneumoniae* (*S.p.*) transnasal infiziert, scheininfizierte Kontrollgruppen erhielten PBS. Mit Beginn der Beatmung wurde in entsprechenden Gruppen kontinuierlich Adrenomedullin (AM) infundiert (0,05 mg/kg/h). Nicht-beatmete Tiere (NB) wurden 30 Stunden nach der Infektion euthanasiert. **(A)** Lebertransferasen (Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST)) wurden im Blutplasma quantifiziert. **(B)** Die Behandlung mit AM bei beatmeten Mäusen mit Pneumonie (*S.p.* + 6h vent. + AM/ 6h vent. + AM) reduzierte den Hämatokrit verglichen mit nicht behandelten Tieren (*S.p.* + 6h vent./6h vent.). Dargestellt sind MW und SEM (A, B);  $n = 6-8$  (A) bzw.  $n = 5-6$  (B); \*  $p < 0,05$ , \*\*\*  $p < 0,001$ . **(C)** Leberschnitte wurden mit Cleaved Caspase 3 (CC3) angefärbt (Hämatoxylin-Gegenfärbung). In der Gruppe der beatmeten Mäuse mit Pneumonie (*S.p.* + 6h vent.) zeigte sich eine Nekrose von Leberläppchen (weißer Pfeil), umringt von CC3<sup>+</sup> apoptotischen Zellen (schwarzer Pfeil). Dieses Bild war unter Therapie mit AM (*S.p.* + 6h vent. + AM) nicht zu beobachten. **(D)** Ileumschnitte wurden mit CC3<sup>+</sup> angefärbt (Hämatoxylin-Gegenfärbung). Apoptotische CC3<sup>+</sup> Zellen wurden in beatmeten Mäusen mit Pneumonie (*S.p.* + 6h vent.), in geringerem Maße auch nach AM Behandlung (*S.p.* + 6h vent. + AM) gefunden. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen von  $n=6$  Tieren pro Gruppe. Die Maßstabsbalken sind jew. gültig für alle zusammenhängenden Aufnahmen.



**Abb. 15**

**Beatmung und Pneumonie resultieren in Nierenschädigung.**

Mäuse wurden 24 Stunden vor der sechsständigen Beatmung (6h vent.) mit  $5 \times 10^6$  KBE *Streptococcus pneumoniae* (S.p.) transnasal infiziert, scheininfizierte Kontrollgruppen erhielten PBS. Mit dem Beginn der Beatmung wurden in entsprechenden Gruppen kontinuierlich Adrenomedullin (AM) infundiert (0,05 mg/kg/h). Nicht-beatmete Tiere (NB) wurden 30 Stunden nach der Infektion euthanasiert. **(A)** Neutrophil gelatinase-associated Lipocalin (NGAL) wurde mittels ELISA im Urin gemessen, welcher über die letzten beiden Stunden der Beatmung gesammelt wurde. **(B)** Kreatininbestimmung im Blutplasma. (n.d., nicht detektierbar). **(C)** Quantifizierung der Urinmenge während der letzten beiden Beatmungsstunden. Die Daten sind angegeben als MW und SEM (n=6-8); \* p < 0,05. **(D)** Histologie des Nierenparenchyms mit HE-Färbung. Dargestellt sind repräsentative Aufnahmen aus jeder Gruppe. Der Maßstabsbalken ist gültig für alle Aufnahmen.

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde zum einen der Einfluss von Beatmung auf eine bereits voll ausgeprägte Pneumokokkenpneumonie im Tiermodell hinsichtlich der Progression von Lungenversagen, Sepsis und extrapulmonalem Organversagen und zum anderen das therapeutische Potenzial des Polypeptids Adrenomedullin auf Lungenversagen und extrapulmonales Organversagen in diesem klinisch relevanten Szenario untersucht.

Im Rahmen dieser Studie ist es gelungen zu zeigen, dass die Beatmung von Mäusen mit Pneumonie den bestehenden Lungenschaden aggraviert und sowohl Sepsis als auch mit Sepsis assoziiertes MOV auslöst. AM zeigte einen protektiven Effekt primär durch seine stabilisierende Wirkung auf die endotheliale Barrierefunktion. AM schützte sowohl vor der Entwicklung eines Lungenödems als auch vor einer Leber- und Darmschädigung, ohne dabei die Sekretion von Zytokinen in Lungengewebe und Blut oder pulmonale und systemische Leukozytenzahlen zu beeinflussen. AM zeigte somit in der vorliegenden Studie keinen Einfluss auf die Immunantwort des Organismus.

In der Studie wurde ein neues experimentelles Modell der maschinellen Beatmung von C57Bl/6N-Mäusen mit bestehender Pneumokokkenpneumonie etabliert, um die Interaktion zwischen Beatmung und manifester Pneumonie darzustellen. Es wurden Lungenschädigung, Ausprägung der pulmonalen und systemischen Immunantwort und extrapulmonale Organschädigung untersucht.

Nach transnasaler Applikation einer definierten Menge an *Streptococcus pneumoniae*-Erregern entwickelte sich binnen 24 Stunden eine ausgeprägte Pneumokokkenpneumonie. Die Art der Infektion in diesem Modell entspricht dem physiologischen Weg einer endogenen Infektion aus dem Nasopharynx. In der aktuellen Studie zeigte sich nach einer Pneumokokken-Infektion ohne Beatmung eine pulmonale Entzündungsreaktion mit ausgeprägter Rekrutierung von PMN und erhöhten pulmonalen Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen, sowie ein geringer Anstieg der pulmonalvaskulären Permeabilität. In einer früheren Studie konnten bereits 24 Stunden nach Infektion mit *S. pneumoniae* Zeichen Entzündungsreaktion der Leber durch Anstieg der Akuten-Phase-Proteine festgestellt werden (151). In der aktuellen

Arbeit zeigten sich in der Gruppe mit Pneumokokken-Infektion auch nach 30 Stunden keine Zeichen einer Leber- oder Nierenschädigung.

24 Stunden nach Infektion (24 h p.i.) wurde eine sechsstündige maschinelle Beatmung durchgeführt. Diese Versuchsanordnung spiegelt die klinische Realität wider, denn Patienten mit Pneumonie werden im Allgemeinen erst bei Beginn des respiratorischen Versagens im Rahmen einer fortgeschrittenen Pneumonie maschinell beatmet.

Für die Beatmung wurde ein Tidalvolumen ( $V_t$ ) von 12 ml/kg Körpergewicht verwendet. Obwohl beim Menschen ein  $V_t$  von 6 ml/kg Körpergewicht empfohlen wird, kann diese Art der protektiven Beatmung im Mausmodell nicht analog umgesetzt werden. Eine weitere Absenkung des  $V_t$  macht eine Erhöhung der Atemfrequenz erforderlich, um einer Hyperkapnie und konsekutiven respiratorischen Azidose vorzubeugen. Allein hohe Atemfrequenzen können aber auch relevant VILI induzieren (152, 153). Das verwendete  $V_t$  stellte somit den bestmöglichen Kompromiss dar und ist allenfalls als moderat schädigendes Tidalvolumen im Mausmodell anzusehen.

Diese so durchgeführte Beatmung induzierte in der vorliegenden und anderen Studien nur einen leichten Anstieg der Lungenpermeabilität bei subtilem Lungenschaden und einer moderaten Entzündungsantwort, ohne dabei Einfluss auf die Leber- und Nierenfunktion bei gesunden Mäusen zu haben (38).

Im Gegensatz dazu führte in der vorliegenden Studie diese Beatmung über 6 Stunden bei Mäusen mit Pneumonie zum ARDS, beurteilt anhand der erhobenen Daten zur Oxygenierung, Permeabilität und Lungenmechanik.

Unter Beatmung alleine zeigte sich ein signifikanter Anstieg von Leukozyten (PMN und Monozyten) in der Lunge. In einigen Studien wird eine bedeutende Rolle der Leukozyten bei VILI suggeriert. Kawano et al. zeigten in einem Kaninchenmodell, dass eine Depletion von PMN mit Stickstoff Gasaustausch und Barrierefunktionsstörung beim VILI verbesserten (77). O'Dea et al. konnten 2009 außerdem zeigen, dass eine Mobilisation und Margination von GR-1<sup>high</sup>-Monozyten vorgeschädigte Lungen für die Entwicklung eines ARDS (ALI) konditioniert (78). Dhanireddy et al. stellten einen signifikanten Anstieg von Leukozyten und PMN unter Beatmung im Mäusemodell bei einer *Staphylococcus aureus*-Pneumonie dar (154).

Im Gegensatz dazu konnte in der aktuellen Studie kein Unterschied bei der Rekrutierung von Leukozyten (PMN und Monozyten) in die Lunge durch Beatmung bei der Pneumonie festgestellt werden.

Es zeigte sich kein Effekt auf die Rekrutierung von PMNs nach 24 und 30 Stunden *post infectionem* bei gleichzeitig vermehrtem VILI. Dies spricht im Gegensatz zu den o. g. Studien für einen PMN-unabhängigen Mechanismus, der zu VILI führt und stellt somit die Relevanz der Leukozytenrekrutierung für die Genese von VILI bei Pneumonie in diesem Modell in Frage. Eine Erklärung könnte sein, dass möglicherweise die PMNs im aktuellen Modell noch nicht aktiviert sind.

Vor dem Hintergrund dieser Daten scheint es also nur bedingt sinnvoll, sich auf die Verhinderung der pulmonalen Leukozytenrekrutierung als adjuvanten Therapieansatz beim beatmungsassoziierten Lungenschaden zu fokussieren – insbesondere bei schweren Pneumonien.

Proinflammatorische Zytokine sind an der Entwicklung von VILI und folgender Progression des Lungenversagens entscheidend beteiligt. Bereits in der Vergangenheit konnte ein ursächlicher Zusammenhang einer Erhöhung der pulmonalen Inflammation mit der Progression des Lungenversagens hergestellt werden. Erhöhte Spiegel an zirkulierenden IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-8 korrelierten mit dem Schweregrad des ARDS oder der Mortalität im septischen Schock (54). Gleichzeitig schützte eine Blockade des IL-1-Rezeptors vor VILI im Mausmodell (49) und unter der Abwesenheit von IL-6 (IL-6-Knockout) in einem Salzsäureinhalations-Beatmungsmodell schien VILI weniger ausgeprägt aufzutreten und IL-6 somit VILI in einem Two-Hit-Mausmodell zu fördern (53).

Allerdings zeigte IL-6 *in vivo* nicht immer eine rein proinflammatorische und schädigende Wirkung. *In vivo* zeigten IL-6-Knockout-Tiere eine erhöhte Lungenschädigung nach LPS-Gabe (50), was wiederum für einen schützenden Effekt des Zytokins auf das Lungengewebe sprechen könnte. In der gleichen Arbeit zeigte IL-6 *in vitro* jedoch auch eine endothel-schädigende Wirkung.

In der aktuellen Arbeit führte die Beatmung von Mäusen mit Pneumonie zu einer deutlichen Exazerbation der pulmonalen Entzündungsreaktion (Anstieg der Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6 und KC) und der Lungenpermeabilität. Ein klarer Zusammenhang zwischen der

Exazerbation der Entzündungsreaktion und dem Aufeinandertreffen von Pneumonie und Beatmung liegt unter Anbetracht der vorhandenen Literatur nahe, da die betroffene Versuchsgruppe auch ein beginnendes Lungenversagen, gekennzeichnet durch erhöhte Permeabilität und vor allem eine erniedrigte P/F-Ratio, zeigt.

Weitere Versuche durch Blockaden der Zytokinrezeptoren oder Verwendung von Zytokin-defizienten Tieren könnten zum genaueren Verständnis der Rolle dieser Zytokine bei der Entwicklung von VILI/ ARDS beitragen.

Wie auch in anderen Studien zuvor führte die Beatmung in dem experimentellen Modell der aktuellen Arbeit zur Entwicklung einer Sepsis bis hin zum MOV. Beatmung induziert in der Lunge die Bildung und Freisetzung von Zytokinen (33, 35, 44) und Versuche an isoliert ventiliert und perfundierten Mauslungen sowie *in vivo* Studien zeigten einen beatmungsinduzierten Anstieg an zirkulierenden Zytokinen (34, 42, 117).

Die aktuellen Ergebnisse implizieren somit eine bedeutende Rolle der Beatmung bei Pneumonie für die Entwicklung von Sepsis und MOV. Hier wird die Zwiespältigkeit des Einsatzes der maschinellen Beatmung deutlich. Zum einen ist diese bei ARDS Patienten lebenserhaltend und unvermeidbar, zum anderen trägt sie zur Aggravierung des klinischen Zustandes bereits erkrankter Individuen bei. Der Einsatz der maschinellen Beatmung muss somit unter diesen Aspekten differenziert und wohl bedacht erfolgen.

Infizierte und beatmete Mäuse entwickelten im Gegensatz zu nur infizierten Mäusen eine schwere Sepsis. Dies zeigte sich durch einen dramatischen Anstieg von Zytokinen im Blut, Leukopenie im Blut und Schädigung des hepatischen, renalen und intestinalen Parenchyms.

Zu bemerken ist, dass es in diesem Modell weder zu einem hämodynamischen Kollaps noch zu einer relevanten Hypotension kam. Dies hätte die Ergebnisse durch Auslösen einer schockbedingten Entzündungsreaktion oder assoziierte Mikrozirkulationsstörungen beeinflussen können.

Die im Rahmen von VILI ausgelöste systemische Entzündungsreaktion trägt auch in anderen Studien zum extrapulmonalen Organversagen bei (3-5, 154). Insbesondere bei Mäusen mit einer *Staphylococcus aureus*-Pneumonie konnten ähnliche Effekte bezüglich der Entwicklung einer Sepsis und extrapulmonalem Organversagen

beobachtet werden, womit sie im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit stehen. Auch bei Patienten mit ARDS zeigte sich, dass protektive Beatmungsstrategien mit verminderten Spiegeln an Zytokinen im Serum (155, 156) und verminderter extrapulmonaler Dysfunktion (4) einhergehen.

Es liegt somit nahe, dass zirkulierende inflammatorische Mediatoren auch ursächlich in Zusammenhang mit beatmungs-assoziiertem, extrapulmonalem Organversagen stehen (157). Zytokine werden in der Sepsis nicht nur in der Lunge, sondern auch in anderen Organen produziert und sezerniert (158) und erhöhen dadurch die Wahrscheinlichkeit für multiple Organdysfunktionen (14, 159). Die genaue Quelle der Produktion der hohen systemischen Zytokinspiegel war jedoch nicht Gegenstand der vorliegenden Studie und bleibt daher unklar.

In der aktuellen Arbeit zeigte sich bei Beatmung und Pneumonie neben dem Anstieg der Zytokine (IL-6, KC) im Plasma und in der Lunge eine Leukopenie (PMN, Lymphozyten und Monozyten) im Blut, was ein weiteres Merkmal von Sepsis und SIRS darstellt.

Im vorliegenden experimentellen Modell mündete die Beatmungs-induzierte Aggravation der Pneumonie in Sepsis und nachfolgender extrapulmonaler Organschädigung. Diese konnte in Leber, Ileum und Niere nachgewiesen werden. Der Leberschaden zeigte sich sowohl durch erhöhte ALT- und AST-Werte in der Zirkulation (157, 159, 160), als auch immunhistologisch anhand von vermehrt auftretender Apoptose.

Der enge Zusammenhang zwischen Apoptose und der Entwicklung eines MOV wurde bereits in anderen Studien nachgewiesen. Insbesondere schädigende Beatmung führte im Kaninchenmodell zur erhöhten Rate von Epithelzellapoptose der Niere und des Dünndarms sowie zu Niereninsuffizienz (14). Apoptotische DNA im Blut korrelierte beim Menschen mit erhöhter Mortalität (161). In der aktuellen Arbeit zeigte sich ebenfalls eine Assoziation zwischen der Apoptose in Leber und Ileum und dem Auftreten eines MOV. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um zu klären, ob Apoptose ursächlich für MOV ist oder nur Zeichen einer allgemeinen Organschädigung, der ein anderer, hier nicht aufgedeckter Mechanismus unterliegt.

Im Ileum konnte als Korrelat des Parenchymschadens ebenfalls eine Zunahme von Apoptose nachgewiesen werden. Im Urin war bei Tieren mit Pneumonie und Beatmung eine erhöhte Konzentration von NGAL nachzuweisen, was ein sehr sensitiver Marker für renale Tubulusschädigung ist (162). Im Gegensatz zu Leber und Ileum konnten aber in der Niere kein histomorphologischer Organschaden und parenchymale Apoptose nachgewiesen werden. Dies ist auf den ersten Blick unerwartet, da die Niere bei Untersuchungen beim Menschen das vulnerabelste Organsystem bei ARDS und VILI darstellt (5, 14). Die konsequente Volumetherapie und hämodynamische Stabilisierung der Versuchstiere während der Experimente könnte die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen aus dem experimentellen Modell und der klinischen Situation erklären.

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die zyklische Dehnung des Alveolarepithels während der Beatmung zu vermehrtem Bakterienwachstum und Bakteriämie führt und somit die Entwicklung von Sepsis und Organversagen begünstigt (163-166). Dieser Effekt war bei Gram-negativen Erreger zu beobachten, während Wachstum und Translokation Gram-positiver Bakterien, wie beispielsweise von *Staphylococcus aureus*, durch eine zyklische Dehnung bei Beatmung *in vitro* und *in vivo* nicht beeinflusst wurden (154, 166). In der aktuellen Studie hatte die Beatmung ebenfalls keinen Einfluss auf die pulmonale Erregerlast sowie die bakterielle Translokation gemessen an Erregerlast im Blut und septischen Absiedlungen von Pneumokokken in die Milz. Es ist bekannt, dass *S. pneumoniae* aktiv durch das Lungengewebe transmigrieren kann. Vor diesem Hintergrund könnte die beatmungs-assoziierte bakterielle Translokation, insbesondere bei der Pneumokokkenpneumonie, möglicherweise von untergeordneter Bedeutung für die Progression von Lungenversagen sowie Sepsis und MOV sein (167).

Einige Arbeiten untersuchten Infektion und Translokation von bestimmten Erregern, wie Streptokokken (163, 168) oder *Enterobacter aerogenes* (165). Hierbei erfolgte die Beatmung entweder direkt nach der Infektion (163, 168) oder aber die Tiere wurden erst nach Beginn der Beatmung infiziert (165).

Im Gegensatz zu in der Literatur publizierten experimentellen Modellen wurde in der vorliegenden Arbeit die maschinelle Beatmung erst bei einer vollständig ausgeprägten Pneumonie eingeleitet. Das experimentelle Modell bildet daher die realitäts-nahe klinische Situation ab, in der Patienten erst im fortgeschrittenen Stadium der Pneumonie beatmet werden. Vom pathophysiologischen Aspekt her unterscheidet sich eine Lunge

mit manifester Pneumonie von einer gesunden Lunge durch eine ausgeprägte Vorschädigung und durch die daraus resultierende durch Ödem und Infiltrate bedingte reduzierte Compliance, wobei bereits Entzündungsreaktionen ablaufen (110, 169).

Darüber hinaus wurden in der aktuellen Arbeit Pneumokokken als wichtigste Erreger der CAP verwendet. Eine Infektion fand über die „natürliche“ Eintrittspforte über den Nasopharynx statt.

Maschinelle Beatmung verursacht VILI induziert durch inflammatorische Entzündungsreaktionen (Biotrauma), die einen bestehenden Lungenschaden aggravieren und MOV auslösen können. Zusätzlich zu lungenprotektiven Beatmungskonzepten müssen pharmakologische adjuvante Therapien entwickelt werden, die beispielsweise die endotheliale Barrierefunktion stabilisieren. Vor diesem Hintergrund ist AM eine Substanz mit vielversprechendem Potenzial (136, 137, 140, 141, 144).

AM ist ein endogenes Peptid, das an der Homöostase der endothelialen Barrierefunktion beteiligt ist. Die Expression von Adrenomedullin wird bei Entzündung reguliert, sodass eine physiologische Rolle von AM bei der Regulation von Permeabilität vermutet werden kann, auch wenn diese bis zum aktuellen Zeitpunkt nicht nachgewiesen wurde. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Studie die Regulation von AM bei Pneumonie und Beatmung allein sowie in Kombination untersucht.

Es konnte eine Hochregulation der Expression von AM jeweils bei der Beatmung und der Pneumonie beobachtet werden. Beatmung führte vorwiegend in Endothelzellen und Makrophagen zu einer vermehrten Expression von AM. Die Expression von AM in den pneumonischen Infiltraten bei Pneumonie konnte aber größtenteils der Leukozyteninvasion zugeschrieben werden.

AM bindet mit hoher Affinität an den CRLR. An den CRLR müssen für die suffiziente Signaltransduktion RAMPs gebunden sein. Für AM sind insbesondere Rezeptorkomplexe aus CRLR und RAMP 2+3 (128, 132, 170) beschrieben. In der vorliegenden Studie zeigte sich eine Hochregulation der Expression von RAMP 1-3 bei Pneumonie. Bemerkenswert war, dass die Beatmung von Mäusen mit Pneumonie zu einer geringeren RAMP 1-3 Expression führte. Die Expression von CRLR wurde nicht

wesentlich durch Pneumonie oder Beatmung beeinflusst. Dies könnte zu einer abgeschwächten Wirksamkeit von endogenem AM und somit zu einer Beeinträchtigung der endothelialen Integrität geführt haben. Die Therapie mit AM hatte keine Auswirkung auf die Ausschüttung von AM, CRLR oder RAMP 1 bis 3.

In einer vorangegangenen Studie schützte exogenes AM Mäuse vor der Entwicklung eines VILI. Dies war unter Hyperoxie und auch bei verzögertem Therapiebeginn nach der Beatmung der Fall (37). Jedoch entsprechen die verwendeten Modelle nicht, im Gegensatz zur vorliegenden Studie, der klinischen Situation, in der Patienten mit respiratorischem Versagen, z.B. aufgrund einer Pneumonie, künstlich beatmet werden müssen, womit die Ergebnisse kritisch betrachtet werden müssen.

In dem aktuellen Modell wurde der Pneumonie-induzierte Lungenschaden durch Beatmung aggraviert. Dies konnte anhand einer erhöhten mikrovaskulären Permeabilität mit Ödembildung und verminderter Oxygenierungskapazität, sowie anhand des Anstieges des Atemwegsspitzen drucks unter volumenkonstanter maschineller Beatmung dokumentiert werden. Exogenes AM reduzierte auch in dieser Studie pulmonalvaskuläre Permeabilität und verhinderte den Anstieg des Atemwegsspitzen druckes als Zeichen für den Abfall der pulmonalen Compliance durch Progression eines Lungenödems. Auf die Exazerbation der pulmonalen Entzündungsreaktion durch Beatmung und die Rekrutierung von PMN hatte AM in dieser Studie keinen Einfluss. In Zusammenschau der Ergebnisse scheint der zentrale protektive Mechanismus von AM hier die Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion zu sein (136-138, 140, 141). Bemerkenswert ist, dass trotz der Senkung von Permeabilität und Senkung von Ödembildung in dieser Studie durch die Gabe von AM keine Verbesserung der Oxygenierung im Blut erzielt wurde. Eine Erklärung hierfür könnten die vasodilatatorischen Eigenschaften von AM sein. Hypoxische Vasokonstriktion wurde durch AM im Lungengewebe nachweislich reduziert. Die hypoxische Vasokonstriktion stellt einen natürlichen Mechanismus des Körpers dar, vor einem Missverhältnis zwischen Ventilation und Perfusion (V/Q-Mismatch) zu schützen. Durch eine Therapie mit AM wird dieser Effekt aufgehoben. Wenn dadurch schlecht ventilerte Bereiche wie z.B. pneumonische Infiltrate perfundiert werden, dann könnte ein erhöhter Rechts-Links-Shunt stattfinden und somit eine schlechtere Oxygenierung des Blutes erfolgen. Durch die Überlagerung mit diesem

Effekt könnte eine theoretisch verbesserte Oxygenierungskapazität durch vermehrten Rechts-Links-Shunt unter AM maskiert worden sein.

Einige Autoren postulieren auch immunmodulatorische Funktionen von AM (164, 171). So demonstrierten Talero et al. antiinflammatorische Effekte von AM. AM schwächte zum einen die Rekrutierung von Leukozyten in das Lungengewebe ab und hemmte über eine Inhibition der NF-Kappa B-Aktivierung die Produktion und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (172). Die immunmodulatorischen Eigenschaften von AM könnten theoretisch bei Infektionen aber auch nachteilige Wirkung haben, durch Reduktion der Immunabwehr und Erregerbeseitigung. In der aktuellen Studie konnte jedoch kein immunmodulatorischer Effekt von AM detektiert werden. Es ist somit nicht davon auszugehen, dass AM Lungenschädigung unter Beatmung durch Limitation der Immunantwort reduziert.

Die Stabilisierung der endothelialen Barriere durch AM könnte theoretisch auch einer bakteriellen Translokation entgegenwirken, die ebenfalls zur Progression von Sepsis und MOV beiträgt. Vor diesem Hintergrund wurde das bakterielle Wachstum in der Lunge und die bakterielle Translokation unter der Therapie mit AM untersucht. Die Beatmung hatte keinen Einfluss auf die Translokation der Pneumokokken. Auch konnte kein Einfluss von AM auf die Bakterienlast in Lunge, Blut und Milz detektiert werden.

In unterschiedlichen Studien wurden bereits protektive Eigenschaften von AM nachgewiesen. So reduzierte AM durch Stabilisierung der endothelialen Barriere neben Lungenversagen auch eine Schädigung von Leber, Niere und Darm bei Ratten, bei denen ein septischer Schock durch Infusion von *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -Toxin induziert wurde (140). AM schützte vor Ischämie- und Reperfusionsschäden und polymikrobieller Sepsis bei Peritonitis (142, 171). AM schützte auch im isolierten Rattendarm, der mit  $\alpha$ -Toxin perfundiert wurde, nicht nur gegen endotheliale Hyperpermeabilität, sondern stabilisierte auch deutlich die Mikrozirkulation (137, 144). Auch Mäuse mit VILI entwickelten weniger Zeichen von Nierenschädigung und Mikrozirkulationsstörung unter einer Therapie mit AM (37).

In dieser Studie entwickelten Mäuse mit Pneumonie, die für sechs Stunden beatmet wurden, Sepsis mit septischer Organschädigung vorwiegend von Leber und Darm. Eine Therapie mit AM verhinderte dieses Auftreten von Leber- und Darmschädigung eindrucksvoll.

Der zugrundeliegende Mechanismus für diese protektive Funktion von AM kann mittels der durchgeführten Untersuchungen nicht eruiert werden. Die protektive Funktion könnte auf einer Stabilisierung der Barrierefunktion des Endothels basieren, wie auch bereits in anderen Studien demonstriert (136, 137, 140, 141). Die Daten der aktuellen Studie belegen eine Reduktion von vaskulärer Permeabilität in der Lunge und suggerieren die Stabilisierung der systemischen endothelialen Barrierefunktion anhand des niedrigeren Hämatokrits unter Therapie mit AM bei Mäusen mit Pneumonie und Beatmung. Auch die Stabilisierung der Mikrozirkulation ist vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur denkbar, auch wenn es dafür keinen direkten Beweis in dieser Studie gibt.

Unter AM wurde außerdem im Rattenmodell bei LPS-induziertem ARDS weniger Apoptose beobachtet (164) und Apoptose ist wiederum mit der Pathophysiologie der Sepsis verbunden. Lymphozytäre Apoptose scheint zur Immunsuppression bei Sepsis beizutragen (173). Bei Sepsis kommt es zu Apoptose im Parenchym von Organen wie z.B. in der Milz und im Thymus (174). Auch in gastrointestinalen Epithelzellen konnte Apoptose bei Sepsis beobachtet werden (175-178). AM zeigte wiederum antiapoptotische Eigenschaften in Gehirnzellen bei Ischämie-induzierter Apoptose im Rattenmodell (179) und ebenfalls im Rattenmodell im vaskulären Endothel bei CPL-induzierter Sepsis (180). Mittels der erhobenen Daten kann allerdings nicht unterschieden werden, ob der antiapoptotische Effekt von AM die Organprotektion vermittelte, oder aber weniger Apoptose im Gewebe im Rahmen von reduzierter Gewebeschädigung beispielsweise aufgrund einer Stabilisation der Mikrozirkulation durch AM auftrat.

Die Ergebnisse der Arbeit legen nahe, dass mögliche immunmodulatorische Effekte von AM für die beobachteten protektiven Effekte in dem verwendeten experimentellen Modell keine relevante Rolle spielen. Obwohl auch in anderen Studien sogar ein antibakterieller Effekt des AM gezeigt werden konnte (181, 182), konnte auch dies in der aktuellen Arbeit nicht nachgewiesen werden und somit auch nicht die beobachtete protektive Wirkung des AM erklären.

AM mit seinen barriestabilisierenden Eigenschaften diene als Barrierschutz in Leber, Ileum und Nieren und verhindert damit eine Ödembildung und wirkte somit wie in einer vorherigen Studie einer Schockreaktion entgegen (136).

Eine Störung der Mikrozirkulation ist pathognomonisch für Organversagen während des septischen Schocks und die Behandlung mit AM erwies sich als protektiv gegenüber der Entwicklung einer Mikrozirkulationsstörung.

AM reduzierte das Aufkommen von apoptotischen Epithel- und Endothelzellen in der Sepsis (171, 180). Außerdem konnte AM durch seine barriere-stabilisierende Funktion die Mortalität beim *Staphylococcus aureus*-Alpha-Toxin induzierten Kreislaufschock im Rattenmodell signifikant reduzieren (136). Dies konnte auch in peripheren Organen wie Leber und Niere gezeigt werden.

Beatmung führte zusammen mit Pneumonie zu einer frühzeitigen Nierenschädigung. Eine Wirkung von AM auf die Nierenfunktion war in der vorliegenden Arbeit nur als Trend zu erkennen. Es zeigte sich lediglich eine signifikante Erhöhung der NGAL als Zeichen für renale Tubulusschädigung durch Beatmung bei Pneumonie. Dhanireddy et al. konnten zuvor einen deutlichen Kreatinin-Anstieg im Serum nach 12-stündiger Beatmung bei Infektion mit *Staphylococcus aureus* verzeichnen (154). In der aktuellen Studie konnten keine unterschiedlichen Serum-Kreatinin-Werte in den verschiedenen Gruppen gezeigt werden. Möglicherweise tritt dieser Effekt erst nach einer längeren Beatmungszeit ein.

## Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit vor dem Hintergrund der publizierten Daten aus anderen präklinischen Studien (37, 141, 164, 180) identifizieren Adrenomedullin als potenzielles pharmakologisches Therapeutikum bei VILI mit ARDS und Sepsis und rechtfertigen weitere Untersuchungen bei Patienten mit beatmungspflichtiger Pneumonie.

Die Verhinderung eines VILI bei beatmeten Patienten mit ARDS ist nicht möglich, auch protektive Beatmung verursacht VILI. Vor dem Aspekt des Biotraumas ist eine pharmakologische adjuvante Therapie, die diesem entgegenwirkt oder dies verhindert, rational. In der vorliegenden Studie zeigte AM einen protektiven Effekt auf die Entwicklung von VILI bei Pneumonie und Progression von Sepsis und MOV.

Selbstverständlich sind die Ergebnisse von Tierversuchen nur bedingt auf den menschlichen Organismus bzw. die tatsächliche klinische Situation beim Patienten zu übertragen, da beispielsweise im vorliegenden Mausmodell die Beatmungszeit von sechs Stunden nicht vergleichbar mit Beatmungszeiten bei intensivpflichtigen Patienten ist. Allerdings stellt das hier eingesetzte präklinische, standardisierte Tiermodell bereits einen sehr guten Kompromiss zwischen Grundlagenexperiment und Patient mit respiratorischem Versagen bei der CAP dar. Die vorliegende Studie hat zusammen mit anderen präklinischen Studien zur Entscheidung der EMA beigetragen, die Entwicklung von AM als Orphan Drug für das ARDS zu empfehlen. Eine weitere Translation in klinische Studien ist somit denkbar und wird von einer deutschen Pharma-Firma aktuell verfolgt. In Anbetracht der immer noch sehr hohen Sterblichkeit bei ARDS und MOV wäre ein zentrales Ziel, die protektive Beatmung durch AM als ein adjuvantes pharmakologisches Therapeutikum zu ergänzen, welches idealerweise auch auf extrapulmonale Organschädigung protektiv wirkt.

Ein Nachteil von AM könnte seine vasodilatative Eigenschaft sein, welche seinen Einsatz im septischen Schock erschweren könnte. Allerdings haben auch aktuell etablierte Therapeutika, die bei Schock und Sepsis bereits angewendet werden, wie beispielsweise Dobutamin oder Levosimendan, vasodilatative Eigenschaften.

Es wurden bereits einzelne Studien durchgeführt, welche die Wirksamkeit von AM beim Menschen, beispielsweise bei der dekompensierten Herzinsuffizienz untersuchten

(145). Hierbei zeigte AM keine gravierenden Nebenwirkungen, was eine wichtige Voraussetzung für weitere Studien an Patienten darstellt.

In dieser Promotionsarbeit konnte eine protektive Wirkung von AM im experimentellen Modell von beatmeten Mäusen mit Pneumokokkenpneumonie gezeigt werden, ohne nachteilige Beeinträchtigung der Immunantwort. Durch Senkung von Permeabilität und Apoptose stellt Adrenomedullin einen vielversprechenden Kandidaten für eine adjuvante Therapie bei ARDS und MOV dar.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med*, 2000. 342(18): p. 1301-8.
2. **Adams, A.B., D.A. Simonson and D.J. Dries**, Ventilator-induced lung injury. *Respir Care Clin N Am*, 2003. 9(3): p. 343-62.
3. **Amato, M.B., C.S. Barbas, D.M. Medeiros, R.B. Magaldi, G.P. Schettino, G. Lorenzi-Filho, R.A. Kairalla, D. Deheinzelin, C. Munoz, R. Oliveira, T.Y. Takagaki, and C.R. Carvalho**, Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 1998. 338(6): p. 347-54.
4. **Ranieri, V.M., P.M. Suter, C. Tortorella, R. De Tullio, J.M. Dayer, A. Brienza, F. Bruno, and A.S. Slutsky**, Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA*, 1999. 282(1): p. 54-61.
5. **Ranieri, V.M., F. Giunta, P.M. Suter and A.S. Slutsky**, Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA*, 2000. 284(1): p. 43-4.
6. **Wolthuis, E.K., A.P. Vlaar, G. Choi, J.J. Roelofs, N.P. Juffermans and M.J. Schultz**, Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care*, 2009. 13(1): p. R1.
7. **Chiumello, D., G. Pristine and A.S. Slutsky**, Mechanical ventilation affects local and systemic cytokines in an animal model of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. 160(1): p. 109-16.
8. **Guerin, C., J. Reignier, J.C. Richard, P. Beuret, A. Gacouin, T. Boulain, E. Mercier, M. Badet, A. Mercat, O. Baudin, M. Clavel, D. Chatellier, S. Jaber, S. Rosselli, J. Mancebo, M. Sirodot, G. Hilbert, C. Bengler, J. Richecoeur, M. Gannier, F. Bayle, G. Bourdin, V. Leray, R. Girard, L. Baboi, and L. Ayzac**, Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 2013. 368(23): p. 2159-68.
9. **Slutsky, A.S.**, Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest*, 1999. 116(1 Suppl): p. 9S-15S.
10. **Slutsky, A.S.**, Ventilator-induced lung injury: from barotrauma to biotrauma. *Respir Care*, 2005. 50(5): p. 646-59.
11. **Borelli, M., T. Kolobow, R. Spatola, P. Prato and K. Tsuno**, Severe acute respiratory failure managed with continuous positive airway pressure and partial

- extracorporeal carbon dioxide removal by an artificial membrane lung. A controlled, randomized animal study. *Am Rev Respir Dis*, 1988. 138(6): p. 1480-7.
12. **Montgomery, A.B., M.A. Stager, C.J. Carrico and L.D. Hudson**, Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 1985. 132(3): p. 485-9.
  13. **Crimi, E., H. Zhang, R.N. Han, L. Del Sorbo, V.M. Ranieri and A.S. Slutsky**, Ischemia and reperfusion increases susceptibility to ventilator-induced lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. 174(2): p. 178-86.
  14. **Imai, Y., J. Parodo, O. Kajikawa, M. de Perrot, S. Fischer, V. Edwards, E. Cutz, M. Liu, S. Keshavjee, T.R. Martin, J.C. Marshall, V.M. Ranieri, and A.S. Slutsky**, Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA*, 2003. 289(16): p. 2104-12.
  15. **Kaji, Y., G. Ohara, K. Kagohashi and H. Satoh**, Pneumomediastinum in a patient with pneumocystis jirovecii pneumonia. *Intern Med*, 2012. 51(16): p. 2251.
  16. **Anzueto, A., F. Frutos-Vivar, A. Esteban, I. Alia, L. Brochard, T. Stewart, S. Benito, M.J. Tobin, J. Elizalde, F. Palizas, C.M. David, J. Pimentel, M. Gonzalez, L. Soto, G. D'Empaire, and P. Pelosi**, Incidence, risk factors and outcome of barotrauma in mechanically ventilated patients. *Intensive Care Med*, 2004. 30(4): p. 612-9.
  17. **Gammon, R.B., M.S. Shin, R.H. Groves, Jr., J.M. Hardin, C. Hsu and S.E. Buchalter**, Clinical risk factors for pulmonary barotrauma: a multivariate analysis. *Am J Respir Crit Care Med*, 1995. 152(4 Pt 1): p. 1235-40.
  18. **Woodring, J.H.**, Pulmonary interstitial emphysema in the adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*, 1985. 13(10): p. 786-91.
  19. **Muller-Redetzky, H.C., W. Kummer, U. Pfeil, K. Hellwig, D. Will, R. Paddenberg, C. Tabeling, S. Hippenstiel, N. Suttorp, and M. Witzernath**, Intermedin stabilized endothelial barrier function and attenuated ventilator-induced lung injury in mice. *PLoS One*, 2012. 7(5): p. e35832.
  20. **Dreyfuss, D. and G. Saumon**, Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 157(1): p. 294-323.
  21. **Dos Santos, C.C. and A.S. Slutsky**, Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J Appl Physiol*, 2000. 89(4): p. 1645-55.
  22. **Muller-Redetzky, H.C., M. Felten, K. Hellwig, S.M. Wienhold, J. Naujoks, B. Opitz, O. Kershaw, A.D. Gruber, N. Suttorp, and M. Witzernath**, Increasing the inspiratory time and I:E ratio during mechanical ventilation aggravates ventilator-induced lung injury in mice. *Crit Care*, 2015. 19(1): p. 23.

23. **Shafir, Y. and G. Forgacs**, Mechanotransduction through the cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. 282(3): p. C479-86.
24. **Han, B., M. Lodyga and M. Liu**, Ventilator-induced lung injury: role of protein-protein interaction in mechanosensation. *Proc Am Thorac Soc*, 2005. 2(3): p. 181-7.
25. **Pugin, J.**, Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch. *Crit Care Med*, 2003. 31(4 Suppl): p. S200-6.
26. **Hamanaka, K., M.Y. Jian, D.S. Weber, D.F. Alvarez, M.I. Townsley, A.B. Al-Mehdi, J.A. King, W. Liedtke, and J.C. Parker**, TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. 293(4): p. L923-32.
27. **Vlahakis, N.E., M.A. Schroeder, R.E. Pagano and R.D. Hubmayr**, Deformation-induced lipid trafficking in alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. 280(5): p. L938-46.
28. **Hu, Y., G. Bock, G. Wick and Q. Xu**, Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *FASEB J*, 1998. 12(12): p. 1135-42.
29. **Liu, M., J. Xu, A.K. Tanswell and M. Post**, Stretch-induced growth-promoting activities stimulate fetal rat lung epithelial cell proliferation. *Exp Lung Res*, 1993. 19(4): p. 505-17.
30. **Liu, M. and M. Post**, Invited review: mechanochemical signal transduction in the fetal lung. *J Appl Physiol (1985)*, 2000. 89(5): p. 2078-84.
31. **Swartz, M.A., D.J. Tschumperlin, R.D. Kamm and J.M. Drazen**, Mechanical stress is communicated between different cell types to elicit matrix remodeling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. 98(11): p. 6180-5.
32. **McInnes, I.**, Role of cytokines in the immune system. 2009, UpToDate.
33. **Tremblay, L., F. Valenza, S.P. Ribeiro, J. Li and A.S. Slutsky**, Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos mRNA expression in an isolated rat lung model. *J Clin Invest*, 1997. 99(5): p. 944-52.
34. **von Bethmann, A.N., F. Brasch, R. Nusing, K. Vogt, H.D. Volk, K.M. Muller, A. Wendel, and S. Uhlig**, Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 157(1): p. 263-72.
35. **Wilson, M.R., S. Choudhury, M.E. Goddard, K.P. O'Dea, A.G. Nicholson and M. Takata**, High tidal volume upregulates intrapulmonary cytokines in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol*, 2003. 95(4): p. 1385-93.

36. **Kuipers, M.T., H. Aslami, J.R. Janczy, K.F. van der Sluijs, A.P. Vlaar, E.K. Wolthuis, G. Choi, J.J. Roelofs, R.A. Flavell, F.S. Sutterwala, P. Bresser, J.C. Leemans, T. van der Poll, M.J. Schultz, and C.W. Wieland**, Ventilator-induced lung injury is mediated by the NLRP3 inflammasome. *Anesthesiology*, 2012. 116(5): p. 1104-15.
37. **Muller, H.C., M. Witzenrath, T. Tschernig, B. Gutbier, S. Hippenstiel, A. Santel, N. Suttorp, and S. Rosseau**, Adrenomedullin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Thorax*, 2010. 65(12): p. 1077-84.
38. **Muller, H.C., K. Hellwig, S. Rosseau, T. Tschernig, A. Schmiedl, B. Gutbier, B. Schmeck, S. Hippenstiel, H. Peters, L. Morawietz, N. Suttorp, and M. Witzenrath**, Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Crit Care*, 2010. 14(4): p. R143.
39. **Halbertsma, F.J., M. Vaneker, G.J. Scheffer and J.G. van der Hoeven**, Cytokines and biotrauma in ventilator-induced lung injury: a critical review of the literature. *Neth J Med*, 2005. 63(10): p. 382-92.
40. **Stuber, F., H. Wrigge, S. Schroeder, S. Wetegrove, J. Zinserling, A. Hoeft, and C. Putensen**, Kinetic and reversibility of mechanical ventilation-associated pulmonary and systemic inflammatory response in patients with acute lung injury. *Intensive Care Med*, 2002. 28(7): p. 834-41.
41. **Imai, Y., T. Kawano, S. Iwamoto, S. Nakagawa, M. Takata and K. Miyasaka**, Intratracheal anti-tumor necrosis factor-alpha antibody attenuates ventilator-induced lung injury in rabbits. *J Appl Physiol*, 1999. 87(2): p. 510-5.
42. **Held, H.D., S. Boettcher, L. Hamann and S. Uhlig**, Ventilation-induced chemokine and cytokine release is associated with activation of nuclear factor-kappaB and is blocked by steroids. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001. 163(3 Pt 1): p. 711-6.
43. **Bertok, S., M.R. Wilson, P.J. Morley, R. de Wildt, A. Bayliffe and M. Takata**, Selective inhibition of intra-alveolar p55 TNF receptor attenuates ventilator-induced lung injury. *Thorax*, 2012. 67(3): p. 244-51.
44. **Wilson, M.R., S. Choudhury and M. Takata**, Pulmonary inflammation induced by high-stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signaling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. 288(4): p. L599-607.
45. **Guery, B.P., D.A. Welsh, N.B. Viget, L. Robriquet, P. Fialdes, C.M. Mason, G. Beaucaire, G.J. Bagby, and R. Neviere**, Ventilation-induced lung injury is associated with an increase in gut permeability. *Shock*, 2003. 19(6): p. 559-63.
46. **Wagner, J.G. and R.A. Roth**, Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. *Pharmacol Rev*, 2000. 52(3): p. 349-74.

47. **Goodman, R.B., J. Pugin, J.S. Lee and M.A. Matthay**, Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. 14(6): p. 523-35.
48. **Guo, R.F. and P.A. Ward**, Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. *Free Radic Biol Med*, 2002. 33(3): p. 303-10.
49. **Frank, J.A., J.F. Pittet, C. Wray and M.A. Matthay**, Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade. *Thorax*, 2008. 63(2): p. 147-53.
50. **Goldman, J.L., S. Sammani, C. Kempf, L. Saadat, E. Letsiou, T. Wang, L. Moreno-Vinasco, A.N. Rizzo, J.D. Fortman, and J.G. Garcia**, Pleiotropic effects of interleukin-6 in a "two-hit" murine model of acute respiratory distress syndrome. *Pulm Circ*, 2014. 4(2): p. 280-8.
51. **Fisman, E.Z. and A. Tenenbaum**, The ubiquitous interleukin-6: a time for reappraisal. *Cardiovasc Diabetol*, 2010. 9: p. 62.
52. **Wolters, P.J., C. Wray, R.E. Sutherland, S.S. Kim, J. Koff, Y. Mao, and J.A. Frank**, Neutrophil-derived IL-6 limits alveolar barrier disruption in experimental ventilator-induced lung injury. *J Immunol*, 2009. 182(12): p. 8056-62.
53. **Gurkan, O.U., C. He, R. Zielinski, H. Rabb, L.S. King, J.M. Dodd-o, F.R. D'Alessio, N. Aggarwal, D. Pearce, and P.M. Becker**, Interleukin-6 mediates pulmonary vascular permeability in a two-hit model of ventilator-associated lung injury. *Exp Lung Res*, 2011. 37(10): p. 575-84.
54. **Meduri, G.U., S. Headley, G. Kohler, F. Stentz, E. Tolley, R. Umberger, and K. Leeper**, Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest*, 1995. 107(4): p. 1062-73.
55. **Casey, L.C., R.A. Balk and R.C. Bone**, Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med*, 1993. 119(8): p. 771-8.
56. **Wu, H.P., C.K. Chen, K. Chung, J.C. Tseng, C.C. Hua, Y.C. Liu, D.Y. Chuang, and C.H. Yang**, Serial cytokine levels in patients with severe sepsis. *Inflamm Res*, 2009. 58(7): p. 385-93.
57. **Hoegl, S., K.A. Boost, H. Czerwonka, A. Dolfen, P. Scheiermann, H. Muhl, B. Zwissler, and C. Hofstetter**, Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. *Respir Med*, 2009. 103(3): p. 463-70.
58. **Donnelly, S.C., R.M. Strieter, P.T. Reid, S.L. Kunkel, M.D. Burdick, I. Armstrong, A. Mackenzie, and C. Haslett**, The association between mortality rates and decreased concentrations of interleukin-10 and interleukin-1 receptor

antagonist in the lung fluids of patients with the adult respiratory distress syndrome. *Ann Intern Med*, 1996. 125(3): p. 191-6.

59. **Frink, M., Y.C. Hsieh, C.H. Hsieh, H.C. Pape, M.A. Choudhry, M.G. Schwacha, and I.H. Chaudry**, Keratinocyte-derived chemokine plays a critical role in the induction of systemic inflammation and tissue damage after trauma-hemorrhage. *Shock*, 2007. 28(5): p. 576-81.
60. **Quinn, D.A., R.K. Moufarrej, A. Volokhov and C.A. Hales**, Interactions of lung stretch, hyperoxia, and MIP-2 production in ventilator-induced lung injury. *J Appl Physiol*, 2002. 93(2): p. 517-25.
61. **Belperio, J.A., M.P. Keane, M.D. Burdick, V. Londhe, Y.Y. Xue, K. Li, R.J. Phillips, and R.M. Strieter**, Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest*, 2002. 110(11): p. 1703-16.
62. **Dreyfuss, D., P. Soler, G. Basset and G. Saumon**, High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*, 1988. 137(5): p. 1159-64.
63. **Webb, H.H. and D.F. Tierney**, Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*, 1974. 110(5): p. 556-65.
64. **Frank, J.A., C.M. Wray, D.F. McAuley, R. Schwendener and M.A. Matthay**, Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006. 291(6): p. L1191-8.
65. **Eyal, F.G., C.R. Hamm and J.C. Parker**, Reduction in alveolar macrophages attenuates acute ventilator induced lung injury in rats. *Intensive Care Med*, 2007. 33(7): p. 1212-8.
66. **Woods, S.J., A.A. Waite, K.P. O'Dea, P. Halford, M. Takata and M.R. Wilson**, Kinetic profiling of in vivo lung cellular inflammatory responses to mechanical ventilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2015. 308(9): p. L912-21.
67. **Choudhury, S., M.R. Wilson, M.E. Goddard, K.P. O'Dea and M. Takata**, Mechanisms of early pulmonary neutrophil sequestration in ventilator-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. 287(5): p. L902-10.
68. **Zhang, H., G.P. Downey, P.M. Suter, A.S. Slutsky and V.M. Ranieri**, Conventional mechanical ventilation is associated with bronchoalveolar lavage-induced activation of polymorphonuclear leukocytes: a possible mechanism to explain the systemic consequences of ventilator-induced lung injury in patients with ARDS. *Anesthesiology*, 2002. 97(6): p. 1426-33.

69. **Abraham, E.**, Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med*, 2003. 31(4 Suppl): p. S195-9.
70. **Imanaka, H., M. Shimaoka, N. Matsuura, M. Nishimura, N. Ohta and H. Kiyono**, Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth Analg*, 2001. 92(2): p. 428-36.
71. **Doerschuk, C.M.**, Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. *Respir Res*, 2000. 1(3): p. 136-40.
72. **Mizgerd, J.P., H. Kubo, G.J. Kutkoski, S.D. Bhagwan, K. Scharffetter-Kochanek, A.L. Beaudet, and C.M. Doerschuk**, Neutrophil emigration in the skin, lungs, and peritoneum: different requirements for CD11/CD18 revealed by CD18-deficient mice. *J Exp Med*, 1997. 186(8): p. 1357-64.
73. **Weiland, J.E., W.B. Davis, J.F. Holter, J.R. Mohammed, P.M. Dorinsky and J.E. Gadek**, Lung neutrophils in the adult respiratory distress syndrome. Clinical and pathophysiologic significance. *Am Rev Respir Dis*, 1986. 133(2): p. 218-25.
74. **Cochrane, C.G., R.G. Spragg, S.D. Revak, A.B. Cohen and W.W. McGuire**, The presence of neutrophil elastase and evidence of oxidation activity in bronchoalveolar lavage fluid of patients with adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 1983. 127(2): p. S25-7.
75. **Ricou, B., L. Nicod, S. Lacraz, H.G. Welgus, P.M. Suter and J.M. Dayer**, Matrix metalloproteinases and TIMP in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996. 154(2 Pt 1): p. 346-52.
76. **Chabot, F., J.A. Mitchell, J.M. Gutteridge and T.W. Evans**, Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J*, 1998. 11(3): p. 745-57.
77. **Kawano, T., S. Mori, M. Cybulsky, R. Burger, A. Ballin, E. Cutz, and A.C. Bryan**, Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol (1985)*, 1987. 62(1): p. 27-33.
78. **O'Dea, K.P., M.R. Wilson, J.O. Dokpesi, K. Wakabayashi, L. Tatton, N. van Rooijen, and M. Takata**, Mobilization and margination of bone marrow Gr-1high monocytes during subclinical endotoxemia predisposes the lungs toward acute injury. *J Immunol*, 2009. 182(2): p. 1155-66.
79. **Wilson, M.R., K.P. O'Dea, D. Zhang, A.D. Shearman, N. van Rooijen and M. Takata**, Role of lung-marginated monocytes in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2009. 179(10): p. 914-22.
80. **Opitz, B., V. van Laak, J. Eitel and N. Suttorp**, Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 2010. 181(12): p. 1294-309.

81. **Ogawa, E.N., A. Ishizaka, S. Tasaka, H. Koh, H. Ueno, F. Amaya, M. Ebina, S. Yamada, Y. Funakoshi, J. Soejima, K. Moriyama, T. Kotani, S. Hashimoto, H. Morisaki, E. Abraham, and J. Takeda**, Contribution of high-mobility group box-1 to the development of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. 174(4): p. 400-7.
82. **Dudek, S.M. and J.G. Garcia**, Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol (1985)*, 2001. 91(4): p. 1487-500.
83. **Lee, W.L. and A.S. Slutsky**, Sepsis and endothelial permeability. *N Engl J Med*, 2010. 363(7): p. 689-91.
84. **Corada, M., M. Mariotti, G. Thurston, K. Smith, R. Kunkel, M. Brockhaus, M.G. Lampugnani, I. Martin-Padura, A. Stoppacciaro, L. Ruco, D.M. McDonald, P.A. Ward, and E. Dejana**, Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(17): p. 9815-20.
85. **Tinsley, J.H., P. De Lanerolle, E. Wilson, W. Ma and S.Y. Yuan**, Myosin light chain kinase transference induces myosin light chain activation and endothelial hyperpermeability. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2000. 279(4): p. C1285-9.
86. **Wysolmerski, R.B. and D. Lagunoff**, Regulation of permeabilized endothelial cell retraction by myosin phosphorylation. *Am J Physiol*, 1991. 261(1 Pt 1): p. C32-40.
87. **Shen, Q., R.R. Rigor, C.D. Pivetti, M.H. Wu and S.Y. Yuan**, Myosin light chain kinase in microvascular endothelial barrier function. *Cardiovasc Res*, 2010. 87(2): p. 272-80.
88. **Rossi, J.L., A.V. Velentza, D.M. Steinhorn, D.M. Watterson and M.S. Wainwright**, MLCK210 gene knockout or kinase inhibition preserves lung function following endotoxin-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. 292(6): p. L1327-34.
89. **Miyahara, T., K. Hamanaka, D.S. Weber, D.A. Drake, M. Anghelescu and J.C. Parker**, Phosphoinositide 3-kinase, Src, and Akt modulate acute ventilation-induced vascular permeability increases in mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. 293(1): p. L11-21.
90. **Wang, B., A. Caluch, R. Fodil, S. Fereol, P. Zadigue, G. Pelle, B. Louis, and D. Isabey**, Force control of endothelium permeability in mechanically stressed pulmonary micro-vascular endothelial cells. *Biomed Mater Eng*, 2012. 22(1-3): p. 163-70.
91. **Mead, J., T. Takishima and D. Leith**, Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol*, 1970. 28(5): p. 596-608.
92. International consensus conferences in intensive care medicine: Ventilator-associated Lung Injury in ARDS. This official conference report was cosponsored

by the American Thoracic Society, The European Society of Intensive Care Medicine, and The Societe de Reanimation de Langue Francaise, and was approved by the ATS Board of Directors, July 1999. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. 160(6): p. 2118-24.

93. **Muller-Redetzky, H.C., N. Suttorp and M. Witzenrath**, Dynamics of pulmonary endothelial barrier function in acute inflammation: mechanisms and therapeutic perspectives. *Cell Tissue Res*, 2014. 355(3): p. 657-73.
94. **Ashbaugh, D.G., D.B. Bigelow, T.L. Petty and B.E. Levine**, Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, 1967. 2(7511): p. 319-23.
95. **Neff MJ, H.L.**, Acute Respiratory Distress Syndrome, in *Clinical Respiratory Medicine*, S.S. Albert R, Jett J, Editor. 2008: Philadelphia, USA. p. 879-894.
96. **Ranieri, V.M., G.D. Rubenfeld, B.T. Thompson, N.D. Ferguson, E. Caldwell, E. Fan, L. Camporota, and A.S. Slutsky**, Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*, 2012. 307(23): p. 2526-33.
97. **Hecker, M., M.A. Weigand and K. Mayer**, Akute respiratorische Insuffizienz. *Internist (Berl)*, 2012. 53: p. 557-566.
98. **Tabeling, C., H. Yu, L. Wang, H. Ranke, N.M. Goldenberg, D. Zabini, E. Noe, A. Krauszman, B. Gutbier, J. Yin, M. Schaefer, C. Arenz, A.C. Hocke, N. Suttorp, R.L. Proia, M. Witzenrath, and W.M. Kuebler**, CFTR and sphingolipids mediate hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015. 112(13): p. E1614-23.
99. **Zapol, W.M. and M.T. Snider**, Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *N Engl J Med*, 1977. 296(9): p. 476-80.
100. **West, J.B. and O. Mathieu-Costello**, Stress failure of pulmonary capillaries: role in lung and heart disease. *Lancet*, 1992. 340(8822): p. 762-7.
101. **Hudson, L.D.**, Survival data in patients with acute and chronic lung disease requiring mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis*, 1989. 140(2 Pt 2): p. S19-24.
102. **Angus, D.C., W.T. Linde-Zwirble, J. Lidicker, G. Clermont, J. Carcillo and M.R. Pinsky**, Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001. 29(7): p. 1303-10.
103. **Vincent, J.L., J. Rello, J. Marshall, E. Silva, A. Anzueto, C.D. Martin, R. Moreno, J. Lipman, C. Gomersall, Y. Sakr, and K. Reinhart**, International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA*, 2009. 302(21): p. 2323-9.
104. **Herold, G.**, Kapitel III Pneumologie, Pneumonien, in *Innere Medizin*. 2013, Gerd Herold: Köln. p. 373-390.

105. **Müller-Redetzky, H., N. Suttorp and M. Witzenrath**, Experimental models of pneumonia-induced sepsis. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2012. 9: p. e23-e32.
106. **Gross, U.**, Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 2006: Stuttgart., Kapitel Systematik der Bakterien, p. 39-41.
107. **Gattarello, S., B. Borgatta, J. Sole-Violan, J. Valles, L. Vidaur, R. Zaragoza, A. Torres, and J. Rello**, Decrease in mortality in severe community-acquired pneumococcal pneumonia: impact of improving antibiotic strategies (2000-2013). *Chest*, 2014. 146(1): p. 22-31.
108. **Yershov, A.L., B.S. Jordan, C.H. Guymon and M.A. Dubick**, Relationship between the inoculum dose of *Streptococcus pneumoniae* and pneumonia onset in a rabbit model. *Eur Respir J*, 2005. 25(4): p. 693-700.
109. **Jedrzejak, M.J.**, Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2001. 65(2): p. 187-207 ; first page, table of contents.
110. **Garcia-Suarez Mdel, M., M.D. Cima-Cabal, N. Florez, P. Garcia, R. Cernuda-Cernuda, A. Astudillo, F. Vazquez, J.R. De los Toyos, and F.J. Mendez**, Protection against pneumococcal pneumonia in mice by monoclonal antibodies to pneumolysin. *Infect Immun*, 2004. 72(8): p. 4534-40.
111. **Yoo, I.H., H.S. Shin, Y.J. Kim, H.B. Kim, S. Jin and U.H. Ha**, Role of pneumococcal pneumolysin in the induction of an inflammatory response in human epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 2010. 60(1): p. 28-35.
112. **Rayner, C.F., A.D. Jackson, A. Rutman, A. Dewar, T.J. Mitchell, P.W. Andrew, P.J. Cole, and R. Wilson**, Interaction of pneumolysin-sufficient and -deficient isogenic variants of *Streptococcus pneumoniae* with human respiratory mucosa. *Infect Immun*, 1995. 63(2): p. 442-7.
113. **Steinfort, C., R. Wilson, T. Mitchell, C. Feldman, A. Rutman, H. Todd, D. Sykes, J. Walker, K. Saunders, P.W. Andrew, and et al.**, Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in vitro. *Infect Immun*, 1989. 57(7): p. 2006-13.
114. **Witzenrath, M., B. Gutbier, A.C. Hocke, B. Schmeck, S. Hippenstiel, K. Berger, T.J. Mitchell, J.R. de los Toyos, S. Rosseau, N. Suttorp, and H. Schutte**, Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med*, 2006. 34(7): p. 1947-54.
115. **Witzenrath, M., B. Gutbier, J.S. Owen, B. Schmeck, T.J. Mitchell, K. Mayer, M.J. Thomas, S. Ishii, S. Rosseau, N. Suttorp, and H. Schutte**, Role of platelet-activating factor in pneumolysin-induced acute lung injury. *Crit Care Med*, 2007. 35(7): p. 1756-62.
116. **Herold, G.**, Kapitel II Kardiol., Sepsis, in *Innere Medizin*. 2013: Köln. p. 326-327.

117. **Vaneker, M., F.J. Halbertsma, J. van Egmond, M.G. Netea, H.B. Dijkman, D.G. Snijdelaar, L.A. Joosten, J.G. van der Hoeven, and G.J. Scheffer**, Mechanical ventilation in healthy mice induces reversible pulmonary and systemic cytokine elevation with preserved alveolar integrity: an in vivo model using clinical relevant ventilation settings. *Anesthesiology*, 2007. 107(3): p. 419-26.
118. **Remick, D.G., G.R. Bolgos, J. Siddiqui, J. Shin and J.A. Nemzek**, Six at six: interleukin-6 measured 6 h after the initiation of sepsis predicts mortality over 3 days. *Shock*, 2002. 17(6): p. 463-7.
119. **Angus, D.C. and T. van der Poll**, Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 2013. 369(21): p. 2063.
120. **Calbo, E. and J. Garau**, Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*, 2010. 35(2): p. 107-13.
121. **Witzenrath, M., B. Schmeck, J.M. Doehn, T. Tschernig, J. Zuhlten, J.M. Loeffler, M. Zemlin, H. Muller, B. Gutbier, H. Schutte, S. Hippenstiel, V.A. Fischetti, N. Suttorp, and S. Rosseau**, Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med*, 2009. 37(2): p. 642-9.
122. **Galley, H.F.**, Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth*, 2011. 107(1): p. 57-64.
123. **Zhang, Q., M. Raouf, Y. Chen, Y. Sumi, T. Sursal, W. Junger, K. Brohi, K. Itagaki, and C.J. Hauser**, Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. *Nature*, 2010. 464(7285): p. 104-7.
124. **Cobb, J.P., T.G. Buchman, I.E. Karl and R.S. Hotchkiss**, Molecular biology of multiple organ dysfunction syndrome: injury, adaptation, and apoptosis. *Surg Infect (Larchmt)*, 2000. 1(3): p. 207-13; discussion 214-5.
125. **Vaschetto, R., J.W. Kuiper, S.R. Chiang, J.J. Haitzma, J.W. Juco, S. Uhlig, F.B. Plotz, F. Della Corte, H. Zhang, and A.S. Slutsky**, Inhibition of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase attenuates ventilator-induced lung injury. *Anesthesiology*, 2008. 108(2): p. 261-8.
126. **Perez-Castells, J., S. Martin-Santamaria, L. Nieto, A. Ramos, A. Martinez, B. Pascual-Teresa, and J. Jimenez-Barbero**, Structure of micelle-bound adrenomedullin: a first step toward the analysis of its interactions with receptors and small molecules. *Biopolymers*, 2012. 97(1): p. 45-53.
127. **McLatchie, L.M., N.J. Fraser, M.J. Main, A. Wise, J. Brown, N. Thompson, R. Solari, M.G. Lee, and S.M. Foord**, RAMPs regulate the transport and ligand specificity of the calcitonin-receptor-like receptor. *Nature*, 1998. 393(6683): p. 333-9.

128. **Kuwasako, K., K. Kitamura, S. Nagata, T. Hikosaka, Y. Takei and J. Kato**, Shared and separate functions of the RAMP-based adrenomedullin receptors. *Peptides*, 2011. 32(7): p. 1540-50.
129. **Zhou, M., I.H. Chaudry and P. Wang**, The small intestine is an important source of adrenomedullin release during polymicrobial sepsis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2001. 281(2): p. R654-60.
130. **Cheung, B.M., I.S. Hwang, C.Y. Li, W.S. O, K.W. Tsang, R.Y. Leung, C.R. Kumana, and F. Tang**, Increased adrenomedullin expression in lungs in endotoxaemia. *J Endocrinol*, 2004. 181(2): p. 339-45.
131. **Agorreta, J., J.J. Zulueta, L.M. Montuenga and M. Garayoa**, Adrenomedullin expression in a rat model of acute lung injury induced by hypoxia and LPS. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. 288(3): p. L536-45.
132. **Poyner, D.R., P.M. Sexton, I. Marshall, D.M. Smith, R. Quirion, W. Born, R. Muff, J.A. Fischer, and S.M. Foord**, International Union of Pharmacology. XXXII. The mammalian calcitonin gene-related peptides, adrenomedullin, amylin, and calcitonin receptors. *Pharmacol Rev*, 2002. 54(2): p. 233-46.
133. **Isumi, Y., H. Shoji, S. Sugo, T. Tochimoto, M. Yoshioka, K. Kangawa, H. Matsuo, and N. Minamino**, Regulation of adrenomedullin production in rat endothelial cells. *Endocrinology*, 1998. 139(3): p. 838-46.
134. **Tomoda, Y., Y. Isumi, T. Katafuchi and N. Minamino**, Regulation of adrenomedullin secretion from cultured cells. *Peptides*, 2001. 22(11): p. 1783-94.
135. **Lopez, J. and A. Martinez**, Cell and molecular biology of the multifunctional peptide, adrenomedullin. *Int Rev Cytol*, 2002. 221: p. 1-92.
136. **Temmesfeld-Wollbruck, B., B. Brell, I. David, M. Dorenberg, J. Adolphs, B. Schmeck, N. Suttorp, and S. Hippenstiel**, Adrenomedullin reduces vascular hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensive Care Med*, 2007. 33(4): p. 703-10.
137. **Temmesfeld-Wollbruck, B., B. Brell, C. zu Dohna, M. Dorenberg, A.C. Hocke, H. Martens, J. Klar, N. Suttorp, and S. Hippenstiel**, Adrenomedullin reduces intestinal epithelial permeability in vivo and in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009. 297(1): p. G43-51.
138. **Hocke, A.C., B. Temmesfeld-Wollbrueck, B. Schmeck, K. Berger, E.M. Frisch, M. Witzenrath, B. Brell, N. Suttorp, and S. Hippenstiel**, Perturbation of endothelial junction proteins by Staphylococcus aureus alpha-toxin: inhibition of endothelial gap formation by adrenomedullin. *Histochem Cell Biol*, 2006. 126(3): p. 305-16.
139. **Honda, M., S. Nakagawa, K. Hayashi, N. Kitagawa, K. Tsutsumi, I. Nagata, and M. Niwa**, Adrenomedullin improves the blood-brain barrier function through the expression of claudin-5. *Cell Mol Neurobiol*, 2006. 26(2): p. 109-18.

140. **Brell, B., B. Temmesfeld-Wollbruck, I. Altschner, E. Frisch, B. Schmeck, A.C. Hocke, N. Suttorp, and S. Hippenstiel**, Adrenomedullin reduces Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced rat ileum microcirculatory damage. *Crit Care Med*, 2005. 33(4): p. 819-26.
141. **Hippenstiel, S., M. Witzenrath, B. Schmeck, A. Hocke, M. Krisp, M. Krull, J. Seybold, W. Seeger, W. Rascher, H. Schutte, and N. Suttorp**, Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res*, 2002. 91(7): p. 618-25.
142. **Yang, S., M. Zhou, I.H. Chaudry and P. Wang**, Novel approach to prevent the transition from the hyperdynamic phase to the hypodynamic phase of sepsis: role of adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1. *Ann Surg*, 2002. 236(5): p. 625-33.
143. **Yang, S., M. Zhou, D.E. Fowler and P. Wang**, Mechanisms of the beneficial effect of adrenomedullin and adrenomedullin-binding protein-1 in sepsis: down-regulation of proinflammatory cytokines. *Crit Care Med*, 2002. 30(12): p. 2729-35.
144. **Brell, B., S. Hippenstiel, I. David, A.R. Pries, H. Habazettl, B. Schmeck, N. Suttorp, and B. Temmesfeld-Wollbruck**, Adrenomedullin treatment abolishes ileal mucosal hypoperfusion induced by Staphylococcus aureus alpha-toxin--an intravital microscopic study on an isolated rat ileum. *Crit Care Med*, 2005. 33(12): p. 2810-016.
145. **Nishikimi, T., T. Karasawa, C. Inaba, K. Ishimura, K. Tadokoro, S. Koshikawa, F. Yoshihara, N. Nagaya, H. Sakio, K. Kangawa, and H. Matsuoka**, Effects of long-term intravenous administration of adrenomedullin (AM) plus hANP therapy in acute decompensated heart failure: a pilot study. *Circ J*, 2009. 73(5): p. 892-8.
146. **Nagaya, N. and K. Kangawa**, Adrenomedullin in the treatment of pulmonary hypertension. *Peptides*, 2004. 25(11): p. 2013-8.
147. **Nagaya, N., T. Nishikimi, M. Uematsu, T. Satoh, H. Oya, S. Kyotani, F. Sakamaki, K. Ueno, N. Nakanishi, K. Miyatake, and K. Kangawa**, Haemodynamic and hormonal effects of adrenomedullin in patients with pulmonary hypertension. *Heart*, 2000. 84(6): p. 653-8.
148. **Dewachter, L., C. Dewachter and R. Naeije**, New therapies for pulmonary arterial hypertension: an update on current bench to bedside translation. *Expert Opin Investig Drugs*, 2010. 19(4): p. 469-88.
149. **Vecchi, A., C. Garlanda, M.G. Lampugnani, M. Resnati, C. Matteucci, A. Stoppacciaro, H. Schnurch, W. Risau, L. Ruco, A. Mantovani, and et al.**, Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol*, 1994. 63(2): p. 247-54.

150. **Sperling, J., T. Schafer, C. Ziemann, A. Benz-Weiber, O. Kollmar, M.K. Schilling, and M.D. Menger**, Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases. *Clin Exp Metastasis*, 2012. 29(2): p. 91-9.
151. **Quinton, L.J., M.R. Jones, B.E. Robson and J.P. Mizgerd**, Mechanisms of the hepatic acute-phase response during bacterial pneumonia. *Infect Immun*, 2009. 77(6): p. 2417-26.
152. **Rich, P.B., C.D. Douillet, H. Hurd and R.C. Boucher**, Effect of ventilatory rate on airway cytokine levels and lung injury. *J Surg Res*, 2003. 113(1): p. 139-45.
153. **Hotchkiss, J.R., Jr., L. Blanch, G. Murias, A.B. Adams, D.A. Olson, O.D. Wangenstein, P.H. Leo, and J.J. Marini**, Effects of decreased respiratory frequency on ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. 161(2 Pt 1): p. 463-8.
154. **Dhanireddy, S., W.A. Altemeier, G. Matute-Bello, D.S. O'Mahony, R.W. Glenny, T.R. Martin, and W.C. Liles**, Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest*, 2006. 86(8): p. 790-9.
155. **Vaneker, M., L.A. Joosten, L.M. Heunks, D.G. Snijdelaar, F.J. Halbertsma, J. van Egmond, M.G. Netea, J.G. van der Hoeven, and G.J. Scheffer**, Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice. *Anesthesiology*, 2008. 109(3): p. 465-72.
156. **Brun-Buisson, C., C. Minelli, G. Bertolini, L. Brazzi, J. Pimentel, K. Lewandowski, J. Bion, J.A. Romand, J. Villar, A. Thorsteinsson, P. Damas, A. Armaganidis, and F. Lemaire**, Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med*, 2004. 30(1): p. 51-61.
157. **Slutsky, A.S. and L.N. Tremblay**, Multiple system organ failure. Is mechanical ventilation a contributing factor? *Am J Respir Crit Care Med*, 1998. 157(6 Pt 1): p. 1721-5.
158. **Douzinas, E.E., P.D. Tsidemiadou, M.T. Pitaridis, I. Andrianakis, A. Bobota-Chloraki, K. Katsouyanni, D. Sfyra, K. Malagari, and C. Roussos**, The regional production of cytokines and lactate in sepsis-related multiple organ failure. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997. 155(1): p. 53-9.
159. **Plotz, F.B., A.S. Slutsky, A.J. van Vught and C.J. Heijnen**, Ventilator-induced lung injury and multiple system organ failure: a critical review of facts and hypotheses. *Intensive Care Med*, 2004. 30(10): p. 1865-72.
160. **Villar, J., J. Blanco, H. Zhang and A.S. Slutsky**, Ventilator-induced lung injury and sepsis: two sides of the same coin? *Minerva Anesthesiol*, 2011. 77(6): p. 647-53.

161. **Pachl, J., F. Duska, P. Waldauf, M. Fric, J. Fanta and E. Zdarsky**, Apoptosis as an early event in the development of multiple organ failure? *Physiol Res*, 2005. 54(6): p. 697-9.
162. **Nickolas, T.L., K.M. Schmidt-Ott, P. Canetta, C. Forster, E. Singer, M. Sise, A. Elger, O. Maarouf, D.A. Sola-Del Valle, M. O'Rourke, E. Sherman, P. Lee, A. Geara, P. Imus, A. Guddati, A. Polland, W. Rahman, S. Elitok, N. Malik, J. Giglio, S. El-Sayegh, P. Devarajan, S. Hebbar, S.J. Saggi, B. Hahn, R. Kettritz, F.C. Luft, and J. Barasch**, Diagnostic and prognostic stratification in the emergency department using urinary biomarkers of nephron damage: a multicenter prospective cohort study. *J Am Coll Cardiol*, 2012. 59(3): p. 246-55.
163. **van Kaam, A.H., R.A. Lachmann, E. Herting, A. De Jaegere, F. van Iwaarden, L.A. Noorduyt, J.H. Kok, J.J. Haitsma, and B. Lachmann**, Reducing atelectasis attenuates bacterial growth and translocation in experimental pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. 169(9): p. 1046-53.
164. **Itoh, T., H. Obata, S. Murakami, K. Hamada, K. Kangawa, H. Kimura, and N. Nagaya**, Adrenomedullin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. 293(2): p. L446-52.
165. **Charles, P.E., L. Piroth, N. Desbiolles, C. Lequeu, L. Martin, H. Portier, and P. Chavanet**, New model of ventilator-associated pneumonia in immunocompetent rabbits. *Crit Care Med*, 2002. 30(10): p. 2278-83.
166. **Pugin, J., I. Dunn-Siegrist, J. Dufour, P. Tissieres, P.E. Charles and R. Comte**, Cyclic stretch of human lung cells induces an acidification and promotes bacterial growth. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008. 38(3): p. 362-70.
167. **Hammerschmidt, S., S. Wolff, A. Hocke, S. Rosseau, E. Muller and M. Rohde**, Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*, 2005. 73(8): p. 4653-67.
168. **Lachmann, R.A., A.H. van Kaam, J.J. Haitsma and B. Lachmann**, High positive end-expiratory pressure levels promote bacterial translocation in experimental pneumonia. *Intensive Care Med*, 2007. 33(10): p. 1800-4.
169. **van Kaam, A.H., R. Lutter, R.A. Lachmann, J.J. Haitsma, E. Herting, M. Snoek, A. De Jaegere, J.H. Kok, and B. Lachmann**, Effect of ventilation strategy and surfactant on inflammation in experimental pneumonia. *Eur Respir J*, 2005. 26(1): p. 112-7.
170. **Temmesfeld-Wollbruck, B., A.C. Hocke, N. Suttorp and S. Hippenstiel**, Adrenomedullin and endothelial barrier function. *Thromb Haemost*, 2007. 98(5): p. 944-51.
171. **Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, N. Varela, G. Robledo and M. Delgado**, Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response. *Am J Pathol*, 2006. 168(6): p. 1921-30.

172. **Talero, E., R. Di Paola, E. Mazzon, E. Esposito, V. Motilva and S. Cuzzocrea**, Anti-inflammatory effects of adrenomedullin on acute lung injury induced by Carrageenan in mice. *Mediators Inflamm*, 2012. 2012: p. 717851.
173. **Hotchkiss, R.S., K.W. Tinsley, P.E. Swanson, R.E. Schmiegl, Jr., J.J. Hui, K.C. Chang, D.F. Osborne, B.D. Freeman, J.P. Cobb, T.G. Buchman, and I.E. Karl**, Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol*, 2001. 166(11): p. 6952-63.
174. **Chang, K.C., J. Unsinger, C.G. Davis, S.J. Schwulst, J.T. Muenzer, A. Strasser, and R.S. Hotchkiss**, Multiple triggers of cell death in sepsis: death receptor and mitochondrial-mediated apoptosis. *FASEB J*, 2007. 21(3): p. 708-19.
175. **Unsinger, J., J.S. McDonough, L.D. Shultz, T.A. Ferguson and R.S. Hotchkiss**, Sepsis-induced human lymphocyte apoptosis and cytokine production in "humanized" mice. *J Leukoc Biol*, 2009. 86(2): p. 219-27.
176. **Hotchkiss, R.S., P.E. Swanson, B.D. Freeman, K.W. Tinsley, J.P. Cobb, G.M. Matuschak, T.G. Buchman, and I.E. Karl**, Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. *Crit Care Med*, 1999. 27(7): p. 1230-51.
177. **Tinsley, K.W., M.H. Grayson, P.E. Swanson, A.M. Drewry, K.C. Chang, I.E. Karl, and R.S. Hotchkiss**, Sepsis induces apoptosis and profound depletion of splenic interdigitating and follicular dendritic cells. *J Immunol*, 2003. 171(2): p. 909-14.
178. **Parrino, J., R.S. Hotchkiss and M. Bray**, Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. *Emerg Infect Dis*, 2007. 13(2): p. 191-8.
179. **Chaung, W.W., R. Wu, Y. Ji, Z. Wang, W. Dong, C. Cheyuo, L. Qi, X. Qiang, H. Wang, and P. Wang**, Peripheral administration of human adrenomedullin and its binding protein attenuates stroke-induced apoptosis and brain injury in rats. *Mol Med*, 2011. 17(9-10): p. 1075-83.
180. **Zhou, M., H.H. Simms and P. Wang**, Adrenomedullin and adrenomedullin binding protein-1 attenuate vascular endothelial cell apoptosis in sepsis. *Ann Surg*, 2004. 240(2): p. 321-30.
181. **Allaker, R.P., P.W. Grosvenor, D.C. McAnerney, B.E. Sheehan, B.H. Srikanta, K. Pell, and S. Kapas**, Mechanisms of adrenomedullin antimicrobial action. *Peptides*, 2006. 27(4): p. 661-6.
182. **Allaker, R.P., C. Zihni and S. Kapas**, An investigation into the antimicrobial effects of adrenomedullin on members of the skin, oral, respiratory tract and gut microflora. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1999. 23(4): p. 289-93.

## 8 Anhang

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

% Vol.	Volumenprozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
6h vent.	Sechsstündige Beatmung
Abb.	Abbildung
AECC	American-European Consensus Conference
AF	Atemfrequenz
ALT	Alanin-Aminotransferase
AM	Adrenomedullin
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i> (Akutes respiratorisches Insuffizienz-Syndrom)
AST	Aspartat-Aminotransferase
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BALF	Bronchoalveoläre Lavage Flüssigkeit
BI6	Black 6
CAP	Community-acquired pneumonia (ambulant erworbene Pneumonie)
CC3 <sup>+</sup>	Cleaved Caspase 3
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA (komplementäre DNA)
CGRP	Calcitonin-gene related peptide
chSA	Konzentration des Humanen Serum-Albumins
Cm	Zentimeter
cmH <sub>2</sub> O	Zentimeter Wassersäule
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COMP	Committee for Orphan Medicinal Products
CPL	Cecal puncture and ligation (Zökumpunktion und -ligatur)
CRLR	Calcitonin receptor- like receptor
CT	Cycle threshold
DAB	3,3'-Diaminobenzidin

DI	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EMA	European Medicines Agency
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting (Durchflusszytometrie)
FAK	fokal adhesion kinase
FasL	Fas-Ligand
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
Fg	Femtogramm
FiO <sub>2</sub>	Inspiratorischer Sauerstoffanteil
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
GOI	Gene of Interest
H	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogenkarbonat
Hg	Quecksilber
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HKG	House-Keeping Gene
HSA	Humanes Serum-Albumin
I.E.	Internationale Einheiten
ICAM	Intracellular adhesion molecule (intrazelluläres Adhäsionsmolekül)
Ig	Immunglobulin
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IU	International Units (Internationale Einheiten)
KbE	Kolonie-bildende Einheit
KC	keratinocyte-derived cytokine
KG	Kontrollgruppe
Kg	Kilogramm
L	Liter
LM	Lösungsmittel
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCP	Monocyte Chemoattractant Protein

MEM	Minimal essential medium
min	Minute
MIP	Macrophage inflammatory protein
ml	Milliliter
MLC	Myosin light chain
MLCK	Myosin light chain kinase
mm	Millimeter
mM	Millimol
MOV	Multiorganversagen
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MV	Mechanical ventilation (maschinelle Beatmung)
MW	Mittelwert
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NB	Nicht beatmet
NF-κB	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NGAL	Neutrophile gelatinase-associated Lipocalin
nM	Nanomol
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
o.g.	oben genannt
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
P/F-Quotient/ P/F-Ratio	Quotient aus PaO <sub>2</sub> und FiO <sub>2</sub>
PaO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphat-Buffered Saline
PCLS	precision cut lung slices
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PEEP	positiver end-expiratorischer Druck
PerCP	Peridinin-chlorophyll Proteine
PFA	Paraformaldehyd
Pg	Pikogramm
PIP	Peak Inspiratory Pressure (Atemwegsspitzenndruck)
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
qRT-PCR	Quantitative real-time (Echtzeit)-Polymerase Kettenreaktion

RAMP	Receptor-activity modifying protein
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
<i>S.p.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
sCAP	Severe community-acquired pneumonia (schwere ambulant erworbene Pneumonie)
sek	Sekunde
SEM	Standard Error of Mean (Standardfehler)
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
sog.	sogenannt
SPF-Haltung	Spezifisch pathogenfreie Haltung
Tab.	Tabelle
THY	Todd Hewitt Yeast
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
US/ USA	United States of America/ Vereinigte Staaten von Amerika
VE-cadherin	Vascular endothelial -cadherin
VILI	<i>Ventilator-induced lung injury</i>
$V_t$	Tidalvolumen

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
<b>Abbildung 1</b>	Regulation endothelialer Permeabilität durch verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden	17
<b>Abbildung 2</b>	Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung pulmonaler Leukozyten mittels Durchflusszytometrie	37
<b>Abbildung 3</b>	Exemplarische Differenzierung und Quantifizierung von Leukozyten im Blut mittels Durchflusszytometrie	38
<b>Abbildung 4</b>	Regulation der Expression von Adrenomedullin (AM) und seinen Rezeptorkomponenten unter Beatmung bei Pneumonie	51
<b>Abbildung 5</b>	Immunfluoreszenz-Markierung von Adrenomedullin (AM) und dem endothelialen Zellmarker CD31 im Lungenparenchym	51
<b>Abbildung 6</b>	Expression von Adrenomedullin (AM) bei Pneumonie und unter Beatmung	52
<b>Abbildung 7</b>	Spezifitätskontrolle des Antikörpers durch Präadsorption mit synthetischem Peptid Adrenomedullin (AM)	52
<b>Abbildung 8</b>	Adrenomedullin schützte Mäuse mit Pneumonie vor beatmungs-induziertem Lungenschaden (VILI)	54
<b>Abbildung 9</b>	Adrenomedullin reduzierte die Hypoxie- und U46619-induzierte Vasokonstriktion in Precision Cut Lung Slices	55
<b>Abbildung 10</b>	Beatmung führte zu einer Erhöhung der pulmonalen Zytokinspiegel bei Pneumonie unabhängig von der Leukozytenzahl	57
<b>Abbildung 11</b>	Sechsstündige Beatmung hatte keinen Einfluss auf das bakterielle Wachstum und die systemische Bakterienverteilung	58
<b>Abbildung 12</b>	Sechsstündige Beatmung induzierte systemische Hyperinflammation bei der Pneumonie	59
<b>Abbildung 13</b>	Sechsstündige Beatmung induzierte eine Leukopenie bei Pneumonie	61
<b>Abbildung 14</b>	Adrenomedullin schützte vor beatmungs-induzierter Leber- und Darmschädigung bei Mäusen mit Pneumonie	64
<b>Abbildung 15</b>	Beatmung und Pneumonie resultieren in Nierenschädigung	65

## 8.3 Tabellenverzeichnis

	<b>Titel</b>	<b>Seite</b>
<b>Tabelle 1</b>	Definition akutes Lungenversagen (Acute Respiratory Distress Syndrom, ARDS)	18
<b>Tabelle 2</b>	Einteilung der Tiere in sechs Versuchsgruppen	35
<b>Tabelle 3</b>	Zusammensetzung des Synthese-Mixes für die reverse Transkription der RNA in cDNA	41
<b>Tabelle 4</b>	Zusammensetzung des Master Mixes für die quantitative Real-Time-PCR	42
<b>Tabelle 5</b>	Primer Sequenzen der quantitativen Real-Time-PCR	44

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Daniel Will, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Beatmungsassoziierter Lungenschaden bei Pneumokokkenpneumonie – therapeutisches Potenzial von Adrenomedullin“ 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 Betreuer, 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

Daniel Will \_\_\_\_\_

## Anteilerklärung an erfolgten Publikationen

Herr Daniel Will hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

### Publikation 1:

**Muller-Redetzky, H.C., D. Will, K. Hellwig, W. Kummer, T. Tschernig, U. Pfeil, R. Paddenberg, M. Menger, O. Kershaw, A. Gruber, N. Weissmann, S. Hippenstiel, N. Suttorp, M. Witzenrath.**, Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin. *Crit Care*, 2014. 18(2): p. R73.

Beitrag im Einzelnen: Der Promovend hat die experimentellen Modelle und Methoden unter Anleitung entwickelt bzw. weiterentwickelt. Selbstständig wurden sowohl in-vivo-Experimente als auch weiterführende Experimente der Gewebe wie ELISA, Durchflusszytometrie und Vorbereitung der Gewebe für anschließende Versuche durchgeführt. Der Promovend hat die entsprechenden Experimente unter Supervision ausgewertet. Er war an der Erstellung des Manuskriptes beteiligt.

### Publikation 2:

**Muller-Redetzky, H.C., W. Kummer, U. Pfeil, K. Hellwig, D. Will, R. Paddenberg, C. Tabeling, S. Hippenstiel, N.Suttorp, M. Witzenrath.** Intermedin stabilized endothelial barrier function and attenuated ventilator-induced lung injury in mice. *PLoS One*, 2012. 7(5): p. e35832

Beitrag im Einzelnen: Der Promovend hat sowohl in-vivo- Experimente, als auch weiterführende Experimente der Gewebe wie ELISA, Durchflusszytometrie und Vorbereitung der Gewebe für anschließende Versuche selbständig unter Supervision durchgeführt. Der Promovend hat die entsprechenden Experimente unter Supervision ausgewertet. Er war an der Erstellung des Manuskriptes beteiligt

Unterschrift, Datum Stempel des betreuenden Hochschullehrers  
(Prof. Dr. Martin Witzenrath)

Daniel Will \_\_\_\_\_

## Danksagung

Zu allererst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Martin Witzernath für die Möglichkeit der Durchführung einer experimentellen Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe danken. Unter seiner Leitung war es mir möglich, unter hervorragenden Arbeitsbedingungen einen Einblick in das grundlagenwissenschaftliche Arbeiten zu erlangen. Seine stets wertvollen Ratschläge und konstruktiven Beiträge waren wesentlich auf dem Weg der Entstehung meiner Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt meinem Mentor Herrn Dr. Holger Müller-Redetzky für die Zusammenarbeit und die Betreuung meiner Arbeit. Mit seiner Leidenschaft für die klinische und wissenschaftliche Medizin war er stets eine Motivation und Stütze auf dem Weg dieser Arbeit. Die zahlreichen Gedankenaustausche und Diskussionen waren zur Fertigstellung dieser Arbeit unersetzlich.

Besonders danke ich auch Herrn Univ. Prof. Dr. Norbert Suttrop für das Ermöglichen meiner Forschungsarbeiten in der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie.

Dr. Birgitt Gutbier, Dr. Katrin Reppe, Dr. Christoph Tabeling und Dr. Jan-Moritz Doehn möchte ich für die jederzeit vorhandene Hilfsbereitschaft, Geduld und Kritik danken.

Für meine treueste Wegbegleiterin Katharina Hellwig mit einem hervorragenden Sinn für gute Musik gilt mein besonderer Dank.

Meinen Genossen Dr. Daniel Lorenz, Katja Fischer, Dr. Anne-Kathrin Neuhaus, Carla Rosa Gonzáles Calera, Dr. Elena Noe und Siegfried Breitling bin ich dankbar für das Teilen des gemeinsamen Weges. Ohne Euch wären mir viele spaßige Momente entgangen.

Ich danke ferner Dr. Sandra-Maria Wienhold für ihre kritischen Anmerkungen und Ratschläge in Bezug auf den Methoden-Teil.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, Agathe und Peter Will, die mich auf meinem Werdegang stets unterstützten, mir das Studium der Humanmedizin ermöglichten und unter deren und dem Einfluss meiner Schwestern Anke und Julia ich zu der Person werden durfte, welche ich heute bin.

Ein großer Dank an Jan Diedrich und Dr. Jasmin Lienau für die lektorische Hilfe dieser Arbeit.

Ein besonderer Dank gilt Dr. Theresa Kalthofen, mit deren Unterstützung, Geduld und konstruktiver Kritik ich diese Arbeit zum Abschluss bringen konnte.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Wolfgang Kummer, Prof. Dr. Thomas Tschernig, Prof. Dr. Michael D. Menger, Dr. Olivia Kershaw und Prof. Dr. Achim D. Gruber für das Erstellen der histologischen Bilder, Dr. Uwe Pfeil für die Durchführung der qRT-PCR und Dr. Renate Paddenberg für die Durchführung der Experimente der Precision Cut Lung Slices.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf ist in der elektronischen Version der Dissertation aus datenschutzrechtlichen Gründen nicht erhalten.