

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

DISSERTATION

Neue Strategien zur Prophylaxe und Therapie des Lungenversagens bei Beatmung und Pneumonie

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Holger Christian Müller

aus Braunschweig

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. M. Witzenrath
2. Prof. Dr. med. C. Grohé
3. Priv.-Doz. Dr. A. Braun

Datum der Promotion: 8. April 2011

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt.....	4
Einleitung	5
Beatmungsassoziierte Lungenschädigung – ventilator induced lung injury (VILI)	5
Adrenomedullin	5
Simvastatin.....	6
Beatmungsassoziierte Pneumonie	6
Methodik	6
Versuchstiere	6
Mausmodelle des Beatmungsassoziierten Lungenschadens.....	6
Behandlung mit Adrenomedullin	7
Behandlung mit Simvastatin	7
Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie	8
Behandlung mit MALP-2.....	8
Ergebnisse	8
I VILI – adjuvante pharmakologische Therapien	8
I.I. Adrenomedullin zur adjuvanten Therapie des VILI.....	8
AM reduzierte pulmonalvaskuläre Permeabilität bei VILI	8
AM verbesserte die Oxygenierungskapazität bei VILI	8
AM hemmte die VILI-induzierte Phosphorylierung der Myosinleichtkette (MLC) in der Lunge	9
AM reduzierte die VILI-induzierte Leukozyteninfiltration des Alveolarraums.....	9
AM reduzierte den VILI-induzierten Anstieg des Laktatspiegels im Blut	9
AM schützte vor VILI-induzierter Störung der Nierenfunktion.....	9
VILI induzierte eine pulmonale und systemische Entzündungsreaktion, die nicht durch AM messbar beeinflusst wurde	9
Verzögerte AM Therapie limitierte VILI und VILI-induzierte Mikrozirkulationsstörung in einem Langzeitmodell des Beatmungsassoziierten Lungenschadens.....	9
I.II. Simvastatin zur adjuvanten Therapie des VILI	10
Simvastatin schützte vor Permeabilität und Störung der Oxygenierungskapazität bei VILI	10
Simvastatin hemmte die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Gr-1 ^{high} Monozyten in die Lunge unter Beatmung.....	10
Simvastatin limitierte die VILI-induzierte pulmonale Zytokinproduktion	10
II Prophylaktische Immunmodulation vor schwerer Pneumonie	10
II.I. MALP-2	10
MALP-2 induzierte die Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge und verbesserte das Überleben bei schwerer Pneumokokkenpneumonie.....	10
Die MALP-2 induzierte Produktion von Zytokinen und die Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge waren TLR-2 abhängig	10
MALP-2 induzierte die Expression von TLR-2 in Mauslungen und humanen Atemwegsepithelien.....	11
MALP-2 führte zur vermehrten Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge bei Pneumonie	11
MALP-2 veränderte die Freisetzung von CCL-5 und IL-10 bei Pneumonie	11
MALP-2 Therapie reduzierte die Bakteriämie und veränderte die Verteilung von Pneumokokken in der Lunge bei Pneumonie.....	11
Diskussion.....	11
Zusammenfassung und Ausblick.....	14
Anteilsklärung.....	20
Lebenslauf Holger Christian Müller.....	21
Publikationsliste.....	21
Selbständigkeitserklärung	26
Danksagung	27

Abstrakt

Hintergrund: Beatmungsassoziierte Lungenschädigung (VILI; Ventilator-induced lung injury) trägt wesentlich zur Mortalität und Morbidität von Patienten mit Lungenversagen (ALI/ARDS, Acute Lung injury/Acute respiratory distress syndrome) bei. „Lungenprotektive“ Beatmung ist bis dato die einzige Intervention, die Mortalität bei ARDS nachweislich senkt. Jedoch kommt es auch unter lungenprotektiver Beatmung, insbesondere in vorgeschädigten Lungen wie bei Sepsis oder Pneumonie, zum Auftreten von VILI. 30-45 % aller Patienten mit ALI/ARDS entwickeln dieses auf dem Boden einer Pneumonie oder pneumogenen Sepsis. Zusätzlich zur protektiven Beatmung könnten neue adjuvante pharmakologische Therapiestrategien die beatmungsassoziierte Lungenschädigung weiter limitieren. In dieser Arbeit wurden Adrenomedullin und Simvastatin hinsichtlich eines protektiven Effektes gegenüber VILI untersucht. Adrenomedullin ist ein endogenes Peptid mit stabilisierenden Effekten auf die endotheliale Barrierefunktion, das in verschiedenen experimentellen Modellen des ALI eine günstige Wirkung aufwies. Simvastatin, ein Hydroxymethylglutaryl-CoA Reduktase Hemmer, hat ebenfalls günstige Effekte auf die vaskuläre Barrierefunktion und birgt antiinflammatorisches Potential.

In zahlreichen klinischen Situationen ist die Gefahr, eine Pneumonie zu entwickeln erhöht. Hierzu gehören Beatmung, Immunsuppression, Schlaganfall und Influenzainfektion. Die prophylaktische Aktivierung des wirtseigenen Immunsystems könnte die Entwicklung der Pneumonie verhindern oder dessen Schweregrad günstig beeinflussen. Mittels des TLR-2/6 (Toll like receptor -2/6) Agonisten MALP-2 (macrophage-activating-lipoprotein of 2 kDa) wurde in dieser Arbeit das pulmonale Immunsystem von Mäusen aktiviert und der Effekt auf den Verlauf einer schweren Pneumokokken-Pneumonie untersucht.

Methoden: Mäuse wurden mit unterschiedlichen Beatmungseinstellungen (Tidalvolumen/PEEP 7/6, 12/2, 17/0 ml/kg / cmH₂O) für 2 oder 6 h beatmet und mit einer kontinuierlichen Infusion von Adrenomedullin (0,05 mg/kg/h) therapiert, oder mit parenteralen Injektionen von Simvastatin 24 h und 1 h vor Beginn der Beatmung (20 mg/kg) behandelt. Mäuse wurden intratracheal mit MALP-2 behandelt und 24 h später transnasal mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert.

Ergebnisse: Unter Beatmung entwickelte sich VILI, gekennzeichnet durch das Auftreten von pulmonalvaskulärer Permeabilität, eingeschränkter Oxygenierung, pulmonaler Leukozytenrekutierung und proinflammatorischer Zytokinliberation, sowie einer systemischen Entzündungsreaktion, die mit Störungen der Mikrozirkulation und einer Nierenfunktionsstörung einher ging. Die Therapie mit Adrenomedullin oder Simvastatin reduzierte die pulmonalvaskuläre Permeabilität, verbesserte die Oxygenierungskapazität der Lunge und reduzierte den pulmonalen Leukozyteneinstrom. Des Weiteren verhinderte die Behandlung mit Adrenomedullin das Auftreten von Mikrozirkulationsstörungen sowie Beeinträchtigungen der Nierenfunktion und schützte auch dann noch vor VILI, wenn die Therapie erst 2 h nach dem Beginn der sechsständigen Beatmung initiiert wurde. Insbesondere Simvastatin verhinderte das Auftreten von Endothelzellschäden und reduzierte die pulmonale Sekretion proinflammatorischer Zytokine.

MALP-2 induzierte einen TLR-2 abhängigen Einstrom von neutrophilen Granulozyten und eine erhöhte Expression von TLR-2 in den Lungen der Individuen. MALP-2 vorbehandelte Mäuse zeigten dosisabhängig ein verbessertes Überleben der Pneumokokken-Pneumonie. Darüber hinaus wurden eine vermehrte pulmonale Rekrutierung neutrophiler Granulozyten und eine verbesserte parenchymale Erregerelimination in der Lunge beobachtet. Die Vorbehandlung mit MALP-2 reduzierte zudem die Bakteriämie. Nach MALP-2 wurde bei Pneumonie pulmonal eine größere Menge des Chemokins CCL5 sezerniert und weniger IL-10 freigesetzt.

Schlussfolgerung: Adrenomedullin und Simvastatin schützten vor VILI im Mausmodell. Darüber hinaus limitierte Adrenomedullin auch systemische Auswirkungen des VILI auf die Mikrozirkulation und die Nierenfunktion. Durch Stimulation des wirtseigenen angeborenen Immunsystems durch MALP-2 konnte der schwere Verlauf einer Pneumokokkenpneumonie verhindert und das Überleben der Versuchstiere verbessert werden. Sowohl die adjuvante Therapie des VILI, als auch die protektive Immunmodulation sind hoffnungsvolle neue Strategien zur Verringerung von Morbidität und Mortalität bei maschineller Beatmung.

Einleitung

Das akute Lungenversagen hat eine Inzidenz von 78,9 Fällen / 100.000 Lebensjahren und trotz der Errungenschaften der modernen Intensivmedizin immer noch eine hohe Mortalität von 38,5 %¹. Das Akute Lungenversagen ist definiert als das plötzliche Auftreten von bilaterale pulmonale Infiltraten im Röntgen-Thorax, einer gravierenden Einschränkung der pulmonalen Gasaustauschkapazität und dem Ausschluss einer ursächlichen akuten Linksherzdekompensation. Es wird weiterhin charakterisiert durch einen pulmonalarteriellen Verschlussdruck von <18 mmHg. Die Gasaustauschkapazität wird durch den Quotienten aus dem arteriellen Sauerstoffpartialdruck und der inspiratorischen Sauerstofffraktion quantifiziert (Horowitz Index). Bei Erfüllen der beiden oben genannten Kriterien und einem Horowitzindex von 200-300 mmHg ist das Akute Lungenversagen als acute lung injury (ALI), bei einem Horowitzindex von <200 mmHg als acute respiratory distress syndrome (ARDS) definiert².

Beatmungsassoziierte Lungenschädigung – ventilator induced lung injury (VILI)

Im Jahr 2000 erbrachte eine große Multicenter Studie des ARDSnetwork den Nachweis, dass die konsequente Reduktion der Tidalvolumina auf 6 ml/kg, die Vermeidung von Plateaudrücken > 30 cmH₂O und die Applikation eines positiven endexpiratorischen Drucks (PEEP) bei der maschinellen Beatmung von ALI/ARDS Patienten die Sterblichkeit im ALI/ARDS um 22 % senken konnte³. Diese Art der lungenprotektiven Beatmung stellt die bis heute mit Abstand wichtigste Innovation in der Therapie des ALI/ARDS dar, die mit einem nachgewiesenen Überlebensvorteil einhergeht.

Grundlage des Designs dieser und einiger Vorgängerstudien war die Beobachtung experimenteller Arbeiten, die zeigten, dass Überdruckbeatmung per se zu Lungenschädigung – VILI – führt^{4,5}. Wichtigste Komponente des VILI ist nicht die mechanische Destruktion von Gewebe durch hohe Beatmungsdrücke. Diese spielt unter lungenprotektiver Beatmung nur noch eine zu vernachlässigende Rolle. Hingegen liegt VILI zugrunde, dass das Lungengewebe in der Lage ist, einen mechanischen Reiz in ein biologisches Signal zu übersetzen. Durch Beatmung wird durch diesen Prozess der Mechanotransduktion u.a. eine pulmonale und systemische Entzündungsreaktion ausgelöst. Es kommt zu Induktion von pulmonaler und systemischer Apoptose und zur Entwicklung von pulmonalvaskulärer Schrankenstörung, aus der ein Hyperpermeabilitäts-Lungenödem resultiert, das zentrale Kennzeichen des ALI/ARDS (s.o.)⁴⁻⁶. Klinische Studien durch Ranieri et al. konnten insbesondere den Zusammenhang zwischen Beatmung und systemischer Inflammation mit resultierendem Multiorganversagen eindrucksvoll belegen^{7,8}. Bemerkenswert ist, dass auch noch unter lungenprotektiver Beatmung VILI ausgelöst wird, und dass insbesondere vorgeschädigtes Lungengewebe z.B. im Rahmen einer Pneumonie oder Sepsis besonders empfänglich für die Entwicklung von VILI ist^{9,10}. Folglich ergibt sich die Notwendigkeit, weitere Strategien zur Limitierung von VILI zusätzlich zur lungenprotektiven Beatmung zu etablieren.

In dieser Arbeit wurden zwei pharmakologische Therapieansätze, Adrenomedullin und Simvastatin, zur Limitierung von VILI in einem Mausmodell untersucht.

Adrenomedullin

Adrenomedullin (AM) ist ein phylogenetisch sehr altes und hochkonserviertes endogenes Peptid, das erstmals 1993 aus einem humanen Phäochromocytompräparat isoliert wurde.

AM wird in Endothelzellen, Epithelzellen, vaskulären glatten Muskelzellen, Herzmuskelzellen und Leukozyten produziert. Es stabilisiert die endotheliale Barrierefunktion, beugt Mikrozirkulationsstörungen vor und besitzt antiinflammatorisches Potential¹¹. Experimentelle Studien belegten ein therapeutisches Potential von AM in Tiermodellen des ALI/ARDS und systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/Sepsis^{12,13}.

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Eigenschaften von AM insbesondere die Protektion der pulmonalvaskulären Barriestörung im VILI therapeutisch beeinflussen können.

Simvastatin

Simvastatin ist ein Pharmakon aus der Gruppe der Statine, das ursprünglich zur Hemmung der Cholesterinsynthese entwickelt und zugelassen wurde. Durch die Hemmung der Hydroxy-Methyl-Glutaryl-CoA Reduktase wird durch Simvastatin aber auch die Synthese von Farnesyl-Pyrophosphat und Geranylgeranyl-Pyrophosphat unterbrochen. Diese Lipide wiederum sind essentiell zur Prenylierung von intrazellulären Proteinen z.B. der Rho Familie. Durch die Veränderung des Prenylierungsstatus verändert sich deren Aktivität. Es kommt zur Hemmung von Entzündungsreaktionen und zur Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion¹⁴⁻¹⁶. In Tiermodellen der Sepsis und des ALI/ARDS hatte Simvastatin dadurch einen deutlichen therapeutischen Effekt¹⁷⁻²⁴. Auch beim Menschen senkte Simvastatin die inflammatorische Antwort auf inhaliertes Lipopolysaccharid²⁵. Vor diesem Hintergrund erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung des therapeutischen Potentials von Simvastatin zur Limitierung von VILI im Mausmodell.

Beatmungsassoziierte Pneumonie

In verschiedenen klinischen Situationen ist das Risiko eine Pneumonie zu entwickeln vorübergehend erhöht. Dazu gehören transiente Immunsuppression, pulmonale Influenza-Infektion, Schlaganfall und invasive Beatmung²⁶⁻²⁸. Ziel einer adjuvanten Pharmakotherapie könnte es sein, in diesen Risikokollektiven die Entstehung einer Pneumonie mit seiner schlechten Prognose und Gefahr der Progression in ein akutes Lungenversagen zu verhindern. Unter anderem könnte bei Risikopatienten das körpereigene Immunsystem so "vorbereitet" werden, dass die Abwehrkompetenz gegenüber den eindringenden Pathogenen effektiv gestärkt wird²⁹.

Das macrophage activating lipopeptide of 2 kDa (MALP-2) ist ein spezifischer Agonist des Toll like receptor 2 (TLR-2)³⁰⁻³². Der TLR-2 gehört zu der Gruppe der PRRs (pattern recognition receptors). Es handelt sich um einen Rezeptor, der Bakterienantigene wie Lipoproteine, Lipopeptide oder Lipoteichonsäuren erkennt und daraufhin das angeborene Immunsystem aktiviert³³. Die Stimulation dieses Rezeptors mit MALP-2 verbesserte den klinischen Verlauf der polymikrobiellen Sepsis und *Pseudomonas aeruginosa*-Pneumonie im Tiermodell³⁴⁻³⁶.

Der häufigste Erreger der S-CAP ist *Streptococcus pneumoniae*. Die Erkennung des Pathogens und die Einleitung der Wirtsabwehr gegen *S. pneumoniae* ist u.a. abhängig von TLR-2^{37,38}. Vor diesem Hintergrund wurde in einem Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie untersucht, ob die Stimulierung des körpereigenen Immunsystems durch MALP-2 die Abwehrkompetenz gegen *S. pneumoniae* verbessern und die Entwicklung eines ALI/ARDS verhindern kann.

Methodik

Versuchstiere

Beide Komplexe dieser Arbeit wurden in Mausmodellen untersucht. Es wurden dafür 8-15 Wochen alte weibliche Wildtypmäuse (C57Bl/6) und korrespondierende TLR-2 -/- Mäuse verwendet. Alle durchgeführten Eingriffe an Versuchstieren wurden von den Tierschutzbeauftragten der Charité und dem Landesamt für Gesundheit und Soziales vorab genehmigt.

Mausmodelle des Beatmungsassoziierten Lungenschadens

Für die Bearbeitung der Fragestellungen wurden verschiedene VILI-Mausmodelle entwickelt. Ziel war es, Mäuse in unterschiedlichen Beatmungsmodi und mit unterschiedlichem Schädigungspotential beatmen zu können, ohne dass Störungen in der Hämodynamik, des Säure-Basen- oder Elektrolythaushaltes oder der Temperaturhomöostase Einfluss auf die Ergebnisse der Studien nehmen können. Vor diesem Hintergrund wurde ein Monitoring für die Versuchstiere etabliert, das eine kontinuierliche arterielle Blutdruckmessung, eine konstante Aufrechterhaltung der physiologischen Körpertemperatur, eine kontinuierliche Messung von Atemwegsdruck, Tidalvolumen und Atemfrequenz, sowie die Bilanzierung der Flüssigkeitshomöostase durch kontrollierte Infusion und Messung der Urinproduktion via Blasenkatheter beinhaltete.

Es kamen drei Beatmungsprotokolle zum Einsatz. *(i) LV_T (low tidal volume): Beatmung mit Tidalvolumen (V_T) 7 ml/kg, PEEP (positive endexpiratory pressure) 6 cmH₂O für 2 h.* Dieser Modus orientiert sich an den Maßgaben der lungenprotektiven Beatmung beim Menschen mit niedrigen Tidalvolumina und hohem PEEP, unter dem jedoch bei der Maus noch typische Merkmale des VILI wie die Entwicklung von pulmonalvaskulärer Permeabilität und die Auslösung einer pulmonalen und systemischen Entzündungsreaktion festzustellen waren. *(ii) HV_T (high tidal volume): Beatmung V_T 17 ml/kg, PEEP 0 cmH₂O für 2 h.* Unter diesem Beatmungsmodus wurde mit hohen Tidalvolumina und dem Fehlen eines PEEP VILI provoziert. Dieses Protokoll ist zwar nicht ohne weiteres auf die klinische Situation am Patientenbett übertragbar, es können aber zentrale Mechanismen des VILI in einer relativ kurzen Versuchslaufzeit (insbesondere verglichen mit der oft tagelangen Beatmung von Intensivpatienten) simuliert werden. Dies stellt ein wichtiges Modell zur Untersuchung von Mechanismen der pulmonalen und systemischen Leukozytenrekrutierung und der pulmonalen Schrankenstörung dar. In diesem Modell konnte eine systemische Auswirkung von VILI auf die Mikrozirkulation und Nierenfunktion beobachtet werden. *(iii) 6h Vent: V_T 12 ml/kg, PEEP 2 cmH₂O für 6 h.* Dieses Modell ermöglichte die Untersuchung von VILI über einen längeren Zeitraum und die Verzögerung der therapeutischen Interventionen, so dass nicht nur eine prophylaktische Applikation sondern auch eine therapeutische Applikation von AM untersucht werden konnte. Vor dem Hintergrund der Arbeiten der Gruppe um Gattinoni et al. scheint das applizierte Tidalvolumen von 12 ml/kg in diesem Modell am ehesten dem beatmungsassoziierten mechanischen Stress in ARDS Lungen unter protektiver Beatmung zu entsprechen, so dass dieses Modell der klinischen Situation sehr nahe kommt^{39,40}.

Bei der Beatmung von Patienten mit ALI/ARDS ist oft der Einsatz hoher inspiratorischer Sauerstofffraktionen nötig. Hyperoxie an sich kann eine Lungenschädigung auslösen und VILI aggravieren⁴¹. Zur Evaluation von AM bei VILI wurden die Tiere unter Hyperoxie (inspiratorische Sauerstofffraktion FiO₂ 1,0) beatmet, um sich der klinischen Situation weiter anzunähern. Zur Untersuchung von Simvastatin wurde eine FiO₂ von 0,5 verwendet.

Behandlung mit Adrenomedullin

AM (0,05 mg/kg/h) wurde kontinuierlich infundiert. In den 2 h-Experimenten wurde die AM Infusion mit Beginn der Beatmung, in den 6 h-Experimenten 2 h nach Beginn der Beatmung initiiert und jeweils bis zum Ende des Experiments durchgeführt.

Behandlung mit Simvastatin

Den Mäusen wurde 24 h und 1 h vor Beginn des Beatmungsversuches 20 mg/kg Simvastatin intraperitoneal injiziert.

Der Schweregrad des VILI sowie der Einfluss von AM und Simvastatin auf die Ausprägung des VILI in den behandelten Versuchstieren wurde durch die Messung von mehreren Parametern des akuten Lungenschadens bestimmt.

Die pulmonalvaskuläre Permeabilität wurde gemessen, indem der Übertritt vorab injizierten Humanen Serumalbumins (HSA) vom Blut in den Alveolarraum mittels ELISA in bronchoalveolärer Lavageflüssigkeit (BALF) quantifiziert wurde und der Quotient aus der HSA-Konzentration in BALF und Serum gebildet wurde. Darüber hinaus wurde mit Evans-Blue Dye konjugiertes vorab injiziertes HSA, das bei gestörter pulmonalvaskulärer Barrierefunktion in das Lungengewebe übertreten konnte, direkt spektrometrisch nachgewiesen. Die Analyse der pulmonalen Gasaustauschkapazität erfolgte durch Messung der arteriellen Blutgase und der peripheren Sauerstoffsättigung. Des Weiteren wurden Leukozyten in der BALF, im Lungenhomogenat sowie im Blut der Versuchstiere quantifiziert und mittels Durchflusszytometrie differenziert, so dass die systemische Liberation und pulmonale Invasion von Leukozyten im Vergleich mit nicht-beatmeten und behandelten Tieren beurteilt werden konnte. Zytokine wurden durch die Multiplex Assay Technik in Blut, BALF und Lungenhomogenat bestimmt. Die ultrastrukturelle Analyse der Schädigung des pulmonalvaskulären Endothels erfolgte unter Verwendung der Elektronenmikroskopie. Durch die Messung von AST, ALT, Kreatinin, Cystatin C und Lactat im Plasma bzw. Vollblut, sowie der Messung der Urinproduktion konnten die Leber- und Nierenfunktion, sowie die Auswirkung auf die Mikrozirkulation der Tiere objektiviert werden. Ferner wurde durch

Western-Blot-Analysen der Einfluss von Beatmung und der Therapie mit AM auf den Phosphorylierungsstatus der Myosinleichtketten untersucht.

Modell der murinen Pneumokokkenpneumonie

Die Mäuse wurden unter Narkose transnasal mit *S. pneumoniae* (Serotyp 3, Stamm NCTC7978) infiziert. Es handelt sich um einen humanpathogenen Pneumokokkenstamm, der beim Menschen schwere Pneumonien und Sepsis verursacht. In Abhängigkeit von der Infektionsdosis entwickeln Mäuse in diesem Modell eine schwere Pneumonie mit Übergang in eine Sepsis und ein ALI/ARDS⁴². Um den Einfluss einer MALP-2 Therapie auf das Überleben der Tiere zu untersuchen, wurde eine (approximative) Sterblichkeitsanalyse durchgeführt. Die Mäuse wurden mit einer Dosis von $7,5 \times 10^4$ Pneumokokken infiziert und für 10 Tage beobachtet. Körpermasse und Körpertemperatur wurden in 12 h-Intervallen dokumentiert. Nach einem definierten Protokoll wurde der Gesundheitszustand der Mäuse beurteilt und moribunde Tiere euthanasiert. Für die weiteren Analysen wurden die Tiere mit 1×10^6 *S. pneumoniae* infiziert, was in 100% der unbehandelten Wildtypmäuse zu Pneumonie und Sepsis führte, ähnlich dem schweren Verlauf der Erkrankung bei Patienten. Ferner birgt dieses Modell den Vorteil, dass hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs der Pneumonie sehr geringe Abweichungen entstehen und so die Streuung der analysierten Parameter im Vergleich zu niedrigeren Infektionsdosen reduziert werden.

Behandlung mit MALP-2

Synthetisiertes und gereinigtes MALP-2³¹ wurde in 30% 2-Propanol/H₂O gelöst und in 0,9% NaCl verdünnt. Narkotisierten Mäusen wurden 0,1, 0,5 oder 2,0 µg MALP-2 in einem Volumen von 30 µl intratracheal verabreicht. Die Applikation von MALP-2 erfolgte in Infektionsversuchen 24 h vor der Infektion. Ziel der intratrachealen Applikation von MALP-2 war, das pulmonale angeborene Immunsystem gezielt zu aktivieren, ohne eine systemische Inflammation auszulösen.

Die Effekte von MALP-2 auf die Abwehrkompetenz der Tiere wurden durch die Bestimmung des pulmonalen Leukozyteneinstroms mittels Durchflusszytometrie (s.o.), durch die Messung pulmonaler und systemischer Zytokinpiegel unter Verwendung der Multiplex Assay Technik (s.o.), durch Quantifizierung der pulmonalen und systemischen Erregerlasten der Tiere, sowie durch die Analyse der Sterblichkeit und weiterer klinischer Parameter wie Körpermasse und Körpertemperatur der Tiere nach der Infektion erfasst. Morphologische Analysen der Pneumonie und der Pneumokokkenverteilung erfolgten mit Hilfe von immunhistologischen Untersuchungen. Weiterhin wurde eine Quantifizierung der TLR-2 Expression auf mRNA und Protein Ebene mittels RT-PCR und Western-Blot-Analysen in murinem Lungengewebe und in einer humanen Alveolarepithelzelllinie (A549) nach Stimulation mit MALP-2 durchgeführt. Durch die Verwendung TLR-2 defizienter Mäuse konnte die Abhängigkeit der beobachteten MALP-2 Effekte vom TLR-2 Rezeptor untersucht werden.

Ergebnisse

I VILI – adjuvante pharmakologische Therapien

I.1. Adrenomedullin zur adjuvanten Therapie des VILI

AM reduzierte pulmonalvaskuläre Permeabilität bei VILI

Die Zunahme der pulmonalvaskulären Permeabilität und die daraus resultierende Ödembildung, die zur Einschränkung der Gasaustauschkapazität der Lunge führt, ist ein zentraler Pathomechanismus des ALI/ARDS und des VILI. Beatmung über 2 h im HV_T-, ebenso wie im LV_T-Modus führten zu einem Anstieg der pulmonalvaskulären Permeabilität, der durch AM limitiert wurde.

AM verbesserte die Oxygenierungskapazität bei VILI

Aus dem Zusammenbruch der Barrierefunktion der Blut-Luft-Schranke in der Lunge resultiert ein Hyperpermeabilitätslungenödem und eine eingeschränkte Oxygenierungskapazität bei

ALI/ARDS und VILI. Die Therapie mit AM führte in den behandelten Tieren zu einer signifikant verbesserten Oxygenierungskapazität nach 2 h HV_T Beatmung.

AM hemmte die VILI-induzierte Phosphorylierung der Myosinleichtkette (MLC) in der Lunge

Ein zentraler Mechanismus, der zur Ausbildung endothelialer Permeabilität führt, ist die Phosphorylierung der MLC, wodurch Endothelzellen kontrahieren und interzelluläre Poren entstehen, die das ultrastrukturelle Korrelat endothelialer Permeabilität darstellen. Sowohl HV_T als auch LV_T Beatmung führten zu einer Zunahme der MLC Phosphorylierung in der Lunge. AM reduzierte die VILI induzierte Phosphorylierung der MLC.

AM reduzierte die VILI-induzierte Leukozyteninfiltration des Alveolarraums

Leukozyten, insbesondere neutrophile Granulozyten sind nicht nur Indikatoren für eine Inflammation in der Lunge, sondern auch Auslöser des pulmonalen Gewebeschadens bei VILI^{43;44}. Die Beatmung im HV_T Modus führte zu einer signifikanten Zunahme der Leukozyten und insbesondere der neutrophilen Granulozyten in der Lunge. AM reduzierte die Rekrutierung der Leukozyten und neutrophilen Granulozyten in die Lunge.

Besonders die HV_T Beatmung führte zu einer Zunahme der im Blut zirkulierenden Leukozyten, im Speziellen der neutrophilen Granulozyten. Unter AM ließen sich in HV_T beatmeten Tieren signifikant mehr neutrophile Granulozyten im Blut nachweisen, als in der HV_T Kontrollgruppe. AM hatte somit offenbar keinen Einfluss auf die Freisetzung von Leukozyten aus dem Knochenmark unter VILI, sondern hemmte die Rekrutierung in die Lunge. Dies führte zum vermehrten Verbleib der neutrophilen Granulozyten im Blut.

AM reduzierte den VILI-induzierten Anstieg des Laktatspiegels im Blut

Unter HV_T Beatmung kam es im Vergleich zur lungenprotektiven LV_T Beatmung schon nach 2 h zu einem Anstieg des Laktatspiegels im Blut, was auf eine Störung der Mikrozirkulation und eine daraus resultierende Gewebeminderperfusion schließen lässt. Der arterielle Mitteldruck war während der gesamten Versuchszeit >70 mmHg, was einen hämodynamischen Schock als Ursache ausschloss. In Versuchstieren, die mit AM behandelt wurden, wurde ein signifikant geringerer VILI-induzierter Anstieg des Blut-Laktatspiegels beobachtet.

AM schützte vor VILI-induzierter Störung der Nierenfunktion

Durch VILI kann ein Multiorganversagen und insbesondere ein Nierenversagen ausgelöst werden. Schon nach 2 h Beatmung im HV_T Modus entwickelte sich ein Anstieg des Plasma-Kreatininspiegels. Unter der Therapie mit AM wurde kein Kreatininanstieg beobachtet.

VILI induzierte eine pulmonale und systemische Entzündungsreaktion, die nicht durch AM messbar beeinflusst wurde

LV_T - und die HV_T-Beatmung provozierten einen Anstieg der Zytokine Interleukin - 6 (IL-6), KC, Macrophage Inflammatory Protein -1 α (MIP-1 α) und MIP-2 in der Lunge und im Blutplasma. Die AM Therapie hatte keinen messbaren Einfluss auf diese durch Beatmung ausgelöste pulmonale und systemische Entzündungsreaktion.

Verzögerte AM Therapie limitierte VILI und VILI-induzierte Mikrozirkulationsstörung in einem Langzeitmodell des Beatmungsassoziierten Lungenschadens

Nachdem ein protektiver Effekt der prophylaktischen Gabe von AM hinsichtlich VILI und VILI-induzierter systemischer Auswirkungen wie Mikrozirkulationsstörungen und Nierenversagen beobachtet werden konnte, erfolgte die Evaluation eines therapeutischen Ansatzes der AM Therapie. Hierfür wurden Mäuse für 6 h beatmet. Die Einleitung der AM Therapie erfolgte erst nach 2 h Beatmung, um das Potential von AM zur Therapie eines bereits initiierten VILI zu überprüfen. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen im LV_T und HV_T Modell konnte AM die VILI-induzierte pulmonalvaskuläre Permeabilität senken, schützte vor Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge und verhinderte einen Anstieg des Laktatspiegels im Blut unter Beatmung.

I.II. Simvastatin zur adjuvanten Therapie des VILI

Simvastatin schützte vor Permeabilität und Störung der Oxygenierungskapazität bei VILI

Als Ausdruck einer beatmungsassoziierten Lungenschädigung kam es zum Abfall der peripheren Sauerstoffsättigung nach 6 h Beatmung. Mit Simvastatin behandelte Versuchstiere wiesen eine höhere periphere Sauerstoffsättigung und eine verbesserte Oxygenierung, gemessen am arteriellen Sauerstoffpartialdruck, am Ende des Versuches auf. Als pathophysiologisches Korrelat der Oxygenierungsstörung konnte ein Anstieg der pulmonalvaskulären Permeabilität beobachtet werden. Die Behandlung mit Simvastatin limitierte diesen Permeabilitätsanstieg.

Ferner zeigten elektronenmikroskopische Analysen der Lungen einen durch Beatmung ausgelösten Endothelschaden. Die Endothelzellen erschienen geschwollen, und es kam zu einer Rarifizierung von Stoffwechselaktivität anzeigenden Vesikeln und Caveolae. In mit Simvastatin behandelten Versuchstieren war diese Schädigung des Endothels durch Beatmung signifikant geringer ausgeprägt.

Simvastatin hemmte die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Gr-1^{high} Monozyten in die Lunge unter Beatmung

Pulmonale Leukozytenrekrutierung trägt zur Entstehung des VILI bei. Insbesondere neutrophile Granulozyten und Gr-1^{high} Monozyten sind an der Pathogenese des VILI beteiligt⁴³⁻⁴⁵. Die Beatmung führte zur Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und Gr-1^{high} Monozyten in die Lunge. Eine Simvastatintherapie hemmte die pulmonale Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Gr-1^{high} Monozyten bei VILI.

Bei VILI kam es unter Beatmung zu einer Zunahme im Blut zirkulierender Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten und Monozyten. Analog zu den Untersuchungen zur Adrenomedullintherapie kam es auch unter Simvastatintherapie zur reduzierten pulmonalen Rekrutierung dieser Leukozytensubpopulationen und einer erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten und Monozyten im Blut.

Simvastatin limitierte die VILI-induzierte pulmonale Zytokinproduktion

Die Beatmung induzierte eine Freisetzung von Zytokinen in der Lunge, von denen einzelne, wie IL-1 β oder CXC- Chemokine direkt zur Pathogenese des VILI beitragen. Auch in dieser Arbeit konnte der Anstieg von Zytokinen (IL-1 β , MIP-1 α , IL-12p40, IL-6, MIP-2 und MCP-1) in der Lunge unter Beatmung beobachtet werden. Die Therapie mit Simvastatin resultierte in reduzierten Spiegeln von IL-1 β , MIP-1 α und IL12p40 im Lungengewebe.

VILI induzierte außerdem eine systemische Entzündungsantwort gemessen am Anstieg dieser Zytokine im Blutplasma. Simvastatin verringerte die Konzentration von IL-12p40 im Blutplasma.

II Prophylaktische Immunmodulation vor schwerer Pneumonie

II.I. MALP-2

MALP-2 induzierte die Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge und verbesserte das Überleben bei schwerer Pneumokokkenpneumonie

Nach der Applikation von MALP-2 kam es zu einer Rekrutierung von Leukozyten, insbesondere von neutrophilen Granulozyten in den Alveolarraum. Die Leukozytenzahlen erreichten nach 24 h ein Maximum und fielen im Verlauf wieder ab. Vor diesem Hintergrund wurde im Folgenden MALP-2 24 h vor der Infektion mit *S. pneumoniae* appliziert.

Die Behandlung von Mäusen mit MALP-2 verbesserte das Überleben der schweren Pneumonie. Es überlebten nur 30% der nicht behandelten Mäuse, während nach Vorbehandlung mit MALP-2 die Überlebensrate auf 60% (0,1 μ g MALP-2) und 100% (0,5 und 2 μ g MALP-2) stieg.

Die MALP-2 induzierte Produktion von Zytokinen und die Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge waren TLR-2 abhängig

In TLR-2 defizienten Mäusen führte die Applikation von MALP-2 weder zur Akkumulation von Leukozyten, noch kam es zur vermehrten Produktion von Zytokinen in der Lunge, wie in Wildtypmäusen beobachtet. Diese Experimente belegten, dass die Stimulation des TLR-2

Rezeptors und der abhängigen Signalwege der entscheidende Mechanismus für die Stimulation des Immunsystems durch MALP-2 in dieser Studie war.

MALP-2 induzierte die Expression von TLR-2 in Mauslungen und humanen Atemwegsepithelien

Nach Applikation von MALP-2 in Mauslungen sowie nach Stimulation von konfluierend gewachsenen humanen Alveolarepithelzellen mit MALP-2 kam es zur vermehrten Expression von TLR-2 mRNA und Protein.

MALP-2 führte zur vermehrten Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge bei Pneumonie

In mit *S. pneumoniae* infizierten Mäusen resultierte die Vorbehandlung mit MALP-2 in einer Verstärkung der ohnehin in der Pneumonie beobachteten pulmonalen Rekrutierung von Leukozyten.

MALP-2 veränderte die Freisetzung von CCL-5 und IL-10 bei Pneumonie

Nach Therapie mit MALP-2 wurden in infizierten Tieren höhere Konzentrationen von CCL-5 und erniedrigte Spiegel von IL-10 im Vergleich zu nicht behandelten infizierten Kontrollen gemessen. Die Produktion weiterer proinflammatorischer Zytokine in der Lunge im Verlauf der Pneumonie wurde durch MALP-2 nicht signifikant verändert.

MALP-2 Therapie reduzierte die Bakteriämie und veränderte die Verteilung von Pneumokokken in der Lunge bei Pneumonie

Nach der Vorbehandlung mit MALP-2 wurde im Verlauf der Pneumonie eine signifikant geringere bakterielle Translokation ins Blut festgestellt. In der immunhistochemischen Analyse des Lungengewebes zeigten sich in nicht behandelten infizierten Mäusen leukozytäre Infiltrate in Kolokalisation mit Pneumokokken, vor allem im Bereich des perivaskulären Raums der Lunge. Relevante Mengen von Pneumokokken befanden sich in den Interlobärspalten der Lunge. Nach der Vorbehandlung mit MALP-2 war das Lungengewebe fast frei von Pneumokokken. Auf die in den Interlobärspalten der Lunge lokalisierten Pneumokokken hatte die Behandlung mit MALP-2 keinen Einfluss.

Diskussion

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurden adjuvante pharmakologische Therapiekonzepte zur Behandlung und Vorbeugung der Entwicklung des akuten Lungenversagens untersucht. Adrenomedullin und Simvastatin erwiesen sich durch Stabilisierung der pulmonalvaskulären Barriere, Protektion der pulmonalen Oxygenierungskapazität und durch Reduktion der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und GR-1^{high} Monozyten in die Lunge als effektiv zur Reduktion von beatmungsassoziierter Lungenschädigung. Durch Simvastatin wurde darüber hinaus die VILI-induzierte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen gehemmt. AM hatte über die pulmonalen Effekte hinaus auch systemischen Nutzen und beugte VILI-induzierten Störungen der Nierenfunktion und Mikrozirkulation vor. Ferner reduzierte AM auch dann den beatmungsinduzierten Lungenschaden, wenn die Therapie verzögert nach Initiierung des Lungenschadens begonnen wurde.

Die intratracheale Gabe von MALP-2 führte zu vermehrter Expression von TLR-2, Rekrutierung von Leukozyten und Liberation von proinflammatorischen Zytokinen in der Lunge. Die MALP-2 vermittelte Aktivierung des Immunsystems führte bei pulmonaler Pneumokokkeninfektion zu einer verbesserten bakteriellen Clearance im Lungenparenchym, zu einer Reduktion der Bakteriämie und einem verbesserten Überleben der Mäuse.

Für die hier aufgeführten Studien wurden verschiedene VILI-Mausmodelle entwickelt. Zum Einen konnten Mäuse nach den Maßgaben der lungenprotektiven Beatmung beatmet werden⁴⁶. Bemerkenswerter Weise konnten auch unter lungenprotektiver Beatmung moderate Zeichen von VILI beobachtet werden. Um exemplarisch Mechanismen und systemische Auswirkungen des VILI untersuchen zu können, müssen diese jedoch in deutlicherem Ausmaß ausgelöst werden, was in dem LV_T Modell absichtlich vermieden wurde. Vor diesem Hintergrund wurde ein HV_T Modell etabliert, das diesem Ansatz Rechnung trug. Generell gilt es zu bedenken, dass gesunde Lungen Verwendung fanden, und dass der Beobachtungszeitraum 2 h betrug. Aus den Arbeiten von Chiomello et al. lässt sich ableiten,

dass der beatmungsassoziierte physikalische Stress auf das Lungengewebe, der unter lungenprotektiver Beatmung mit 6 ml/kg Tidalvolumen in ARDS Lungen generiert wird, dem mechanischen Stress entspricht, der in gesundem Lungengewebe unter Beatmung mit 12 ml/kg Tidalvolumen auftritt³⁹. Ferner schien eine Ausweitung des Beobachtungszeitraums für diese Arbeit sinnvoll, so dass ein weiteres Modell etabliert wurde, in dem Tidalvolumina von 12 ml/kg und ein moderater PEEP Anwendung fanden, und die Versuchstiere über 6 h beatmet werden konnten. Durch die Anwendung dieser verschiedenen Modelle konnten die speziellen Fragestellungen in den jeweiligen Projekten zufriedenstellend adressiert werden. Durch das umfangreiche Monitoring der Tiere war es möglich, Einflüsse durch Störungen der Hämodynamik, des Säure Basen- und Elektrolythaushalts, der Temperaturhomöostase sowie der Beatmung an sich weitestgehend auszuschließen.

Das für diese Arbeit eingesetzte Modell der murinen Pneukokken-Pneumonie spiegelt den Verlauf einer schweren ambulant erworbenen Pneumonie beim Menschen wieder. Es kommt ausgehend von einer Pneumonie zur Sepsis mit komplizierendem septischem Schock und einem Akuten Lungenversagen⁴². Die Verwendung von Pneumokokken, dem häufigsten Erreger der Pneumonie und darüber hinaus eines relevanten humanpathogenen Pneumokokkenstammes, tragen zur klinischen Relevanz des Modells bei.

Die Entwicklung pulmonalvaskulärer Permeabilität ist ein integraler Bestandteil der Pathogenese des ALI/ARDS und des VILI⁵. Eines der ultrastrukturellen Korrelate erhöhter endothelialer Permeabilität ist eine Endothelzellkontraktion, die aus einer Myosin-Aktin Interaktion im Zytoskelett resultiert. In diesem Prozess wird die Myosinleichtkette durch die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) phosphoryliert⁴⁷. Mäuse, die heterozygot für die MLCK sind oder bei denen die Aktivität der MLCK durch Behandlung mit spezifischen Inhibitoren gehemmt wurde, entwickeln weniger pulmonalvaskuläre Permeabilität bei ALI/VILI^{48;49}. In der vorgelegten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Beatmung eine MLC-Phosphorylierung induziert. AM schützt vor endothelialer Hyperpermeabilität, indem die intrazellulären Spiegel von cAMP angehoben werden, was zur Aktivierung der Proteinkinase A führt, die wiederum die MLCK hemmt^{11;50}. Es resultiert eine Reduktion der Phosphorylierung der MLC. In dieser Studie konnte erstmals beobachtet werden, dass AM eine Phosphorylierung der MLC, ausgelöst durch Beatmung, in vivo reduzierte und wahrscheinlich auf diesem Weg zur Senkung der vaskulären Permeabilität bei VILI beitragen konnte.

Auch unter Simvastatintherapie entwickelten die Tiere signifikant weniger pulmonalvaskuläre Permeabilität. Der protektive Effekt von Simvastatin auf die endotheliale Barrierefunktion beruht auf einer Hemmung der Isoprenylierung von Proteinkinasen der Rho-Familie, die dadurch in ihrer Aktivität verändert werden^{14;17}. An Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass es in der Folge zur Reduktion der MLC-Phosphorylierung und zur vermehrten Expression von interendothelialen Adhäsionsmolekülen kommt, welche ursächlich für den barrierestabilisierenden Effekt von Simvastatin sind¹⁴.

In dieser Arbeit wurde unter moderaten, klinisch relevanten Tidalvolumina eine ausgedehnte Schädigung des pulmonalen Endothels beobachtet. Zusammen mit einer Arbeit von Vaneker et al.⁵¹ ist dies die erste Untersuchung, die eine Endothelschädigung unter Beatmung mit klinisch relevanten Tidalvolumina nachweist⁵¹. Simvastatin reduzierte die durch VILI-induzierte Endothelschädigung. Der dafür relevante Mechanismus ist noch nicht verstanden. Dies könnte jedoch ein neuer vielversprechender Ansatz für eine adjuvante Therapie zur Endothelprotektion bei ALI sein und ist aktuell Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen.

Die Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion bei VILI könnte durch Limitierung eines Hyperpermeabilitätsödems die Oxygenierungskapazität der Lunge aufrechterhalten, was in diesen Studien sowohl unter AM- als auch unter Simvastatintherapie zu beobachten war.

Experimentelle Studien legen nahe, dass neutrophile Granulozyten und Gr-1^{high} Monozyten zur Genese des VILI beitragen⁴³⁻⁴⁵. Sowohl AM, als auch Simvastatin schützten in dieser Arbeit vor pulmonaler Rekrutierung von Leukozyten. Simvastatin hemmt Leukozytenadhäsion und die leukozytäre Diapedese durch die Reduktion der Expression von endothelialen Ankerproteinen und durch Hemmung der CCL2/MCP-1 vermittelten endothelialen Leukozytenrekrutierung⁵²⁻⁵⁴. In dieser Studie wurde eine Hemmung der Sekretion zentraler Zytokine wie IL-1 β und MIP-1 α durch Simvastatin gezeigt, die für die Rekrutierung von Leukozyten elementar sind, was ebenfalls zur reduzierten Rekrutierung

dieser Zellen beigetragen haben könnte. AM veränderte das bestehende Zytokinmilieu weder pulmonal noch systemisch. Ein Effekt auf die Chemotaxis erscheint somit nicht ursächlich für die reduzierte Leukozytenrekrutierung in die Lunge bei VILI unter Therapie mit AM. Es ist bekannt, dass AM die Expression von Ankerproteinen auf aktivierten neutrophilen Granulozyten verändert und die Adhäsion von aktivierten Leukozyten am Endothel hemmt^{55;56}. Die Klärung des zugrunde liegenden Mechanismus für diese Effekte war nicht Ziel dieser Arbeit. Dennoch ist es vor dem Hintergrund der erhöhten Anzahl zirkulierender Leukozyten unter AM-Therapie bei VILI in dieser Studie und angesichts des aktuellen Standes der Literatur wahrscheinlich, dass AM die pulmonale Rekrutierung von Leukozyten bei VILI durch eine Hemmung der Endothel-Leukozyten-Interaktion reduzierte.

Arbeiten von Ranieri et al.^{7;8} konnten einen Zusammenhang zwischen VILI, systemischer Inflammation und der Entwicklung eines Multiorganversagens, insbesondere eines akuten Nierenversagens bei ALI/ARDS Patienten herstellen^{7;8}. Auch in dieser Arbeit wurde unter Beatmung eine systemische Entzündungsreaktion ausgelöst, und in HV_T beatmeten Tieren kam es zu einer Störung der Mikrozirkulation und zur Nierenfunktionsstörung. Ein hämodynamischer Schockzustand konnte als Genese der Mikrozirkulationsstörungen und Nierenfunktionsstörung durch kontinuierliche invasive Blutdruckmessung ausgeschlossen werden. Im Rahmen systemischer Entzündungsreaktionen kann es zur Entwicklung von Mikrozirkulationsstörungen kommen, die eine zentrale Rolle im Pathomechanismus eines Multiorganversagens und insbesondere eines Nierenversagens spielen⁵⁷. Auf die systemische Hyperinflammation, gemessen an proinflammatorischen Zytokinen im Blut hatte AM keinen Einfluss. Unter der Therapie mit AM entwickelten die Tiere aber keine Mikrozirkulationsstörungen und keine Zeichen von Nierenversagen. Die Beobachtungen lassen sich mit früheren Beobachtungen vereinbaren, in denen AM vor der Entwicklung von Mikrozirkulationsstörungen in einem Modell des isolierten Rattendarms durch Hemmung der endothelialen Leukozytenadhäsion schützte und die Entwicklung eines akuten Nierenversagens in der experimentellen Sepsis verhinderte^{13;55}. Zusammenfassend kann gefolgert werden, dass AM vor Mikrozirkulationsstörungen im Rahmen von VILI und vor systemischer Hyperinflammation schützte, was der Entwicklung von Nierenfunktionsstörungen in diesem Szenario vorbeugte.

Es konnte in diesen Untersuchungen erstmals sowohl für AM als auch für Simvastatin ein protektiver Effekt bei VILI nachgewiesen werden. Beide Substanzen haben in anderen experimentellen Tiermodellen ihre Effektivität als Therapie des ALI bewiesen. Dies hat Relevanz, beurteilt man die Substanzen hinsichtlich Ihres Translationspotentials. Simvastatin wurde aktuell im Rahmen des HARP Trial (Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase Inhibition for Acute Lung Injury) zur adjuvanten Behandlung von ALI/ARDS Patienten untersucht. Die Simvastatin-Therapie (80mg/Tag) reduzierte den IL-8 Spiegel in der bronchoalveolären Lavage und schien mit einer Besserung der Oxygenierung und niedrigeren Beatmungsdrücken assoziiert zu sein. Es traten keine relevanten Nebenwirkungen auf⁵⁸. Aktuell befindet sich eine klinische Phase III Studie (SAILS: Statins for Acutely Injured Lungs, NCT00979121) in der Phase der Patientenrekrutierung und eine weitere (HARP II) in der Vorbereitung, um das Potential von Statinen als adjuvante Therapie des ALI/ARDS anhand relevanter klinischer Endpunkte zu untersuchen. Die Ergebnisse unserer Daten könnten in der Zukunft wichtige Informationen zur Interpretation der Ergebnisse dieser Studien beisteuern, da die eingeschlossenen Patienten maschinell beatmet werden.

Prof. Dr. Stefan Hippenstiel aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Infektiologie und Pneumologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin hat kürzlich von der European Medicines Agency (EMA) die Empfehlung für die Weiterentwicklung von AM als Orphan Drug für die Therapie des ALI erhalten (EMA/COMP/104704/2010). Die Ergebnisse dieser Arbeit waren unter anderem die Grundlage, auf der diese Entscheidung getroffen wurde. Damit ist der Grundstein zur Entwicklung von AM als pharmakologische Substanz gelegt, um in der Folge die vielversprechenden Effekte der Substanz in klinischen Studien an ALI/ARDS Patienten als adjuvante Pharmakotherapie zu evaluieren.

Patienten mit Influenzainfektionen, unmittelbar nach einem Schlaganfall und insbesondere beatmete Patienten haben ein hohes Risiko an einer Pneumonie zu erkranken²⁶⁻²⁸. Diese

Risikopopulationen könnten von einer Aktivierung des pulmonalen Immunsystems zur Stärkung der Abwehrkompetenz gegenüber pulmonalen bakteriellen Infektionen profitieren. Der Toll-like Rezeptor (TLR-)2 ist ein zentraler PRR (pattern recognition receptor) für die Aktivierung des angeborenen Immunsystems bei Pneumokokkenpneumonie^{37;38;59}. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des pulmonalen Immunsystems die Abwehrkompetenz gegenüber *S. pneumoniae* verbessern kann⁶⁰. Die Stimulation der angeborenen zellulären Immunantwort durch MALP-2 verbesserte die Abwehrkompetenz in experimentellen Infektionsmodellen mit *Pseudomonas aeruginosa* und bei polymikrobieller abdominaler Sepsis³⁴⁻³⁶. Die intratracheale MALP-2 Applikation führte in dieser Arbeit zu einer pulmonalen Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten. Dieser Effekt beruhte auf der spezifischen TLR-2 Aktivierung, wie die Versuche in TLR-2 defizienten Mäusen zeigten. Bemerkenswert war, dass diese vermehrte Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten auch noch in Tieren, die nach der Vorbehandlung mit MALP-2 eine Pneumonie entwickelten, zu beobachten war. Neutrophile Granulozyten sind eine essentielle Komponente der Wirtsabwehr gegen *S. pneumoniae*⁶¹. Durch die Stimulation der zellulären angeborenen Immunantwort wurde in dieser Arbeit die Sterblichkeit der Versuchstiere in der schweren Pneumokokkenpneumonie dosisabhängig gesenkt. Es traten signifikant weniger Bakteriämien auf. Die parenchymale pulmonale Erregerlast war erniedrigt.

Die MALP-2 Stimulation führte darüber hinaus zu einer verstärkten Expression von TLR-2 in den Mauslunge und in humanen Alveolarepithelzellen. Auch auf isolierten Alveolarmakrophagen war bereits eine MALP-2-induzierte Zunahme der TLR-2 Expression beobachtet worden⁶². Diese Zunahme der TLR-2 Expression in den Lungen der mit MALP-2 behandelten Individuen könnte das Immunsystem sensibilisiert und zu einer verbesserten Abwehrkompetenz der Tiere beigetragen haben.

Eine ungerichtete Stimulation von TLR-2 Rezeptoren kann zu einer überschießenden und somit schädlichen Hyperinflammation führen⁶³. Vor diesem Hintergrund wurden pulmonale proinflammatorische Zytokine nach der Stimulation mit MALP-2 vor und nach der Infektion mit *S. pneumoniae* gemessen. MALP-2 induzierte die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen in naiven Tieren. Nach Pneumokokkeninfektion wurden die Spiegel der meisten inflammatorischen Zytokine in der Lunge durch MALP-2 jedoch nicht relevant beeinflusst. Eine Ausnahme waren veränderte Spiegel von CCL5, das in behandelten Tieren erhöht war, und IL-10, das im Vergleich zu infizierten, unbehandelten Mäusen in geringerer Konzentration in der Lunge nachgewiesen werden konnte. Beide Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Wirtsabwehr gegenüber *S. pneumoniae*. Eine Antagonisierung des CCL5 führte in Mäusen, die im Nasopharyngealbereich durch *S. pneumoniae* kolonisiert waren, zu einem vermehrten Auftreten von Pneumonien⁶⁴. Die Behandlung von Mäusen mit IL-10 verschlechterte die Abwehrkompetenz von Mäusen nach der Infektion mit *S. pneumoniae*, während die Antagonisierung von IL-10 in Mäusen zu einer verbesserten Abwehrkompetenz führte^{65;66}. Vor diesem Hintergrund könnten der erhöhte Spiegel von CCL5 und der erniedrigte IL-10 Spiegel ebenfalls zur verbesserten Wirtsabwehr gegen *S. pneumoniae* in dieser Untersuchung beigetragen haben.

S. pneumoniae ist der wichtigste Verursacher von ambulant erworbenen Pneumonien, während *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* oder anaerobe Bakterien für den Großteil der beatmungsassoziierten Pneumonien verantwortlich sind. Trotz dieser Limitation der aktuellen Studie hinsichtlich der Übertragbarkeit auf die Problematik der beatmungsassoziierten Pneumonie konnte exemplarisch in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die gezielte pulmonale Immunstimulation zur Verbesserung der pulmonalen Abwehrkompetenz effektiv vor der Entwicklung von Pneumonien schützen kann. Dies lässt vermuten, dass auch die Stärkung der pulmonalen Abwehrkompetenz in beatmeten Patienten vor der Entstehung von beatmungsassoziierten Pneumonien schützen könnte. Die Untersuchung dieser Hypothese ist Gegenstand aktueller Studien.

Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden neue adjuvante pharmakologische Strategien zur Therapie des ALI untersucht. Es wurden Adrenomedullin und Simvastatin als potente Substanzen identifiziert,

die VILI, in der klinischen Realität eine wichtige Ursache von Morbidität und Mortalität bei beatmeten Patienten, reduzieren konnten. Ferner konnte gezeigt werden, dass Immunstimulation mit MALP-2 die Abwehrkompetenz der Versuchstiere verbessert und die Mortalität der schweren Pneumonie reduziert, was hinsichtlich der gefürchteten Komplikation der beatmungsassoziierten Pneumonie ebenfalls Morbidität und Mortalität bei beatmeten Patienten reduzieren könnte.

Statine werden bereits in einer klinischen Phase III Studie (SAILS Studie) hinsichtlich ihres Potentials als adjuvante Pharmakotherapie bei ALI evaluiert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen nun erstmals auch die Wirksamkeit von Statinen bei VILI, was die Interpretation der Ergebnisse der SAILS Studie wahrscheinlich beeinflussen wird. AM hat kürzlich einen „Orphan Drug Status“ von der EMA zugesprochen bekommen. Dies legt den Grundstein zur Translation dieser Substanz in klinische Studien bei ALI Patienten und stellt somit die Entwicklung einer neuen adjuvanten Pharmakotherapie des ALI unter Verwendung von AM in Aussicht. Vergleichbare aktuelle Bemühungen könnten eine klinische Erprobung von MALP-2 zur prophylaktischen Immunmodulation in naher Zukunft ermöglichen.

Literaturverzeichnis

1. Rubenfeld, G. D., E. Caldwell, E. Peabody, J. Weaver, D. P. Martin, M. Neff, E. J. Stern, and L. D. Hudson. 2005. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 353:1685-1693.
2. Ware, L. B. and M. A. Matthay. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342:1334-1349.
3. 2000. 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* 342:1301-1308.
4. Tremblay, L. N. and A. S. Slutsky. 2006. Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. *Intensive Care Med* 32:24-33.
5. Verbrugge, S. J., B. Lachmann, and J. Kesecioglu. 2007. Lung protective ventilatory strategies in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: from experimental findings to clinical application. *Clin Physiol Funct. Imaging* 27:67-90.
6. Pugin, J. 2003. Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch. *Crit Care Med* 31:S200-S206.
7. Ranieri, V. M., P. M. Suter, C. Tortorella, R. De Tullio, J. M. Dayer, A. Brienza, F. Bruno, and A. S. Slutsky. 1999. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 282:54-61.
8. Ranieri, V. M., F. Giunta, P. M. Suter, and A. S. Slutsky. 2000. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 284:43-44.
9. Dhanireddy, S., W. A. Altemeier, G. Matute-Bello, D. S. O'Mahony, R. W. Glenny, T. R. Martin, and W. C. Liles. 2006. Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest* 86:790-799.
10. O'Mahony, D. S., W. C. Liles, W. A. Altemeier, S. Dhanireddy, C. W. Frevert, D. Liggitt, T. R. Martin, and G. Matute-Bello. 2006. Mechanical ventilation interacts with endotoxemia to induce extrapulmonary organ dysfunction. *Crit Care* 10:R136.
11. Temmesfeld-Wollbrück, B., A. C. Hocke, N. Suttrop, and S. Hippenstiel. 2007. Adrenomedullin and endothelial barrier function. *Thromb. Haemost* 98:944-951.
12. Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, N. Varela, G. Robledo, and M. Delgado. 2006. Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response. *Am J Pathol* 168:1921-1930.
13. Temmesfeld-Wollbrück, B., B. Brell, I. David, M. Dorenberg, J. Adolphs, B. Schmeck, N. Suttrop, and S. Hippenstiel. 2007. Adrenomedullin reduces vascular

- hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensive Care Med* 33:703-710.
14. Jacobson, J. R., S. M. Dudek, K. G. Birukov, S. Q. Ye, D. N. Grigoryev, R. E. Girgis, and J. G. N. Garcia. 2004. Cytoskeletal Activation and Altered Gene Expression in Endothelial Barrier Regulation by Simvastatin. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 30:662-670.
 15. Jacobson, J. R., S. M. Dudek, P. A. Singleton, I. A. Kolosova, A. D. Verin, and J. G. N. Garcia. 2006. Endothelial cell barrier enhancement by ATP is mediated by the small GTPase Rac and cortactin. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* 291:L289-L295.
 16. Paumelle, R., C. Blanquart, O. Briand, O. Barbier, C. Duhem, G. Woerly, F. Percevault, J. C. Fruchart, D. Dombrowicz, C. Glineur, and B. Staels. 2006. Acute Antiinflammatory Properties of Statins Involve Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- α via Inhibition of the Protein Kinase C Signaling Pathway. *Circulation Research* 98:361-369.
 17. Jacobson, J. R., J. W. Barnard, D. N. Grigoryev, S. F. Ma, R. M. Tuder, and J. G. N. Garcia. 2005. Simvastatin attenuates vascular leak and inflammation in murine inflammatory lung injury. *AJP - Lung Cellular and Molecular Physiology* 288:L1026-L1032.
 18. Merx, M. W., E. A. Liehn, U. Janssens, R. Luttkicken, J. Schrader, P. Hanrath, and C. Weber. 2004. HMG-CoA Reductase Inhibitor Simvastatin Profoundly Improves Survival in a Murine Model of Sepsis. *Circulation* 109:2560-2565.
 19. Merx, M. W., E. A. Liehn, J. Graf, A. van de Sandt, M. Schaltenbrand, J. Schrader, P. Hanrath, and C. Weber. 2005. Statin Treatment After Onset of Sepsis in a Murine Model Improves Survival. *Circulation* 112:117-124.
 20. Pirat, A., P. Zeyneloglu, D. Aldemir, M. Yucel, O. Ozen, S. Candan, and G. Arslan. 2006. Pretreatment with Simvastatin Reduces Lung Injury Related to Intestinal Ischemia-Reperfusion in Rats. *Anesth Analg* 102:225-232.
 21. Shao, H., Y. Shen, H. Liu, G. Dong, J. Qiang, and H. Jing. 2007. Simvastatin Suppresses Lung Inflammatory Response in a Rat Cardiopulmonary Bypass Model. *The Annals of Thoracic Surgery* 84:2011-2018.
 22. Souza Neto, J. L., F. Araujo, I. A. C. Rego, V. A. Dominici, I. M. Azevedo, E. S. Egito, J. Brandao-Neto, and A. C. Medeiros. 2006. Effects of simvastatin in abdominal sepsis in rats. *Acta Cir.Bras.* 21 Suppl 4:8-12.
 23. Winkler, F., B. Angele, H. W. Pfister, and U. Koedel. 2009. Simvastatin attenuates leukocyte recruitment in experimental bacterial meningitis. *International Immunopharmacology* 9:371-374.
 24. Yasuda, H., P. S. T. Yuen, X. Hu, H. Zhou, and R. A. Star. 2006. Simvastatin improves sepsis-induced mortality and acute kidney injury via renal vascular effects. *Kidney Int* 69:1535-1542.
 25. Shyamsundar, M., S. T. McKeown, C. M. O'Kane, T. R. Craig, V. Brown, D. R. Thickett, M. A. Matthay, C. Taggart, J. T. Backman, J. S. Elborn, and D. F. McAuley. 2009. Simvastatin Decreases Lipopolysaccharide Induced Pulmonary Inflammation in Healthy Volunteers. *Am.J.Respir.Crit.Care Med.*200810-1584OC.
 26. O'Brien, K. L., M. I. Walters, J. Sellman, P. Quinlisk, H. Regnery, B. Schwartz, and S. F. Dowell. 2000. Severe pneumococcal pneumonia in previously healthy children: the role of preceding influenza infection. *Clin.Infect.Dis.* 30:784-789.
 27. 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. 2009. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. *JAMA* 302:2323-2329.
 28. Hilker, R., C. Poetter, N. Findeisen, J. Sobesky, A. Jacobs, M. Neveling, and W. D. Heiss. 2003. Nosocomial pneumonia after acute stroke: implications for neurological intensive care medicine. *Stroke* 34:975-981.
 29. Pugin, J. 2007. Immunostimulation is a rational therapeutic strategy in sepsis. *Novartis.Found.Symp.* 280:21-27.
 30. Muhlradt, P. F., M. Kiess, H. Meyer, R. Sussmuth, and G. Jung. 1997. Isolation, structure elucidation, and synthesis of a macrophage stimulatory lipopeptide from

- Mycoplasma fermentans* acting at picomolar concentration. *Journal of Experimental Medicine* 185:1951-1958.
31. Takeuchi, O., A. Kaufmann, K. Grote, T. Kawai, K. Hoshino, M. Morr, P. F. Muhlradt, and S. Akira. 2000. Preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2-and MyD88-dependent signaling pathway. *Journal of Immunology* 164:554-557.
 32. Takeuchi, O., T. Kawai, P. F. Muhlradt, M. Morr, J. D. Radolf, A. Zychlinsky, K. Takeda, and S. Akira. 2001. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *International Immunology* 13:933-940.
 33. Medzhitov, R. 2007. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449:819-826.
 34. Kerber-Momot, T., D. Leemhuis, A. Luhrmann, A. Munder, B. Tummler, R. Pabst, and T. Tschernig. 2010. Beneficial effects of TLR-2/6 ligation in pulmonary bacterial infection and immunization with *Pseudomonas aeruginosa*. *Inflammation* 33:58-64.
 35. Zeckey, C., T. Tschernig, F. Hildebrand, M. Frink, C. Fromke, M. Dorsch, C. Krettek, and T. Barkhausen. 2010. Macrophage-activating lipopeptide-2 exerts protective effects in a murine sepsis model. *Shock* 33:614-619.
 36. Feterowski, C., A. Novotny, S. Kaiser-Moore, P. F. Muhlradt, T. Rossmann-Bloeck, M. Rump, B. Holzmann, and H. Weighardt. 2005. Attenuated pathogenesis of polymicrobial peritonitis in mice after TLR2 agonist pre-treatment involves ST2 up-regulation. *International Immunology* 17:1035-1046.
 37. Koedel, U., B. Angele, T. Rupprecht, H. Wagner, A. Roggenkamp, H. W. Pfister, and C. J. Kirschning. 2003. Toll-like receptor 2 participates in mediation of immune response in experimental pneumococcal meningitis. *Journal of Immunology* 170:438-444.
 38. Letiembre, M., H. Echchannaoui, P. Bachmann, F. Ferracin, C. Nieto, M. Espinosa, and R. Landmann. 2005. Toll-like receptor 2 deficiency delays pneumococcal phagocytosis and impairs oxidative killing by Granulocytes. *Infect.Immun.* 73:8397-8401.
 39. Chiumello, D., E. Carlesso, P. Cadringer, P. Caironi, F. Valenza, F. Polli, F. Tallarini, P. Cozzi, M. Cressoni, A. Colombo, J. J. Marini, and L. Gattinoni. 2008. Lung stress and strain during mechanical ventilation for acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 178:346-355.
 40. Gattinoni, L. and A. Pesenti. 2005. The concept of "baby lung". *Intensive Care Med* 31:776-784.
 41. Bailey, T. C., E. L. Martin, L. Zhao, and R. A. Veldhuizen. 2003. High oxygen concentrations predispose mouse lungs to the deleterious effects of high stretch ventilation. *J Appl.Physiol* 94:975-982.
 42. Witzernath, M., B. Schmeck, J. M. Doehn, T. Tschernig, J. Zahlten, J. M. Loeffler, M. Zemlin, H. Muller, B. Gutbier, H. Schutte, S. Hippenstiel, V. A. Fischetti, N. Suttorp, and S. Rosseau. 2009. Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 37:642-649.
 43. Karzai, W., X. Cui, N. Heinicke, C. Niemann, E. P. Gerstenberger, R. Correa, S. Banks, B. Mehlhorn, F. Bloos, K. Reinhart, and P. Q. Eichacker. 2005. Neutrophil stimulation with granulocyte colony-stimulating factor worsens ventilator-induced lung injury and mortality in rats. *Anesthesiology* 103:996-1005.
 44. Kawano, T., S. Mori, M. Cybulsky, R. Burger, A. Ballin, E. Cutz, and A. C. Bryan. 1987. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol* 62:27-33.
 45. Wilson, M. R., K. P. O'Dea, D. Zhang, A. D. Shearman, N. van Rooijen, and M. Takata. 2009. Role of lung-marginated monocytes in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 179:914-922.
 46. Dellinger, R. P., M. M. Levy, J. M. Carlet, J. Bion, M. M. Parker, R. Jaeschke, K. Reinhart, D. C. Angus, C. Brun-Buisson, R. Beale, T. Calandra, J. F. Dhainaut, H. Gerlach, M. Harvey, J. J. Marini, J. Marshall, M. Ranieri, G. Ramsay, J. Sevransky, B.

- T. Thompson, S. Townsend, J. S. Vender, J. L. Zimmerman, and J. L. Vincent. 2008. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med* 36:296-327.
47. Dudek, S. M. and J. G. Garcia. 2001. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl. Physiol* 91:1487-1500.
48. Moitra, J., C. Evenoski, S. Sammani, R. Wadgaonkar, J. R. Turner, S. F. Ma, and J. G. Garcia. 2008. A transgenic mouse with vascular endothelial over-expression of the non-muscle myosin light chain kinase-2 isoform is susceptible to inflammatory lung injury: role of sexual dimorphism and age. *Transl. Res* 151:141-153.
49. Rossi, J. L., A. V. Velentza, D. M. Steinhorn, D. M. Watterson, and M. S. Wainwright. 2007. MLCK210 gene knockout or kinase inhibition preserves lung function following endotoxin-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L1327-L1334.
50. Hippenstiel, S., M. Witzenrath, B. Schmeck, A. Hocke, M. Krisp, M. Krull, J. Seybold, W. Seeger, W. Rascher, H. Schutte, and N. Suttorp. 2002. Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 91:618-625.
51. 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. 2007. 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* 107:419-426.
52. Han, K. H., J. Ryu, K. H. Hong, J. Ko, Y. K. Pak, J. B. Kim, S. W. Park, and J. J. Kim. 2005. HMG-CoA Reductase Inhibition Reduces Monocyte CC Chemokine Receptor 2 Expression and Monocyte Chemoattractant Protein-1-Mediated Monocyte Recruitment In Vivo. *Circulation* 111:1439-1447.
53. Wei, H., L. Fang, J. Song, and S. Chatterjee. 2005. Statin-inhibited endothelial permeability could be associated with its effect on PECAM-1 in endothelial cells. *FEBS Lett* 579:1272-1278.
54. Zapolska-Downar, D., A. Siennicka, M. Kaczmarczyk, B. Kolodziej, and M. Naruszewicz. 2004. Simvastatin modulates TNF[alpha]-induced adhesion molecules expression in human endothelial cells. *Life Sciences* 75:1287-1302.
55. Brell, B., S. Hippenstiel, I. David, A. R. Pries, H. Habazettl, B. Schmeck, N. Suttorp, and B. Temmesfeld-Wollbruck. 2005. Adrenomedullin treatment abolishes ileal mucosal hypoperfusion induced by Staphylococcus aureus alpha-toxin--an intravital microscopic study on an isolated rat ileum. *Crit Care Med* 33:2810-016.
56. Saito, Y., C. Nakagawa, H. Uchida, F. Sasaki, and H. Sakakibara. 2001. Adrenomedullin suppresses fMLP-induced upregulation of CD11b of human neutrophils. *Inflammation* 25:197-201.
57. Vincent, J. L. and D. De Backer. 2005. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care* 9 Suppl 4:S9-12.
58. Craig, T. R., M. J. Duffy, M. Shyamsundar, C. McDowell, C. O' Kane, J. S. Elborn, and D. F. McAuley. 2010. A Randomized Clinical Trial of Hydroxymethylglutaryl-CoA reductase Inhibition for Acute Lung Injury (The HARP study). *Am J Respir Crit Care Med*.
59. Halm, E. A., J. P. Metlay, D. E. Singer, and M. J. Fine. 1996. Community-acquired pneumonia. *N Engl J Med* 334:862-863.
60. Clement, C. G., S. E. Evans, C. M. Evans, D. Hawke, R. Kobayashi, P. R. Reynolds, S. J. Moghaddam, B. L. Scott, E. Melicoff, R. Adachi, B. F. Dickey, and M. J. Tuvim. 2008. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 177:1322-1330.
61. Mizgerd, J. P. 2008. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med* 358:716-727.
62. Lührmann, A., U. Deiters, J. Skokowa, M. Hanke, J. E. Gessner, P. F. Muhlradt, R. Pabst, and T. Tschernig. 2002. In vivo effects of a synthetic 2-kilodalton macrophage-activating lipopeptide of Mycoplasma fermentans after pulmonary application. *Infect. Immun.* 70:3785-3792.

63. Meng, G., M. Rutz, M. Schiemann, J. Metzger, A. Grabiec, R. Schwandner, P. B. Lippa, F. Ebel, D. H. Busch, S. Bauer, H. Wagner, and C. J. Kirschning. 2004. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 113:1473-1481.
64. Palaniappan, R., S. Singh, U. P. Singh, R. Singh, E. W. Ades, D. E. Briles, S. K. Hollingshead, W. Royal, III, J. S. Sampson, J. K. Stiles, D. D. Taub, and J. W. Lillard, Jr. 2006. CCL5 modulates pneumococcal immunity and carriage. *J Immunol* 176:2346-2356.
65. van der Sluijs, K. F., L. J. van Elden, M. Nijhuis, R. Schuurman, J. M. Pater, S. Florquin, M. Goldman, H. M. Jansen, R. Lutter, and P. T. van der. 2004. IL-10 is an important mediator of the enhanced susceptibility to pneumococcal pneumonia after influenza infection. *J Immunol* 172:7603-7609.
66. van der, P. T., A. Marchant, C. V. Keogh, M. Goldman, and S. F. Lowry. 1996. Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* 174:994-1000.

Anteilerklärung

Holger Christian Müller hatte folgenden Anteil an den vorgelegten Publikationen:

Adrenomedullin attenuates ventilator-induced lung injury in mice

Müller HC, Witzenrath M, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Santel A, Suttorp N, Rosseau S.

Thorax. 2010 Dec;65(12):1077-84. Epub 2010 Oct 22

Anteil 75% Prozent

Der Promovend hat das Thema selbstständig ausgewählt, die experimentellen Modelle und Methoden selbstständig etabliert, Experimente durchgeführt und die Daten ausgewählt. Er hat das Manuskript geschrieben und unter Anleitung bis zur Publikation betreut und bearbeitet.

Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice.

Müller HC, Hellwig K, Rosseau S, Tschernig T, Schmiedl A, Gutbier B, Schreck B, Hippenstiel S, Peters H, Morawietz L, Suttorp N, Witzenrath M.

Crit Care. 2010;14(4):R143. Epub 2010 Jul 30.

Anteil 75% Prozent

Der Promovend hat das Thema selbstständig gewählt, die experimentellen Modelle und Methoden selbstständig etabliert, Experimente durchgeführt und Mitarbeiter dazu ausgebildet, Experimente in diesem Projekt unter seiner Aufsicht durchzuführen. Der Promovend hat die Daten ausgewertet, das Manuskript geschrieben und unter Anleitung bis zur Publikation betreut und bearbeitet.

Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia.

Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, van Laak V, Grote K, Zemlin MV, Gutbier B, Müller HC, Kursar M, Schütte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzenrath M.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2009 Apr;40(4):474-81. Epub 2008 Oct 17.

Anteil 10% Prozent

Der Promovend hat zu der Etablierung des murinen Pneumokokkenmodells beigetragen und die durchflusszytometrischen Analysen geplant und durchgeführt. Er war an der Erstellung des Manuskripts intensiv beteiligt.

PD Dr. med. M. Witzenrath

Holger C. Müller

Lebenslauf Holger Christian Müller

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

Publikationsliste

Originalarbeiten

- (1) Adrenomedullin attenuates ventilator-induced lung injury in mice
Müller HC, Witzenrath M, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Santel A, Suttorp N, Rosseau S.
Thorax. 2010 Dec;65(12):1077-84. Epub 2010 Oct 22
- (2) Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice.
Müller HC, Hellwig K, Rosseau S, Tschernig T, Schmiedl A, Gutbier B, Schmeck B, Hippenstiel S, Peters H, Morawietz L, Suttorp N, Witzenrath M.
Crit Care. 2010;14(4):R143.
- (3) Effects of Porphyromonas gingivalis on cell cycle progression and apoptosis of primary human chondrocytes.
Pischon N, Röhner E, Hocke A, N'Guessan P, **Müller HC**, Matziolis G, Kanitz V, Purucker P, Kleber BM, Bernimoulin JP, Burmester G, Buttgerit F, Detert J.
Ann Rheum Dis. 2009 Dec;68(12):1902-7.
- (4) Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia.
Witzenrath M, Schmeck B, Doehn JM, Tschernig T, Zahlten J, Loeffler JM, Zemlin M, **Müller H**, Gutbier B, Schütte H, Hippenstiel S, Fischetti VA, Suttorp N, Rosseau S
Crit Care Med. 2009 Feb;37(2):642-9.
- (5) Immunostimulation with macrophage-activating lipopeptide-2 increased survival in murine pneumonia.
Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, van Laak V, Grote K, Zemlin MV, Gutbier B, **Müller HC**, Kursar M, Schütte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzenrath M.
Am J Respir Cell Mol Biol. 2009 Apr;40(4):474-81.
- (6) The sphingosine-1-phosphate receptor agonist FTY720 increased lung permeability in mechanically ventilated mice.
Müller HC, Hocke AC, Hellwig K, Gutbier B, Peters H, Kube SM, Tschernig T, Schmiedl A, Hippenstiel S, Dje N'Guessane P, Rosseau S, Suttorp N, Witzenrath M
Pulm Pharmacol Ther. In revision

Abstracts

- Phosphodiesterase-isoenzyme-2 inhibition in a rat model of septic shock
Dorenberg M, Temmesfeld-Wollbrück B, **Müller H**, Suttorp N, Hippenstiel S
10. Kongress für Infektionskrankheiten und Tropenmedizin
DOI: 10.3205/10kit064, URN: urn:nbn:de:0183-10kit0644
- Simvastatin limitiert Beatmungsassoziierte Lungenschädigung im Mausmodell
Müller HC, Witzenrath M, Hellwig K, Tschernig T, Schmiedl A, Gutbier B, Schmeck B, Hippenstiel S, Peters H, Suttorp N, Rosseau S
Deutsche Gesellschaft für Internistische Intensiv- und Notfallmedizin
Intensivmed 2010 · 47:289–324 DOI 10.1007/s00390-010-0179-0

- Simvastatin Attenuates Ventilator-induced Lung Injury In Mice
Müller HC, Hellwig K, Tschernig T, Schmiedl A, Gutbier B, Schmeck B, Hippenstiel S, Peters H, Rosseau S, Suttorp N, Witzenrath M.
American Thoracic Society – Annual Conference 2010
Am J Respir Crit Care Med 181;2010:A1683
Assembly Award Critical Care Medicine American Thoracic Society 2010
- Simvastatin limitiert Beatmungsassoziierte Lungenschädigung im Mausmodell
Müller HC, Witzenrath M, Hellwig K, Tschernig T, Schmiedl A, Gutbier B, Schmeck B, Hippenstiel S, Peters H, Suttorp N, Rosseau S
51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2010
Pneumologie 2010; 64 DOI: 10.1055/s-0030-1251086
Science Preis der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2010
- Type I IFNs mediate innate intracellular defense to Legionella pneumophila
Opitz B, Lippmann J, **Müller HC**, van Laak V, Shin S, Taylor G, Suttorp N, Roy C
51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2010
Pneumologie 2010; 64 DOI: 10.1055/s-0030-1251248
- Blockade der Phosphodiesterase-2 reduziert Mortalität im septischen Schock der Ratte
M. Dorenberg/Berlin, B. Temmesfeld-Wollbrück, I. Flamme, **H. Müller**, S. Hippenstiel
51. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2010
Pneumologie 2010; 64 DOI: 10.1055/s-0030-1251387
- Simvastatin limitiert Beatmungsassoziierte Lungenschädigung im Mausmodell
Müller HC, Witzenrath M, Hellwig K, Tschernig T, Schmiedl A, Gutbier B, Schmeck B, Hippenstiel S, Peters H, Suttorp N, Rosseau S
Herbsttagung Sektion Zellbiologie Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2009
Pneumologie 2010; 64 DOI: 10.1055/s-0029-1247937
- Adrenomedullin limitiert Ventilator-induced lung injury und assoziierte Organdysfunktion
Müller HC, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Witzenrath M, Kasper M, Santel A, Suttorp N, Rosseau S
Deutsche Gesellschaft für Internistische Intensiv- und Notfallmedizin
Intensivmed 2009 · 46:252–288 DOI 10.1007/s00390-009-0067-7
- Immunostimulation with Macrophage-Activating Lipopeptide-2 Increased Survival in Murine Pneumonia.
Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, van Laak V, Grote K, Zemlin MV, Gutbier B, **Müller HC**, Kursar M, Schütte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzenrath M.
Am J Respir Crit Care Med 179;2009:A1021
- FTY720 Affects Endothelial Permeability in Ventilator-Induced Lung Injury.
Müller HC, Hocke AC, Peters H, Gutbier B, Hippenstiel S, Kube SM, Witzenrath M, Suttorp N, Rosseau S
American Thoracic Society – Annual Conference 2009
Am J Respir Crit Care Med 179;2009:A3824

- Role of Sphingosine 1 Phosphate (S1P) in Murine Pneumococcal Pneumonia.
Kube SM, Gutbier B, Hippenstiel S, Hocke AC, Haberberger R, Reppe K, **Mueller HC**, Schuette H, Rosseau S, Andratsch M, Mitchell TJ, Suttorp N, Witzenrath M
American Thoracic Society – Annual Conference 2009
Am J Respir Crit Care Med 179;2009:A3866
- Adrenomedullin Attenuates Ventilator-Induced Lung Injury and Related Organ Dysfunction in Mice
Müller HC, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Witzenrath M, Santel A, Kasper M, Suttorp N, Rosseau S.
American Thoracic Society – Annual Conference 2009
Am J Respir Crit Care Med 179;2009:A4686
International Trainee Travel Award 2009 of the American Thoracic Society - Assembly on Critical Care Medicine
- Pulmonale Immunstimulation mit MALP-2 vermindert die Mortalität der Pneumokokkenpneumonie in der Maus
Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, van Laak V, Grote K, Gutbier B, **Müller HC**, Kursar M, Schütte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzenrath M.
50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2009
Pneumologie 2009; 63 DOI: 10.1055/s-0029-1214011
- Adrenomedullin senkt pulmonalvaskuläre Permeabilität und verhindert renale Dysfunktion im Ventilator-induced lung injury
Müller HC, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Witzenrath M, Santel A, Kasper M, Suttorp N, Rosseau S.
50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2009
Pneumologie 2009; 63 DOI: 10.1055/s-0029-1214012
- Die Rolle des Sphingosine 1-Phosphat (S1-P) in der murinen Pneumokokken-Pneumonie
Kube SM, Hippenstiel S, Gutbier B, Hocke A, Haberberger R, Reppe K, **Müller HC**, Schütte H, Rosseau S, Kress M, Suttorp N, Witzenrath M
50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2009
Pneumologie 2009; 63 DOI: 10.1055/s-0029-1214014
- Dosisabhängige Beeinflussung vaskulärer Permeabilität im Ventilator-induced lung injury durch den Sphingosin 1- Phosphat Rezeptor Agonisten FTY720.
Müller H, Hocke AC, Gutbier B, Kube SM, Hippenstiel S, Witzenrath M, Suttorp N, Rosseau S
50. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2009
Pneumologie 2009; 63 DOI: 10.1055/s-0029-1214120
- Dosisabhängige Beeinflussung vaskulärer Permeabilität im Ventilator-induced lung injury durch den Sphingosin 1- Phosphat Rezeptor Agonisten FTY720.
Müller H, Hocke AC, Gutbier B, Kube SM, Hippenstiel S, Witzenrath M, Suttorp N, Rosseau S
Herbsttagung Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2008
Pneumologie 2009; 63 DOI: 10.1055/s-0029-1202454

- Adrenomedullin senkt pulmonalvaskuläre Permeabilität und verhindert renale Dysfunktion im Ventilator-induced lung injury
Müller HC, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Witzenrath M, Santel A, Kasper M, Suttorp N, Rosseau S.
Herbsttagung Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2008
Pneumologie 2009; 63 DOI: 10.1055/s-0029-1202453
- Die Rolle des Sphingosine 1-Phosphat (S1-P) in der murinen Pneumokokken-Pneumonie
Kube SM, Hippenstiel S, Gutbier B, Hocke A, Haberberger R, Reppe K, **Müller HC**, Schütte H, Rosseau S, Kress M, Suttorp N, Witzenrath M
Herbsttagung Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2008
Pneumologie 2009; 63 DOI: 10.1055/s-0029-1202449
- Pulmonale Immunstimulation mit MALP-2 vermindert die Mortalität der Pneumokokkenpneumonie in der Maus
Reppe K, Tschernig T, Lührmann A, van Laak V, Grote K, Gutbier B, **Müller HC**, Kursar M, Schütte H, Rosseau S, Pabst R, Suttorp N, Witzenrath M.
Herbsttagung Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2008
Pneumologie 2009; 63 DOI: 10.1055/s-0029-1202446
- Die Bedeutung von Lymphozyten für die pulmonale Immunabwehr bei der Pneumokokkenpneumonie - Distinkte Funktion varianter und invarianter NKT Zellen
Müller HC, Lüke S, Hocke AC, Suttorp N, Rosseau S
Herbsttagung Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2007
Pneumologie 2007; 61 DOI: 10.1055/s-2007-1032291

Weitere Vorträge

- Rolle von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Pneumokokkenpneumonie
Hocke AC, **Müller HC**, Lüke S, Wricke K, Witzenrath M, Schütte H, Suttorp N, Rosseau S
Jahrestagung der GV-Solas 2005
- Rolle von $\gamma\delta$ -T-Zellen in der Pneumokokkenpneumonie
Hocke AC, **Müller HC**, Lüke S, Wricke K, Witzenrath M, Schütte H, Suttorp N, Rosseau S
Herbsttagung Sektion Zellbiologie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin 2004

Selbständigkeitserklärung

„Ich, Holger Müller, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Neue Strategien zur Prophylaxe und Therapie des Lungenversagens bei Beatmung und Pneumonie“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin 15.11.2010

Holger C. Müller

Danksagung

Allen voran gilt meinen Eltern, meinem Bruder, Claudia und Lilly meine zutiefst empfundene Dankbarkeit für die immerwährende, selbstlose Unterstützung, den unerschütterlichen Glauben an mich und diese Arbeit und den bedingungslosen Rückhalt in allen Lebenslagen.

Meinem Kollegen und Betreuer PD Dr. Martin Witzenrath bin ich dankbar für die jahrelange Unterstützung, Betreuung und Motivation, sowie unsere Freundschaft.

Ich danke Dr. Simone Rosseau und Prof. Norbert Suttorp für die langjährige Unterstützung, Förderung und das mir gewährte Vertrauen.

Allen Kollegen der Medizinischen Klinik m.S. Infektiologie und Pneumologie, insbesondere natürlich den Kollegen in den Forschungslaboren am Campus Mitte, danke ich für die schöne Zeit, die immerwährende Hilfsbereitschaft, die konstruktive Kritik und dafür, dass Ihr so seid, wie Ihr seid. Ich freue mich auf die weitere Zeit mit Euch!