

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Campus Benjamin Franklin

Institut für Physiologie

Akuter Lungenschaden:
Pathogenese und neue
Zielstrukturen für therapeutische Interventionen

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

–

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Michael Mertens

aus Mechernich

Berlin, den 30. April 2009

1. Gutachter: Prof. Dr. Carsten Niemitz
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang M. Kübler

Tag der Disputation: 18.06.2009

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole	III
1 Einleitung	1
1.1 Klinische Bedeutung des akuten Lungenschadens	1
1.1.1 Pathophysiologie des akuten Lungenschadens.....	1
1.1.2 Beatmungsinduzierter- /assoziierter Lungenschaden.....	4
1.1.3 Mechanismen des beatmungsinduzierten Lungenschadens	4
1.2 Bestehende Behandlungsformen bei akutem Lungenschaden	6
1.2.1 Pharmakologische Intervention im ALI/ARDS.....	6
1.2.2 Beatmungskonzepte	10
1.3 Modelle zur Untersuchung der Alveoldynamik	11
1.4 Zielsetzung der Dissertation	12
2 Ergebnisse und Diskussion	15
2.1 Modellentwicklung der Intravitalmikroskopie an der beatmeten Mauslunge bei geschlossenem Thorax	15
2.2 Induktion des akuten Lungenschadens	17
2.2.1 Beatmungsinduzierter Lungenschaden	17
2.2.2 Säureaspirationsschaden	17
2.2.3 Ölsäure-induzierter Lungenschaden.....	18
2.2.4 Manifestation des Lungenschadens in unterschiedlichen Mausstämmen	19
2.3 Alveolarmorphologie.....	20
2.3.1 Bedeutung der Alveoldynamik	20
2.3.2 Alveolarmorphologie in der gesunden Lunge	22
2.3.3 Alveolarmorphologie in der aspirationsgeschädigten Lunge	24
2.4 Bedeutung von TRPV4 im beatmungsinduzierten Lungenschaden	27
2.4.1 Mechanismen des beatmungsinduzierten Lungenschadens	27
2.5 Pharmakologische Intervention	29
2.5.1 Effekt des Phosphodiesterase-III-Inhibitors Milrinon im akuten Lungenschaden	29
2.5.2 Effekt des Peptidhormons Ang(1-7) im akuten Lungenschaden.....	32
3 Zusammenfassung	35
3.1 Deutsche Zusammenfassung	35
3.2 English Summary.....	36
4 Literaturverzeichnis	38
5 Anhang	46
5.1 Veröffentlichungen.....	46

5.1.1	Paper	46
5.1.2	Buchbeiträge.....	47
5.1.3	Abstracts.....	47
5.2	Eigenanteil der Arbeit	50
5.3	Danksagung	52
	Eidesstattliche Versicherung	54

Verzeichnis der Abkürzungen und Symbole

AA	: <i>acid aspiration</i> , Säure Aspirationsschaden
AC	: Adenylatcyclase
ACE	: <i>angiotensin converting enzyme</i> , Angiotensin verarbeitendes Enzym
ACE2	: <i>angiotensin converting enzyme 2</i> , Angiotensin verarbeitendes Enzym 2
ALI	: <i>acute lung injury</i> , akuter Lungenschaden = Sammelbegriff für Lungenschädigung
AMP	: Adenosinmonophosphat
ARDS	: <i>acute respiratory distress syndrome</i> , akutes progressives Lungenversagen = schwerste Ausprägung des ALI
ATP	: Adenosintriphosphat
BAL	: bronchoalveoläre Lavage
bzw.	: beziehungsweise
bzgl.	: bezüglich
cAMP	: <i>cyclic adenosine monophosphate</i> , zyklisches Adenosinmonophosphat
cGMP	: <i>cyclic guanosine monophosphate</i> , zyklisches Guanosinmonophosphat
DAMP	: <i>damage associated molecular pattern</i> , Schadens-assoziiertes molekulares Muster
GPCR	: <i>G-protein coupled receptor</i> , G-Protein gekoppelter Rezeptor
k.o.	: <i>knock out</i> , Tier dem mittels genetischer Manipulation ein oder mehrere Gene ausgeschaltet wurden
mmHg	: Millimeter Quecksilbersäule, Druckeinheit
MPO	: Myeloperoxidase
OCT	: <i>optical coherence tomography</i> , optische Kohärenz Tomographie
OLA	: <i>open lung approach</i> , offener Lungen Ansatz
PEEP	: <i>positive end-expiratory pressure</i> , positiver endexpiratorischer Druck
PDE3	: Phosphodiesterase-III
SEM	: <i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
TLR4	: <i>Toll-like receptor 4</i> , Toll-ähnlicher Rezeptor 4
TRP	: <i>transient receptor potential</i> , transientes Rezeptorpotential
TRPV4	: <i>transient receptor potential vanilloid ion channel 4</i> , transienter Rezeptorpotential Vanilloid Ionen Kanal 4

- v.a. : vor allem
- vCT : Flachsicht-Computertomographie
- VALI : *ventilator associated lung injury*, beatmungsassoziierter Lungenschaden
- VILI : *ventilator induced lung injury*, beatmungsinduzierter Lungenschaden
- V_T : Tidalvolumen = Atemzugvolumen
- z.B. : zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung des akuten Lungenschadens

Der akute Lungenschaden (ALI) und seine schwerste Ausprägung, das akute progressive Lungenversagen (ARDS)^{1;2}, sind lebensbedrohliche Erkrankungen mit einer altersbereinigten Inzidenz von 86,2 pro 100.000 Personen/Jahr und einer Hospitalisierungsmortalität von 30 bis 40%^{3;4}. Schätzungen gehen alleine in den Vereinigten Staaten von 190.600 Patienten mit akutem Lungenschaden und 74.500 Toten pro Jahr mit insgesamt 3,6 Millionen Hospitalisierungstagen aus³. Die Behandlung und die Erforschung der Mechanismen des ALI haben somit eine substantielle Bedeutung für die öffentliche Gesundheit.

1.1.1 Pathophysiologie des akuten Lungenschadens

Die Pathophysiologie des akuten Lungenschadens lässt sich in drei charakteristische Phasen einteilen⁵:

- Inflammatorische Phase
- Proliferative Phase
- Fibrotische Phase

Die inflammatorische Phase zeichnet sich durch erhöhte Neutrophilenkonzentration, gesteigerte Zytokin- und Chemokinsynthese und/oder -ausschüttung, sowie ein interstitielles und alveolares Ödem aus. Im Anschluss kommt es zur proliferativen Phase mit einer Reorganisation der Infiltrate, in der insbesondere nekrotische Typ I Pneumozyten eine Hyperproliferation von Typ II Pneumozyten triggern, um den Verlust der Typ I Zellen auszugleichen. Ungefähr zehn Tage nach dem initialen Schaden kommt es zur dritten Phase, der fibrotischen Phase, in der das Lungengewebe vernarbt. Die Dehnbarkeit der Lunge ist stark eingeschränkt und das Tidalvolumen extrem verringert. Auch bei mechanischer Beatmung kommt es in dieser Phase häufig zur CO₂ Retention und Hypoxie. Sofern die Patienten nicht bereits in einer der vorangegangenen Phasen

verstorben sind, sterben sie in dieser Phase hauptsächlich an einer Sepsis, welche durch eine häufig auftretende beatmungsassoziierte Lungenentzündung oder eine andere nosokomiale Infektion hervorgerufen wird^{6;7}.

Die Pathogenese des akuten Lungenschadens ist nicht vollständig geklärt^{2;8;9}. Dies liegt an der Vielzahl der auslösenden Insulte und Erkrankungen (Infektionen, Verletzung, etc.), die zum einen pulmonalen, zum anderen systemischen Ursprungs sein können. Jedoch führen diese nicht zwangsläufig zum Lungenschaden, da bei weitem nicht alle Patienten mit diesen Ätiologien einen Lungenschaden entwickeln¹⁰. Neue Studien zeigen, dass eine genetische Prädisposition bzgl. Anfälligkeit und Schweregrad beim akuten Lungenschaden vorliegen kann¹¹.

Als wesentlicher Schritt in der Pathogenese wird die Initiierung einer überschießenden und gewebedestruktiven Entzündungsreaktion angesehen, wobei in jüngster Zeit auch eine zentrale Beteiligung des Gerinnungssystems¹² sowie einer epi- und endothelial-mesenchymalen Transition diskutiert werden¹³.

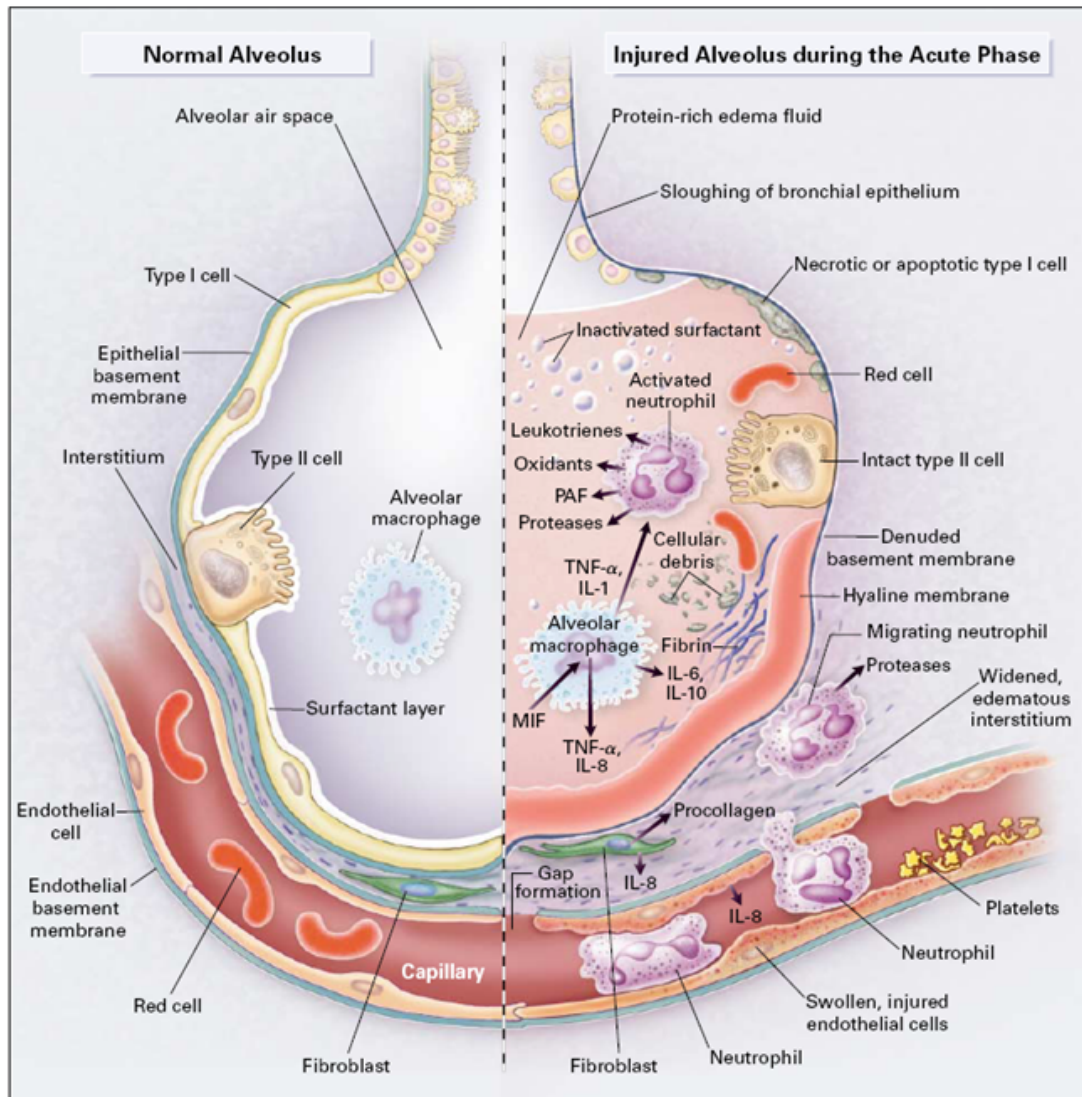


Abbildung mit freundlicher Genehmigung des *New England Journal of Medicine* verwendet.

Abb. 1: Der normale Alveolus (links) und der geschädigte Alveolus in der Akutphase des ARDS (rechts). In der akuten Phase des ARDS kommt es zu einer Verschorfung des bronchialen und alveolaren Epithels, es bilden sich auf den entblößten Membranbestandteilen Proteinreiche Hyalinmembranen. Neutrophile adherieren am verletzten kapillären Endothel und wandern durch das Interstitium in den Alveolarraum, welcher mit proteinreicher Ödemflüssigkeit gefüllt ist. Im Alveolarraum sezerniert der alveolare Makrophage Zytokine und Chemokine, welche weitere Effektorzellen rekrutieren und aktivieren. Die Ödembildung inaktiviert das Surfactant.

1.1.2 Beatmungsinduzierter- /assoziierter Lungenschaden

Eine Sonderform des ALI bildet der iatrogen durch maschinelle Beatmung einer zumeist bereits vorgeschädigten Lunge induzierte Lungenschaden¹⁴, der sogenannte beatmungsinduzierte Lungenschaden (ventilator induced lung injury, VILI)¹⁵. Der isoliert auf den Insult der maschinellen Beatmung zurückzuführende VILI ist allerdings nur im Tierexperiment zweifelsfrei belegbar, da in der Klinik eine protrahierte maschinelle Beatmung von Patienten ohne existierende Vorerkrankungen nicht vorkommt. Da der Kausalzusammenhang zwischen Beatmung und Lungenschädigung daher am Patienten nicht abschließend zu belegen ist, wird in der Klinik typischerweise vom beatmungsassozierten Lungenschaden (ventilator associated lung injury, VALI)¹⁶ gesprochen.

1.1.3 Mechanismen des beatmungsinduzierten Lungenschadens

Als ursächliche Mechanismen des VILI bzw. VALI werden vier unterschiedliche Hypothesen intensiv diskutiert, die sich *in vivo* voneinander kaum trennen lassen. Während man beim (1) Volutrauma von einer diffusen Alveolarschädigung durch Überdehnung der Alveolarwand aufgrund zu großer Tidalvolumina ausgeht¹⁵, basiert die Theorie des (2) Barotraumas auf der Vorstellung einer Schädigung der Lunge durch exzessive Drücke im Atemwegs- und Alveolarsystem¹⁵. Beim sogenannten (3) Atelektrauma wird eine Schädigung insbesondere des Alveolarepithels durch wiederholtes Öffnen und Schließen kollabierter Lungenabschnitte postuliert¹⁷, während die jüngere Hypothese des (4) Biotraumas von einer sowohl lokal-pulmonalen als auch systemischen Entzündungsreaktion mit Infiltration von neutrophilen Granulozyten und Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen ausgeht, die durch die Stimulation mechanosensitiver zellulärer Reaktionswege infolge der maschinellen Beatmung induziert wird^{18;19}.

Beatmung mit hohen Tidalvolumina (V_T) führt zu erhöhten Konzentrationen proinflammatorischer Zytokine in der bronchoalveolären Lavage (BAL)²⁰ und im Tierexperiment zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität mit nachfolgender

Ödembildung²¹. Das zeitgleiche Auftreten inflammatorischer Zytokine auch im Lungenperfusat²² ist zum einen auf eine Aktivierung des pulmonalen Gefäßendothels²³ und zum anderen auf eine pulmonale Barrierestörung mit Verlust der Kompartimentierung und Übertritt von Zytokinen aus dem Alveolarraum in die Blutzirkulation²⁴ zurückzuführen. Die Dissemination der Entzündungsreaktion wird als ursächlich für die Entwicklung eines Multiorganversagens angesehen, das eine der häufigsten Todesursachen bei akuten Lungenschäden darstellt. Insgesamt kann die Höhe der proinflammatorischen Plasma-Zytokinkonzentration und in der Lunge mit dem Grad der Mortalität von Lungenschadenspatienten korreliert werden^{25,26}.

Die zugrundeliegenden Mechanismen für die erhöhten Zytokinkonzentrationen bzw. die Ödembildung bei maschineller (Über-) Beatmung sind nicht abschließend geklärt. Held *et al.* postulierten, dass mechanische Stimuli die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen durch Phosphorylierung von I κ B und folgender Translokation des Transkriptionsfaktors NF κ B in den Nukleus induzieren²⁷. Der Ödembildung liegt eine pulmonale Permeabilitätsstörung zugrunde, die durch eine Erhöhung des intrazellulären sekundären Botenstoffs cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) teilweise vermindert werden kann²⁸. Die zellulären Mechanismen, über die der mechanische Stress diese intrazellulären Signalkaskaden triggert, sind bislang allerdings unbekannt.

Die Beschreibung der sogenannten TRP (transient receptor potential) Kanäle als multimodale sensorische Ionenkanäle in einer Vielzahl unterschiedlicher Spezies führte zur Identifikation einer Reihe neuer potentieller Mechanosensoren, die im Rahmen mechanoinduzierter Biotraumata von Relevanz sein könnten. Insbesondere für den Kationenkanal TRPV4 (transient receptor potential vanilloid ion channels 4) konnte in isolierten Lungen bereits eine funktionelle Rolle für den Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität bei Ventilation mit exzessiven Beatmungsdrücken nachgewiesen werden, so dass diesem Kanal als potentielltem Auslöser eines VILI/VALI eine wichtige Rolle zukommen könnte²⁹.

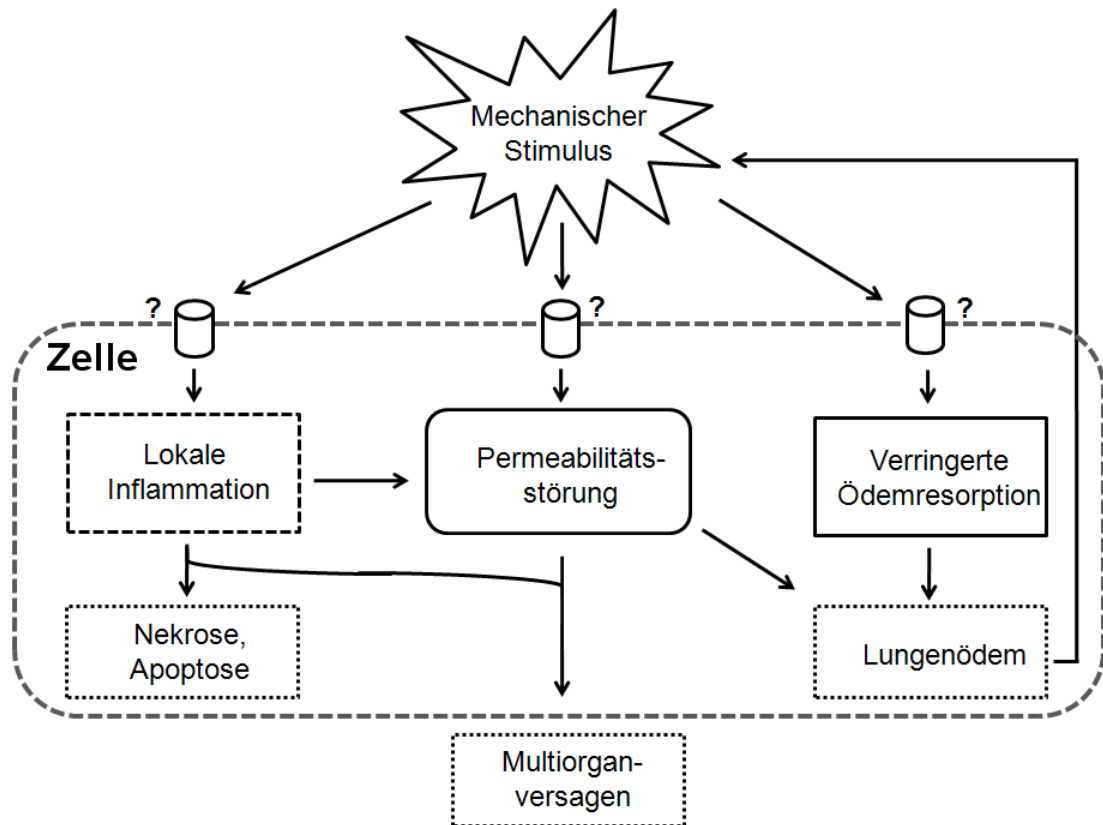


Abb. 2: Aufgrund eines mechanischen Stimulus, wie z.B. Beatmung mit hohen Drücken oder V_T , kommt es zu einer erhöhten lokalen Entzündungsreaktion, Permeabilitätsstörung und verringerter Ödemresorption im betroffenen Lungengewebe. Infolgedessen kommt es zu Nekrose/Apoptose und Lungenödembildung. Die Bildung eines Lungenödems verstärkt die negativen Effekte und Beatmung mit hohen Drücken/ V_T führt letztendlich zu einem Multiorganversagen, der häufigsten Todesursache beim ALI. Die Lungengewebsensorik bzgl. des mechanischen Stimulus ist unbekannt, jedoch wird eine Rolle des Mechanosensors TRPV4 vermutet.

1.2 Bestehende Behandlungsformen bei akutem Lungenschaden

1.2.1 Pharmakologische Intervention im ALI/ARDS

1.2.1.1 Klinische Studien

Eine effektive, spezifische und nebenwirkungsarme medikamentöse Intervention würde aus Sicht des behandelnden Arztes die ideale Therapieform des akuten Lungenschadens in der Klinik darstellen. In den letzten zehn Jahren wurden daher unterschiedlichste pharmakologische

Studien mit der Zielsetzung durchgeführt, die Morbidität und Mortalität bei ALI zu senken. Auf der Basis umfangreicher präklinischer Studien wurde eine Reihe potentieller medikamentöser Targets identifiziert und in prospektiv-randomisierten multizentrischen Studien getestet, so u.a. Stickstoffmonoxid, Surfactant, Cortison, Antimykotikum und TxA2-Synthase Hemmer Ketoconazol³⁰⁻³⁵. Jedoch konnte keine dieser klinischen Studien eine Verbesserung der Mortalität in der Substanzgruppe im Vergleich zur Placebo-Gruppe nachweisen, Morbidität und Mortalität stiegen bei einigen Studien sogar noch weiter an^{34;36}. Man geht davon aus, dass die Studien unter anderem deshalb erfolglos waren, da entweder unerwünschte Nebeneffekte zu groß waren oder die Wirkung der pharmakologischen Intervention nicht selektiv genug oder gezielt lokalisiert erfolgte. Ebenso werden die große Heterogenität des Patientenkollektivs hinsichtlich des ALI zugrundeliegenden Erkrankung und Co-Morbiditäten sowie weiterbestehende Unklarheiten in der Pathogenese des ALI^{2;8;9} als Gründe angenommen.

1.2.1.2 Phosphodiesterase-Hemmer

Publikationen der letzten Jahre legen einige neue potentielle Targets nahe. Phosphodiesterase-Hemmer hemmen den Abbau zyklischer Nukleotide und führen so in Abhängigkeit von Isoform-Spezifität und Zelltyp zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) und zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). Phosphodiesterase-III (PDE3), das die hydrolytische Spaltung von cAMP zu Adenosinmonophosphat (AMP) vermittelt, wird u.a. in pulmonalen Endothel- und Epithelzellen sowie in den glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert. Da eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Konzentration Entzündungsreaktionen abschwächt^{37;38}, die Bildung von Lungenödem vermindert^{39;40}, die Endothelfunktion verbessert³⁹ und die pulmonale Gefäßbahn zu erweitern vermag⁴¹, stellt die Hemmung der PDE3 einen neuen und vielversprechenden therapeutischen Ansatz für die Behandlung des ALI dar. Klinisch werden PDE3-Hemmer insbesondere als Inodilatoren in

der Kardiochirurgie eingesetzt und systemisch appliziert. Aufgrund ihrer vasodilatierenden Wirkung haben sie jedoch blutdrucksenkende Eigenschaften im systemischen Kreislauf, die bei der Therapie multimorbider ALI-Patienten mit häufiger Sepsis- und/oder Schock-Problematik eher kontraindiziert sind. Daher wäre die pulmonal-selektive Administration prinzipiell vorzuziehen, um ungewollte systemische Nebeneffekte zu minimieren.

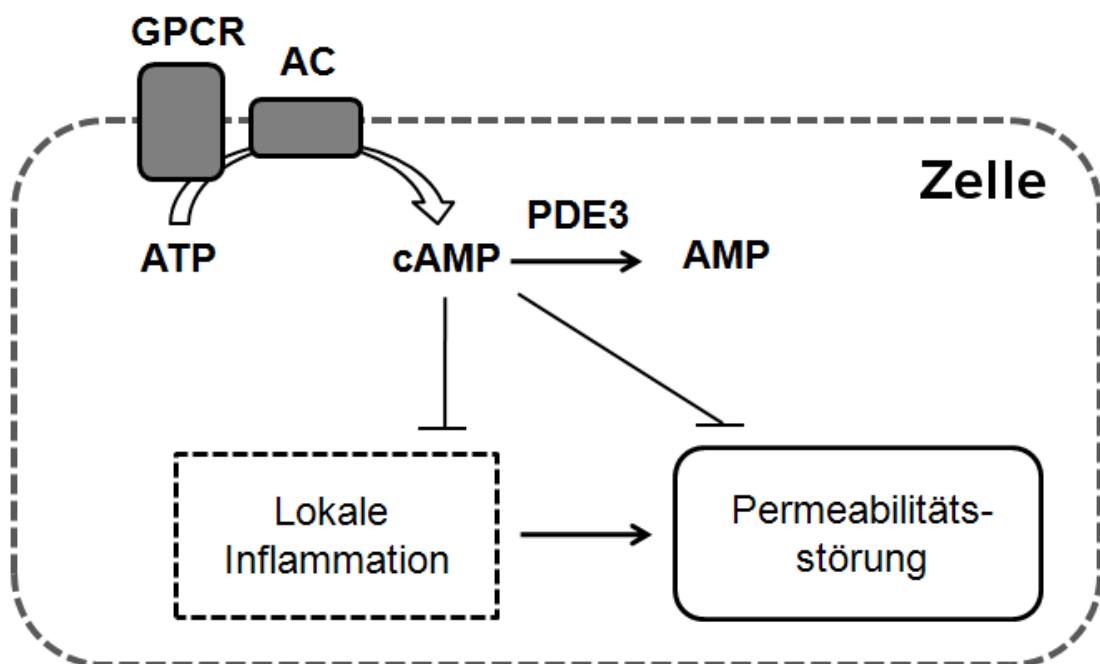


Abb. 3: Adenylatcyclasen (AC) katalysieren die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) mittels einer G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) Signaltransduktion. Intrazelluläre hohe cAMP Konzentrationen schwächen Entzündungsreaktionen ab und vermindern die Bildung von Lungenödem. Phosphodiesterase-III (PDE3) hydrolysiert cAMP zu Adenosinmonophosphat (AMP), durch Inhibition von PDE3 kann die intrazelluläre cAMP Konzentration erhöht werden.

1.2.1.3 Modulatoren des Renin-Angiotensin-Systems

Neben seiner etablierten Rolle in der Regulation von Salz- und Wasserhaushalt sowie Blutdruck wird dem Renin-Angiotensin-System (RAS) seit kurzem auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese des akuten Lungenschadens zugesprochen⁴². Die Arbeitsgruppe von Josef Penninger konnte zeigen, dass eine Reduktion des endogenen Angiotensinogen II Spiegels durch Aktivierung des ACE2 (Angiotensin Converting Enzym 2) mit einer Reduktion des akuten Lungenschadens im Tiermodell einhergeht⁴². Die nachgewiesenen protektiven Effekte der Überexpression von ACE2⁴³ oder der Hemmung des Angiotensin II Rezeptors^{143;44} sind allerdings theoretisch auch durch eine vermehrte Bildung des Heptapeptids Angiotensin(1-7) durch ACE2 und die Aktivierung nachgeschalteter rezeptorvermittelter Signalwege zu erklären. Dieses alternative Wirkmodell wurde bislang allerdings nicht experimentell getestet.

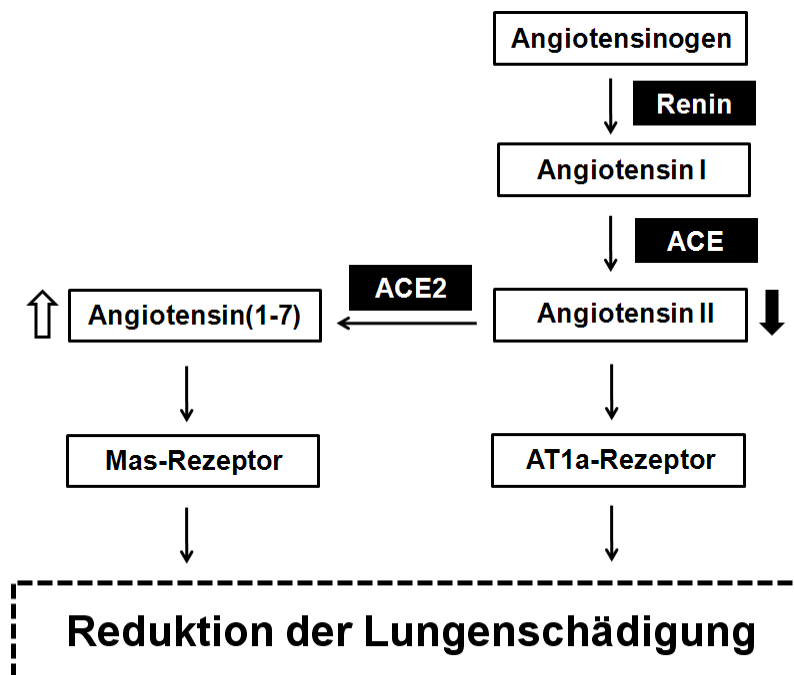


Abb. 4: Angiotensinogen wird durch die Protease Renin zu Angiotensin I abgebaut. Das Angiotensin verarbeitendes Enzym (ACE) wandelt Angiotensin I in Angiotensin II um. Eine Reduktion des Angiotensin II Levels durch Aktivierung des Angiotensin verarbeitenden Enzyms 2 (ACE2) führt zu einer verminderten Aktivierung des AT1a-Rezeptors und reduziert den Lungenschaden. Das Abbauprodukt von Angiotensin II durch ACE2 ist Angiotensin(1-7). Ein protektiver Effekt durch Erhöhung des Angiotensin(1-7) Levels ist nicht auszuschließen.

1.2.2 Beatmungskonzepte

Im Jahr 2000 konnte die wegweisende ARDSnetwork Studie zeigen, dass eine Verminderung des bis dahin standardmäßig verwendeten Tidalvolumens von 10-12 ml/kg auf 6 ml/kg mit einer Reduktion der Mortalität von 22% in einem heterogenen Patientenkollektiv einher ging⁴⁵ und eine verringerte Prävalenz des VALI aufwies¹⁴.

Experimentelle wie klinische Untersuchungen fokussieren seither verstärkt auf eine weitere Optimierung der Beatmungskonzepte. So wird u.a. versucht, das Auftreten des Atelektraumas durch Rekrutierungsmanöver mit zeitlich begrenzten hohen Spitzendrücken⁴⁶ zu vermeiden und durch Erhöhung des positiv endexpiratorischen Drucks (positive end-expiratory pressure, PEEP)⁴⁷ oder durch die Kombination beider Strategien den Kollaps von Alveolen und größeren Lungenbereichen zu minimieren (open lung approach, OLA)⁴⁸. Allerdings konnte keines dieser neuen Konzepte bisher in einer prospektiven multizentrischen klinischen Studie in Bezug auf Morbidität und Mortalität überzeugen^{49;50}.

Viele dieser innovativen Ansätze bauen konzeptionell direkt oder indirekt auf den Arbeiten der Arbeitsgruppe von Gary Nieman auf⁵¹⁻⁵³. Diese stellten auf der Grundlage intravitalmikroskopischer Untersuchungen das bis dahin gültige Konzept der alveolaren Aufweitung während der Inspiration in Frage. Ersetzt wurde es durch ein Modell, in dem die Volumenänderung der Lunge während des Atemzyklus vorrangig durch das zyklische Öffnen (=Rekrutieren) und Kollabieren von Alveolen erklärt wird. Die gegenläufigen Konzepte von sich ausdehnenden vs. zyklisch rekrutierten Alveolen sind von essentieller Relevanz für die Ausarbeitung neuer Beatmungskonzepte. Während rekrutierbare Alveolen durch hohe Drücke/ V_T zur Gasaustauschfläche hinzukämen, würden sich ausdehnende Alveolen bei zu hohen Drücken/ V_T überdehnt und geschädigt werden¹⁵.

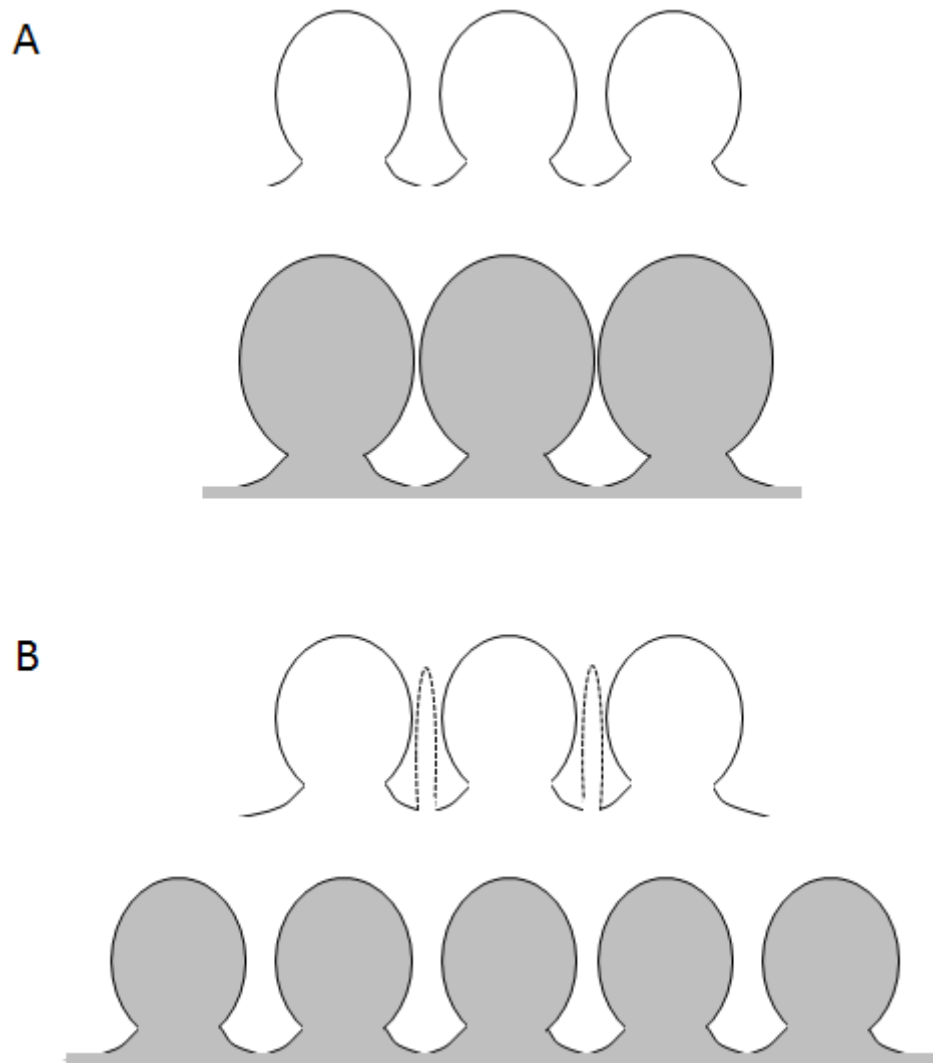


Abb. 5: (A) Im klassischen Alveolarmodell weiten sich die Alveolen in der Inspiration gleichmäßig auf. (B) Im neu postulierten Rekrutierungs-Derekrutierungsmodell werden zusätzliche Alveolen bei Inspiration rekrutiert und hierdurch die Sauerstoffaustauschfläche erhöht. Die bereits eröffneten Alveolen durchlaufen keine Konformationsänderung.

1.3 Modelle zur Untersuchung der Alveolardynamik

Die Untersuchung der Alveolardynamik am Tiermodell wird durch die schlechte Zugänglichkeit der zu untersuchenden Alveolarstrukturen und die Notwendigkeit einer hohen zeitlichen wie räumlichen Auflösung erheblich erschwert. Letztere Probleme können zwar insbesondere durch die Technik

der Lungen-Intravitalmikroskopie umgangen werden, bestehende Modelle unterliegen allerdings strukturell bedingten Einschränkungen. So fehlt isoliert-perfundierten Lungenmodellen⁵⁴⁻⁵⁶ die thorakale Komponente. Diese stellt jedoch einen essentiell die Gewebedynamik bestimmenden Bestandteil des respiratorischen Systems dar. Des Weiteren können Inflammation und pharmakologische Intervention in diesen Modellen nur sehr eingeschränkt untersucht werden. *In vivo* Modelle^{51;53} erlauben Untersuchungen bzgl. Inflammation und die Austestung neuer medikamentöser Strategien, jedoch wird auch hier in den bislang publizierten Modellen die Alveolardynamik stets unter den biomechanisch alterierten Bedingungen eines offenen Thorax und unter mechanischer Fixierung des untersuchten Lungengewebes analysiert^{51;53}. Wünschenswert wäre daher ein *in vivo* Modell, das die Erfassung der Alveolardynamik bei geschlossenem Thorax ohne mechanische Manipulation des Beobachtungsareals gestattet. Eine zusätzliche Übertragung auf gen-defiziente oder transgene Tiere würde zudem die Untersuchung molekular-biochemischer Prozesse des Lungenschadens vorantreiben.

1.4 Zielsetzung der Dissertation

Trotz vielfältiger Bemühungen gibt es bisher, abgesehen von der Beatmung mit niedrigen Tidalvolumina, keine lebensverlängernde Therapie des Lungenschadens, so dass Morbidität und Mortalität des ALI/ARDS seit der Erstbeschreibung 1967 auf nahezu unverändert hohem Niveau verharren und keinerlei Reduktion in den letzten Jahren aufweisen⁵⁷. Dem Fehlen effektiver kausaler wie symptomatischer medikamentöser Therapien liegt neben der Heterogenität der Erkrankung insbesondere das geringe Verständnis ihrer Pathogenese zugrunde. Daher ist es essentiell, die initialen Mechanismen der Schädigung auf zellulärer Ebene und v.a. die zugrundeliegenden Mechano-transduktionswege weiter zu erforschen, sowie die Alveolardynamik der gesunden und vorgeschädigten Lunge bei verschiedenen Beatmungsstrategien unter standardisierten Bedingungen in

einem Modellorganismus zu charakterisieren. Des Weiteren können in einem standardisierten Tiermodell pharmakologische Interventionen wie die lungenspezifische Inhalation von Phosphodiesterase-III-Hemmern oder potentielle protektive Effekte des Angiotensin II-Metaboliten Ang(1-7) getestet werden.

Auf der Grundlage dieser Erfordernisse definieren sich die Ziele der vorliegenden Arbeit wie folgt:

1. Im ersten Schritt soll ein intravitalmikroskopisches Tiermodell entwickelt werden, das erstmals die Analyse der Alveolardynamik der gesunden und der geschädigten Lunge bei geschlossenem Thorax und ohne mechanische Lungenfixierung ermöglicht. Um in diesem Modell durch Analyse gen-defizienter oder transgener Tiere auch zelluläre und molekulare Mechanismen untersuchen zu können, soll die Technik im Mausmodell etabliert werden.
2. Mit Hilfe dieses Modells soll im Anschluss die Alveolardynamik der beatmeten gesunden und lungengeschädigten Maus untersucht werden. Als Schadensmodell wird hierzu aufgrund der klinischen Relevanz das etablierte Modell des Säureaspirationsschadens gewählt⁵⁸.
3. In einer weiteren Versuchsreihe soll die Rolle des mechanosensitiven Ionenkanals TRPV4 in der Pathogenese des akuten beatmungsinduzierten Lungenschadens untersucht werden. Hierzu sollen in Wildtyp- und TRPV4-defizienten Mäusen nach Beatmung mit lungenschädigenden Tidalvolumina Gasaustausch, Lungenödem und Entzündungsreaktion quantifiziert werden.
4. Das therapeutische Potential einer lungenspezifischen Inhibition von PDE3 soll getestet werden. Hierzu sollen die Effekte einer inhalativen Verabreichung des klinisch zugelassenen PDE3-Inhibitors Milrinon an zwei Modellen des ALI untersucht werden: im Mausmodell des Säureaspirationsschadens, einem Lungenepithelschaden, und im Rattenmodell des Ölsäure-induzierten Lungenschadens, einem Gefäßendothelschaden⁵⁸.

5. Schließlich sollen potentiell therapeutische Effekte von Ang(1-7) im Modell des beatmungsinduzierten Lungenschadens am Mausmodell getestet werden.

2 Ergebnisse und Diskussion

2.1 Modellentwicklung der Intravitalmikroskopie an der beatmeten Mauslunge bei geschlossenem Thorax

BalbC Mäuse wurden anästhesiert, tracheotomisiert und mechanisch beatmet. Die Vena jugularis und die Arteria carotis wurden katheterisiert. Durch Entfernen der 3. bis 5. Rippe wurde ein kreisrunder optischer Zugang zur oberen rechten Lunge geschaffen. Der offene Thorax wurde mit einer transparenten Membran luftdicht verschlossen und der physiologische negative Pleuradruck mittels eines diaphragmalen Katheters wieder hergestellt⁵⁹.

Dieses Modell ermöglicht mittels Intravitalmikroskopie die Visualisierung und quantitative Erfassung der Alveolarmorphologie und atemabhängigen Alveolardynamik, der pulmonalen Mikrozirkulation und Zell-Zell-Interaktion. Die Beobachtungen mit einer räumlichen und zeitlichen Auflösung von ca. 0,5 μm und 50 Hz in einem über einen Beobachtungszeitraum von mindestens 2 Stunden hämodynamisch stabilen Tiermodell ermöglichen erstmals die *in vivo* Visualisierung vaskulärer, inflammatorischer und alveolardynamischer Prozesse und die Untersuchung zugrundeliegender Mechanismen durch Verwendung geeigneter transgener Tiermodelle.

Im Vergleich zu bestehenden intravitalmikroskopischen Modellen am offenen Thorax mit verschiedenen Arten der Lungenfixierung⁵¹ verzichtet dieses Modell auf direkte mechanische Alterationen der beobachteten Lungenoberfläche und bildet daher die physiologische Situation in besonderem Maße ab. Gegenüber früheren intravitalmikroskopischen Modellen der Arbeitsgruppe am Kaninchen⁶⁰ gewährleistet es erstmals die Untersuchung transgener Tiere. Andere methodische Ansätze wie z.B. histologische und stereologische Analysen liefern wertvolle Informationen zur Alveolarmorphologie, können aber insbesondere die dynamischen Prozesse im Alveolar- und Mikrogefäßbereich nicht erfassen⁶¹.

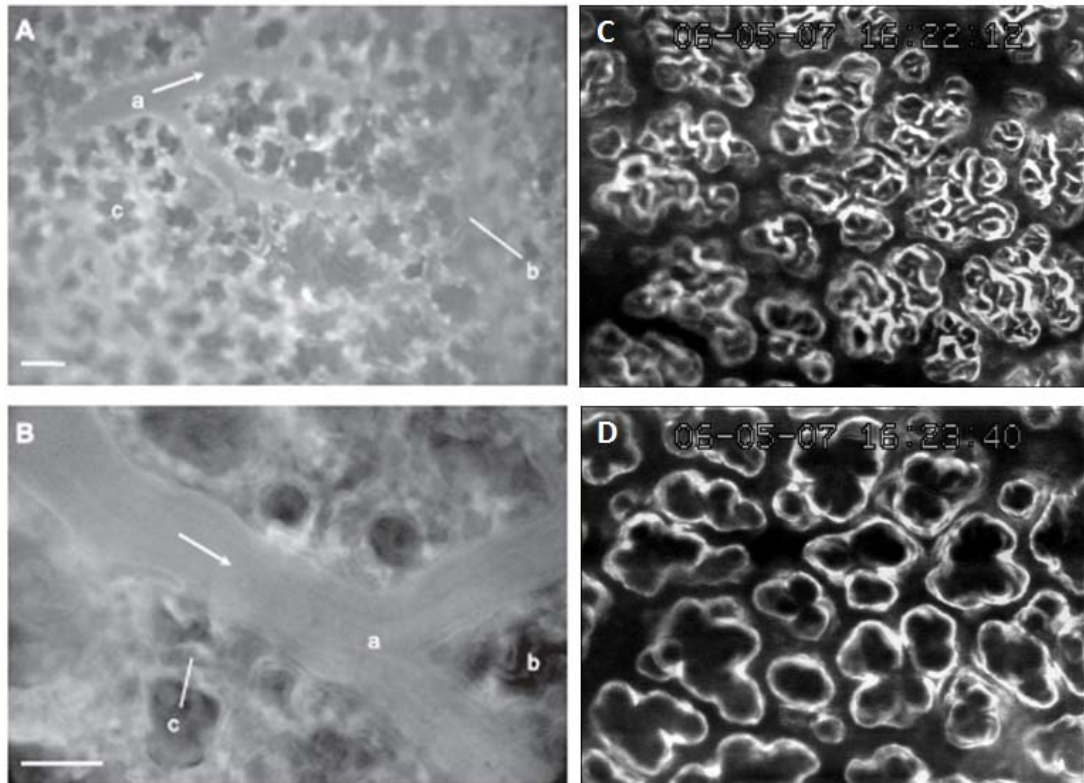


Abb. 6: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Lungen Mikroperfusion (A,B) und Dunkelfeldbeleuchtungsaufnahmen der Alveolardynamik im Atemzyklus (C,D). (A) Aufnahmen mittels eines 10x Objektivs zeigen eine pulmonale Arteriole und deren Abzweigungen (a) an der Begrenzung zum rechten oberen Lungenlappen (b). Subpleurale Alveolen (c) sind eingebettet zwischen den perfundierten Gebieten. (B) Aufnahmen bei 20x Vergrößerung zeigen eine Bifurkation einer Arteriole, Alveolarsegmente (b) und das Kapillarnetzwerk (c). Mittels Dunkelfeldbeleuchtung visualisierte Alveolen bei niedrigem Beatmungsdruck (C) und hohem Beatmungsdruck (D).

Die Etablierung und Validierung des Modells wird im Detail in der Publikation „Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation“ (Tabuchi A, Mertens M, Kuppe H, Pries AR, Kuebler WM; *J Appl Physiol* 2008) beschrieben.

2.2 Induktion des akuten Lungenschadens

2.2.1 Beatmungsinduzierter Lungenschaden

Zur Auslösung eines VILI wurden C57/Bl6J Mäuse über 2 Stunden mit einem V_T von 20 ml/kg Körpergewicht (bw), bei einer Atemfrequenz von 60/min und einem PEEP von 2 mmHg beatmet. Gegenüber Kontrolltieren, die mit einem V_T von 10 ml/kg bw bei einer Atemfrequenz von 150/min und PEEP von 2 mmHg ventilert wurden, führte dieses Beatmungsregime zu einer Gasaustauschstörung mit Lungenödem (Feucht/Trocken-Gewicht Verhältnis) und Infiltration inflammatorischer Zellen (Myeloperoxidase Aktivität), die mit den charakteristischen klinischen Veränderungen bei beatmungsinduziertem Lungenschaden im Einklang sind.

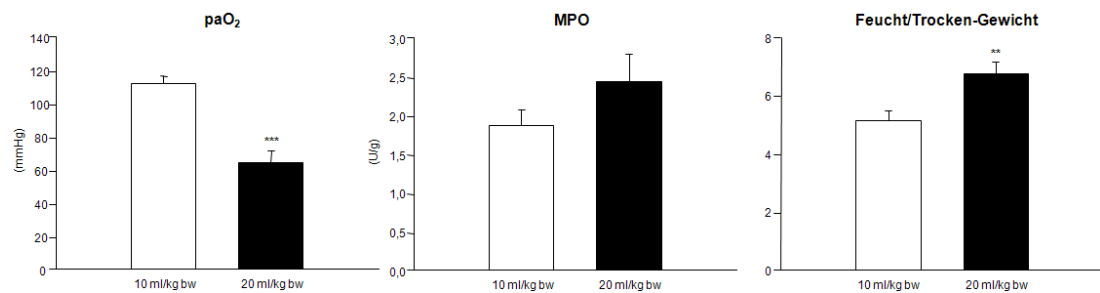


Abb. 7: Lungen beatmet mit hohen V_T zeigen nach zwei Stunden einen signifikant verringerten Sauerstoffpartialdruck (paO_2), signifikant erhöhtes Ödem (Feucht/Trocken-Gewicht Verhältnis) und erhöhte Myeloperoxidaseaktivität (MPO) in der Lunge. Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von jeweils n=5 Mäusen; **p<0,01, ***p<0,001 20 ml/kg bw vs. 10 ml/kg bw.

2.2.2 Säureaspirationsschaden

Die Induktion des Säureaspirationsschadens erfolgte entsprechend der etablierten Methodik von Imai und Mitarbeitern⁶² durch intratracheale Instillation von HCl (pH 1,5), während Kontrolltieren 0,9% NaCl-Lösung instilliert wurde. Der Säureaspirationsschaden zeichnete sich durch eine Neutrophilenakkumulation in der Lunge und eine ausgeprägte Hypoxie bei nur geringer Ödembildung aus.

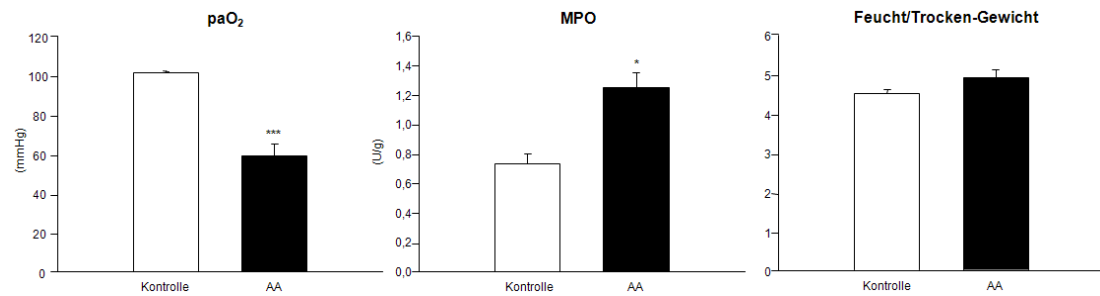


Abb. 8: Aspirationsgeschädigte Lungen (AA) weisen einen reduzierten paO_2 , erhöhte Myeloperoxidaseaktivität (MPO), aber keine signifikante Ödembildung auf. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM von jeweils n=5 Mäusen; * p <0,05, *** p <0,001 AA vs. Kontrolle.

Details bzgl. der Methodik werden in der Publikation „Alveolar dynamics in acute lung injury: heterogeneous distension rather than cyclic opening and collapse“ (Mertens M, Tabuchi A, Meissner S, Krueger A, Schirrmann K, Kertzsch U, Pries AR, Slutsky AS, Koch E, Kuebler WM; *Crit Care Med* 2009) beschrieben.

2.2.3 Ölsäure-induzierter Lungenschaden

Hierzu wird entsprechend der etablierten Technik von Schuster⁶³ im Rattenmodell durch einmalige Bolusinfusion von 0,2 mg/kg Ölsäure (OA) ein Lungenschaden induziert, der sich wiederum entsprechend dem klinischen Bild von ALI/ARDS durch Hypoxie, Lungenödem und inflammatorischer Reaktion auszeichnet.

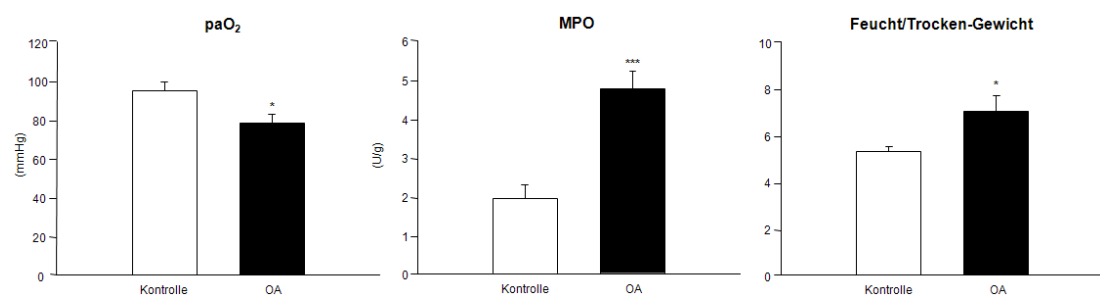


Abb. 9: Ölsäure geschädigte Lungen (OA) zeigen einen reduzierten paO_2 , stark erhöhte Myeloperoxidaseaktivität und signifikante Ödembildung auf. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM von jeweils n=5 Ratten; * $p<0,05$, *** $p<0,001$ OA vs. Kontrolle.

Details bzgl. der Methodik werden in der Publikation „Inhaled milrinone attenuates experimental acute lung injury“ (Buelmann M, Kong X, Mertens M, Yin N, Yin J, Liu Z, Koster A, Kuppe H, Kuebler WM; *Intensive Care Med* 2008) beschrieben.

2.2.4 Manifestation des Lungenschadens in unterschiedlichen Mausstämmen

Das VILI Modell wurde neben C57/Bl6J Mäusen auch in BalbC Mäusen etabliert, die sich im Vergleich zu C57/Bl6J als wesentlich resistenter gegen VILI erwiesen. BalbC Tiere zeigten selbst bei hohen V_T von 24 ml/kg KG bei einem PEEP von 0 mmHg (ZEEP) nach 2 Stunden kaum Ödembildung und keine Abnahme des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks (paO_2), während C57/Bl6J Tiere bei gleicher Beatmung bereits nach einer Stunde verstarben (n=5). Die Versuche wurden daraufhin in C57/Bl6J Mäusen bei niedrigeren V_T und Anpassung des PEEPs auf 2 mmHg wiederholt. Selbst bei dieser, im Vergleich zu den höheren V_T in BalbC Tieren lungenschonenderen Beatmung kam es zu einem sehr ausgeprägten VILI, gekennzeichnet durch Hypoxie und Lungenödem.

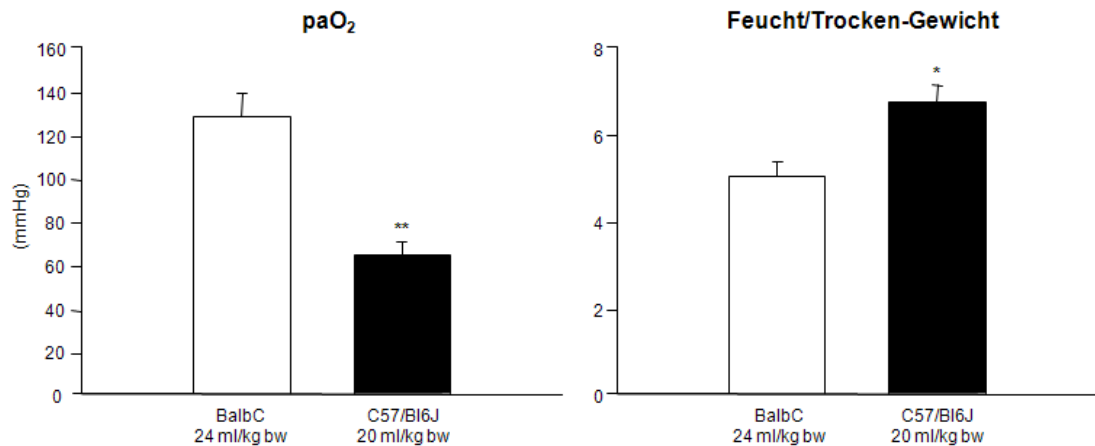


Abb. 10: C57/Bl6J Mäuse, beatmet für zwei Stunden mit dem niedrigeren V_T von 20 ml/kg bw, zeigen im Gegensatz zu BalbC Mäusen, beatmet für zwei Stunden mit 24 ml/kg bw, eine stark verringerte paO_2 und erhöhtes Lungenödem. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM von jeweils n=5 Mäusen; * p <0,05, ** p <0,01.

Dieser interessante Befund deckt sich mit Beobachtungen aus der Klinik, die besagen, dass der genetische Hintergrund ein wichtiger Faktor für die Entwicklung bzw. den Verlauf des Lungenschadens ist^{64;65}. Einige Patienten entwickeln die typischen Symptome für einen ALI oder gar ARDS und überleben, während Patienten mit einer vermeintlich besseren Prognose sterben. Weiterführende Einblicke in die genetischen Grundlagen bei der Pathogenese und Manifestation des ALI würden die Entwicklung neuartiger pharmakologischer Wirkmechanismen bzw. individuelle Beatmungsstrategien aufgrund der genetischen Prädisposition erlauben.

2.3 Alveolarmorphologie

2.3.1 Bedeutung der Alveolardynamik

Die wesentliche Voraussetzung für die Optimierung von Beatmungstechniken liegt im Verständnis der Alveolardynamik. Bei Spontanatmung herrscht während der Inspiration ein vom Zwerchfell bzw. der Interkostalmuskulatur erzeugter leichter Unterdruck in den Alveolen, welcher einen Einstrom der Luft über Nase oder Mundraum zur Folge hat. Zum Ende des

Inspirationszyklus kommt es zum Druckausgleich zwischen Alveolar- und Außenluftdruck. Bei der maschinellen Beatmung erfolgt der Luftstrom nicht passiv, sondern aktiv mittels eines künstlichen Überdrucks. Die Auswirkungen dieses Druckgradienten auf die Alveolarmorphologie sind umstritten und bedürfen wissenschaftlicher Untersuchung, um Beatmungsmanöver zu optimieren.

Untersuchungen in den 1960ern an bei unterschiedlichen Druckstufen fixierten Lungen bzw. in späteren Lungenfenstermodellen legten eine gleichmäßige Aufweitung der Alveolen mit zunehmender Inspiration nahe⁶⁶. Da es sich jedoch um fixierte Lungengewebsschnitte handelte und so die gleichen Alveolen bei verschiedenen Druckstufen nicht im selben Tier visualisiert werden konnten, bestanden Zweifel an der klinischen Relevanz dieser Datensätze. Nieman und Mitarbeiter entwickelten ein intravitalmikroskopisches Tiermodell, welches die Visualisierung der Alveolarkinetik am offenen Thorax erlaubt⁵¹. In diesem Modell fanden Nieman und Kollegen keine gleichmäßige Aufweitung der Alveolen, sondern eine druckabhängige Rekrutierung und Derekrutierung von einzelnen Alveolen, wohingegen die übrigen Alveolen während des Atemzyklus keine strukturellen Veränderungen aufzeigten. Dieser Befund zeigt, dass im Lungenschaden höhere Inspirations- und Expirationsdrücke appliziert werden müssten, um mit dem Ziel einer Maximierung der Gasaustauschfläche möglichst viele Alveolen zu rekrutieren und offen zu halten. Eine Überdehnung des Gewebes ist in diesem Fall nur wenig zu befürchten, da sich die Struktur der bereits eröffneten Alveolen bei steigendem Druck nicht verändert. Diese Beatmungsmethode steht allerdings im Widerspruch zu den postulierten protektiven Effekten niedriger Tidalvolumina in der ARDSnetwork Studie⁶⁷ und führte zur Entwicklung von Beatmungsstrategien, welche hohe PEEP-Level und/oder Rekrutierungsmanöver mit hohen inspiratorischen Beatmungsdrücken präferieren. Wir untersuchten diese beiden widersprüchlichen Thesen, d.h. die gleichmäßige Aufweitung der Alveolen während der Inspiration einerseits und die zyklische Rekrutierung und Derekrutierung einzelner Alveolen

andererseits in unserem intravitalmikroskopischen Modell zur Untersuchung der Mauslunge. Dieses bietet nicht nur gegenüber statischen Untersuchungen an fixierten Lungen, sondern auch gegenüber den neueren intravitalmikroskopischen Modellen einige wesentliche Vorteile: Zum einen werden die Lungen bei geschlossenem Thorax untersucht, so dass ein negativer intrapleuraler Druck bestehen bleibt, der das Kollabieren der Lunge verhindert. Des Weiteren wird kein mechanischer Druck auf das untersuchte Gewebe ausgeübt.

2.3.2 Alveolarmorphologie in der gesunden Lunge

Die Alveolarmorphologie der gesunden Mauslunge wurde bei den Beatmungsdruckstufen 0, 6, 12, 18 und 24 mmHg aufgezeichnet. Aus den 2-dimensionalen Abbildungen der subpleuralen Alveolen konnte eine druckabhängige Druck-Flächen-Beziehung konstruiert werden. Diese deckt sich im Wesentlichen mit den in der Klinik gemessenen Druck-Volumen-Kurven des respiratorischen Systems⁶⁸. Über den kompletten applizierten Druckbereich konnte keinerlei Rekrutierung oder Derekrutierung einzelner Alveolen detektiert werden: alle Alveolen waren bei jeder Druckstufe klar identifizierbar und geöffnet.

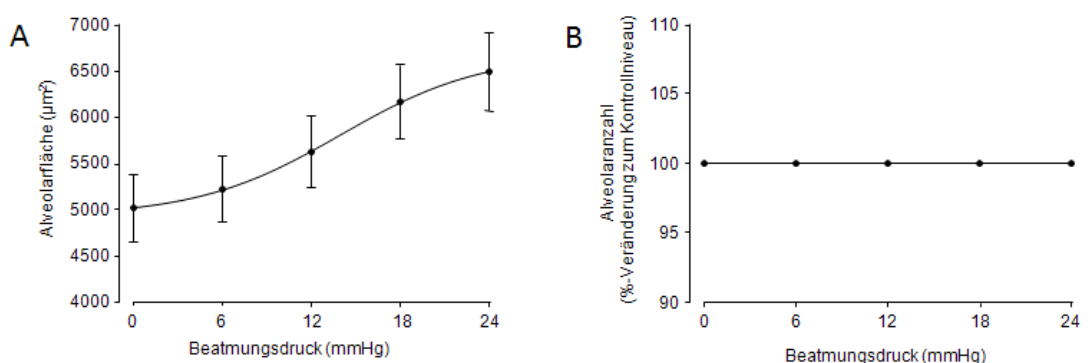


Abb. 11: (A) Daten zeigen eine sigmoidale Beziehung bzgl. der planimetrischen Alveolarflächen und des Beatmungsdrucks über den Druckbereich von 0 bis 24 mmHg. (B) Über den gesamten applizierten Druckbereich blieb die Alveolaranzahl konstant. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM von 264 analysierten Alveolen in $n=11$ Mäusen. Flächen/Druck-Beziehung in (A) wurde durch eine 4-parametrische sigmoidale, nicht-lineare Regression beschrieben ($r^2 = 1,0$).

Über eine in Kooperation mit der TU Dresden entwickelte Methode zur Visualisierung subpleuraler Alveolen mittels optischer Kohärenz-Tomographie (OCT) konnte die Aufweitung von einzelnen Alveolen dreidimensional *in vivo* dargestellt werden.

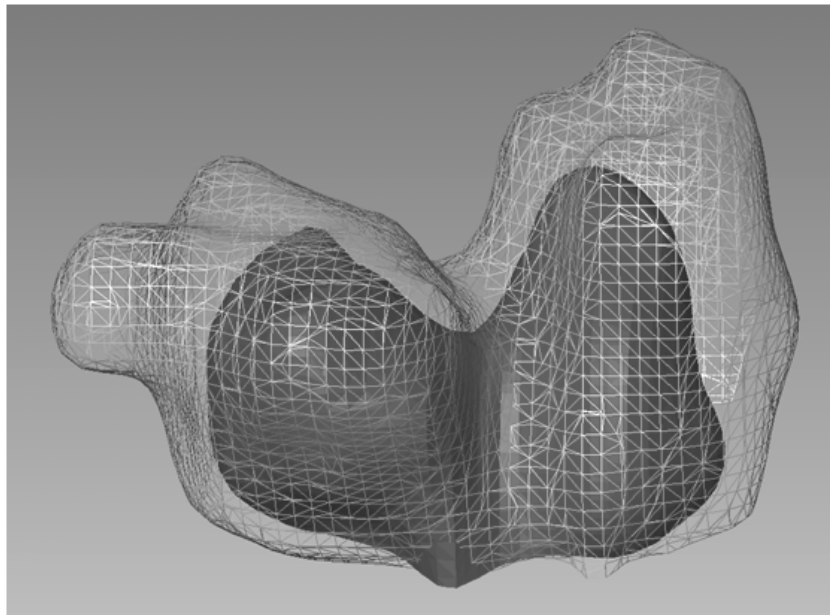


Abb. 12: Dreidimensionale OCT Rekonstruktion einer ungeschädigten Alveole bei den Beatmungsdrücken 0 (dunkle Struktur) und 24 mmHg (Gitternetzstruktur).

Um auszuschließen, dass aufgrund der chirurgischen Präparation und/oder der mechanischen Ventilation in diesen Lungenpräparationen bereits ein Schaden induziert worden war bzw. sich über den Beobachtungsverlauf entwickelte, wurden neben der Alveolardynamik auch der arterielle Blutdruck, der paO_2 und am Ende des Experiments die Neutrophilenkonzentration im Gewebe als Marker der Entzündungsreaktion sowie die Feucht/Trocken-Gewicht (Ödembildung) gemessen. Sowohl arterieller Blutdruck als auch paO_2 blieben über den gesamten Versuchsverlauf nahezu stabil. Neutrophilenkonzentration und das Feucht/Trocken-Gewicht zeigten keine Anzeichen eines Lungenschadens in den gesunden Lungenpräparationen im Vergleich zu unbehandelten Kontrolllungen⁶⁹.

2.3.3 Alveolarmorphologie in der aspirationsgeschädigten Lunge

Die Auswirkungen einer Lungenschädigung auf die Alveolardynamik sind bislang weitestgehend unklar. Gerade Einblicke in die Veränderungen auf Alveolarebene sind jedoch wichtig, um zu verstehen, warum viele vorgeschädigte Lungen einen nachgelagerten VALI oder ARDS entwickeln.

Aspirationsgeschädigte Lungen zeigen eine zeitabhängige Verschlechterung der alveolären Dehnbarkeit über den Versuchsverlauf von zwei Stunden als Ausdruck einer Abnahme der alveolären Compliance.

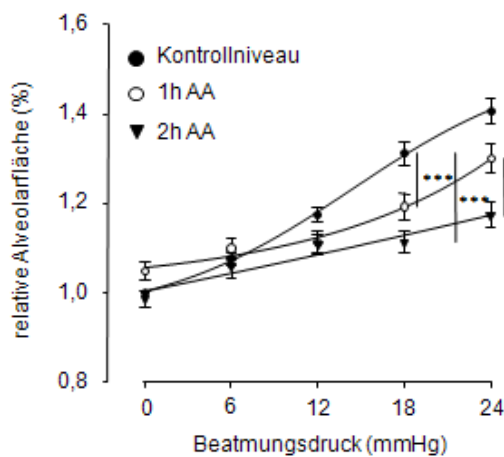


Abb. 13: Daten zeigen die alveoläre Druck/Flächen-Beziehung vor Beginn der Schädigung, eine und zwei Stunden nach Induktion des Aspirationschadens (AA). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM von 125 analysierten Alveolen in n=6 Mäusen; **p<0,01, ***p<0,001. Die Flächen/Druck-Beziehung wurde durch eine nicht-lineare Regression beschrieben ($r^2 = 0,998$).

Um sicherzugehen, dass die aspirationsgeschädigte Lunge einen homogenen Lungenschaden aufweist, so dass die beobachteten Veränderungen in den subpleuralen Alveolen als repräsentativ für die Gesamtlungen angesehen werden können, wurde in Zusammenarbeit mit dem Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg eine Flachsicht-Computertomographie (vCT) des Mausmodells durchgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine homogene Schädigung vorliegt und sowohl abhängige als auch nicht-abhängige Lungenabschnitte vom Lungenschaden betroffen waren.

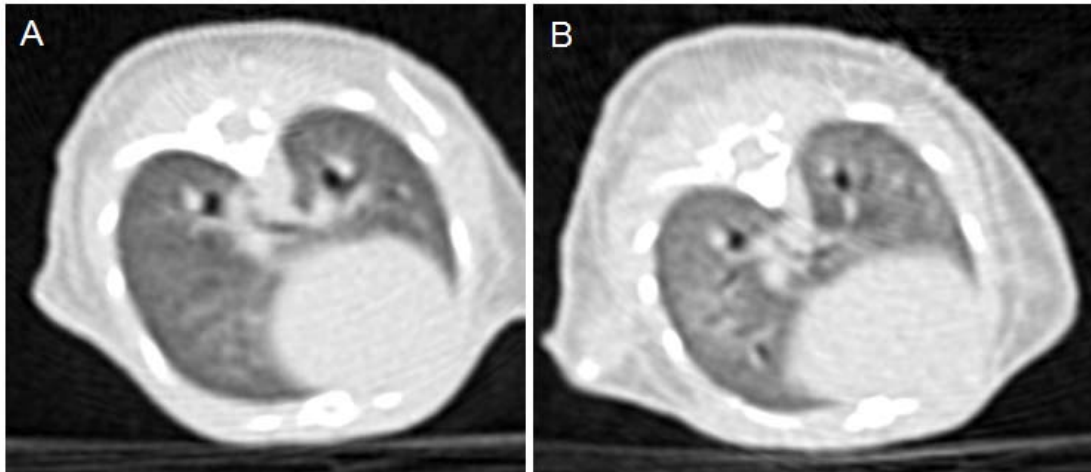


Abb. 14: Lungendichte Messung in der Maus mittels Flachsicht-Computertomographie vor (A) und zwei Stunden (B) nach Aspirationsschaden. Repräsentative Abbildungen von n=3 Experimenten zeigen eine beatmete Mauslunge vor der Schädigung (A) und eine gleichförmige Dichtezunahme zwei Stunden nach Aspirationsschaden ohne nachweisbare Atelektasen Formation (B).

Trotz der homogenen Schädigung des Lungengewebes im vCT-Bild ließen sich in der Intravitalmikroskopie Alveolarpopulationen unterscheiden, die in unterschiedlichem Maße vom Lungenschaden betroffen waren. So zeigten kleine Alveolen und Alveolen mit der initial größten Distensibilität die stärksten Abnahmen der Dehnbarkeit nach Induktion des Lungenschadens.

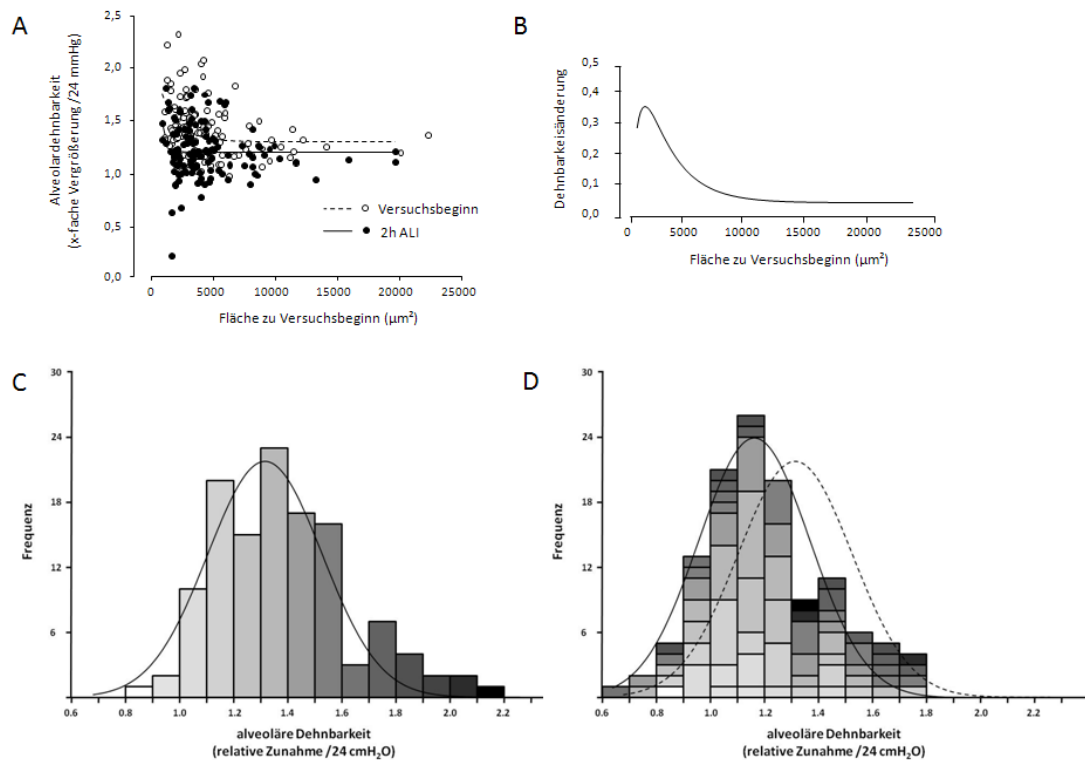


Abb. 15: (A) Zwei Stunden nach Induktion des Aspirationschadens war die alveoläre Dehnbarkeit über alle Alveolargrößen, im Vergleich zu den ungeschädigten Alveolen (weiße Kreise), reduziert (schwarze Kreise). Eine Subtraktion der berechneten Regressionslinien zeigt, dass die alveoläre Dehnbarkeit die größte Reduktion in den kleinen Alveolen aufweist (B). Die Häufigkeitsverteilung der alveolären Dehnbarkeit vor (C) und nach Schädigung (D) folgte einer Gauß'schen Verteilungskurve ($p < 0,05$). Jede einzelne Alveole ist farbcodiert bzgl. ihrer Kontrollniveau-Dehnbarkeit (C), um Dehnbarkeitsveränderungen nach der Lungenschädigung zu visualisieren (D). Die Reduktion der alveolären Dehnbarkeit in aspirationsgeschädigten Lungen (D) zeigt sich durch eine Linksverschiebung der Gauß'schen Verteilungskurve (durchgezogene Linie = 2 Stunden Aspirationschaden, gestrichelte Linie = vor Lungenschädigung). Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM von 125 analysierten Alveolen in $n=6$ Mäusen.

Wie bereits in ungeschädigten Lungen konnte auch nach Induktion des Säureaspirationsschadens keine alveoläre Rekrutierung bzw. Derekrutierung über den applizierten Druckbereich beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Experimente deuten darauf hin, dass intakte Alveolen bei erhöhten Tidalvolumina bzw. Spitzendrücken überdehnt werden, während es zu keiner Rekrutierung kommt. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass

Beatmung mit hohen Spitzendrücken, wie von vielen Gruppen postuliert^{46;70}, in einem solchen Lungenschaden die wenigen funktionell nicht beeinträchtigten Alveolen weiter schädigt und den Lungenschaden verstärkt.

Weitere Details bzgl. Alveolardynamik in gesunden und aspirationsgeschädigten Lungen werden in der Publikation „Alveolar dynamics in acute lung injury: heterogeneous distension rather than cyclic opening and collapse“ (Mertens M, Tabuchi A, Meissner S, Krueger A, Schirrmann K, Kertzsch U, Pries AR, Slutsky AS, Koch E, Kuebler WM; *Crit Care Med* 2009) beschrieben.

2.4 Bedeutung von TRPV4 im beatmungsinduzierten Lungenschaden

2.4.1 Mechanismen des beatmungsinduzierten Lungenschadens

Im VALI/VILI wird die Lunge durch hohe Tidalvolumina bzw. hohe applizierte Spitzendrücke geschädigt; allerdings ist bislang weitgehend unbekannt, wie diese mechanischen Kräfte zu einer Gewebeschädigung führen. Einige Theorien besagen, dass die Scherkräfte das Gewebe förmlich zerreißen⁷¹, andere gehen davon aus, dass leichte Schäden am Gewebe über schadensassoziierte Membranproteine (damage associated molecular pattern, DAMPs) eine Inflammationskaskade mittels TLR4 in Gang setzen^{72;73}. Es wurde auch vermutet, dass das Lungenepithel über Ionenkanäle verfügt, welche mechanische Kräfte im Alveolarraum messen können und z.B. die Freisetzung des Surfactant steuern⁷⁴. Vor kurzem konnte TRPV4 als mechanosensitiver Ionenkanal in der Lunge identifiziert werden, welcher bei hohen transpulmonalen Drücken aktiviert wird²⁹.

2.4.1.1 Rolle von TRPV4 in der Mechanotransduktion bei VILI

In unserem Modell des beatmungsinduzierten Lungenschadens an der Maus testeten wir die Rolle von TRPV4, indem C57/Bl6J Wildtyp-Mäuse und

TRPV4-defiziente Mäuse (TRPV4^{-/-}) mit niedrigen Tidalvolumina (10 ml/kg, PEEP 2 mmHg) und hohen Tidalvolumina (20 ml/kg, PEEP 2 mmHg) beatmet wurden. Während die Wildtyp-Mäuse bei hohem V_T nach 2 Stunden ein ausgeprägtes Lungenödem mit Hypoxie und Entzündungsreaktion aufwiesen, zeigten TRPV4^{-/-} Mäuse keine Anzeichen von Hypoxie oder eines Lungenödems bei hohem V_T. Es konnten keine Unterschiede bzgl. der Neutrophilenakkumulation zwischen Wildtyp und TRPV4 k.o. Tieren beobachtet werden. Dies ist ein sehr interessanter Befund, da er in den TRPV4^{-/-} Mäusen auf eine Dissoziation von Entzündungsreaktion und Ödembildung hinweist, die bislang pathophysiologisch als eng miteinander zusammenhängend angesehen wurden^{75;76}.

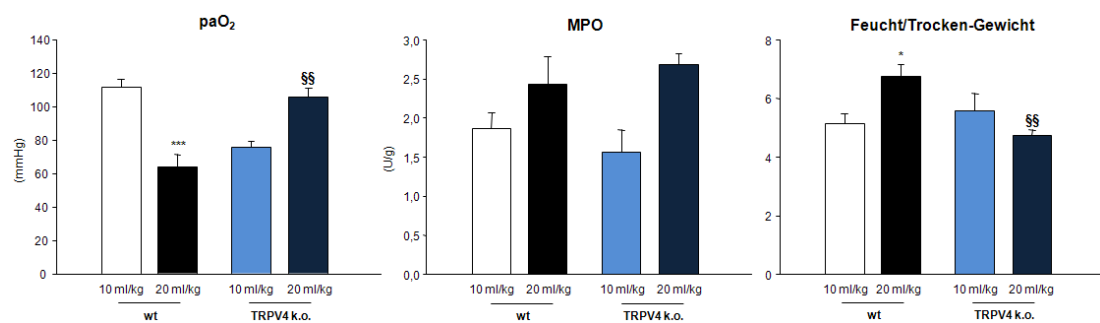


Abb. 16: Sauerstoffpartialdruck, Neutrophilenakkumulation und Lungenödem in Wildtyp (wt) und TRPV4 k.o. Mäusen bei niedrigem (10 ml/kg bw) und hohem (20 ml/kg bw) V_T. C57/Bl6J Wildtyp Mäuse zeigen bei hohem V_T stark erniedrigte paO₂, erhöhtes Feucht/Trocken-Gewicht und Myeloperoxidaseaktivität. TRPV4 k.o. zeigen bei niedrigem V_T einen stark reduzierten paO₂, jedoch keine Unterschiede bzgl. Feucht/Trocken-Gewicht und Myeloperoxidaseaktivität im Vergleich zu den Wildtyp Tieren. Bei hohem V_T ist der paO₂, Feucht/Trocken-Gewicht und Myeloperoxidaseaktivität auf dem gleichen Level wie C57/Bl6J Tieren, beatmet mit niedrigem V_T, angesiedelt. Daten dargestellt als Mittelwert±SEM von jeweils n=5 Mäusen; *p<0,05, ***p<0,001 20 ml/kg bw wt vs. 10 ml/kg bw wt; §§p<0,05 20 ml/kg bw TRPV4^{-/-} vs. 10 ml/kg bw TRPV4^{-/-}.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass dem Mechanosensor TRPV4 eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese des akuten Lungenschadens zukommt. Unter Berücksichtigung der derzeit in klinischer Entwicklung

befindlichen TRPV4-Hemmer ist dies ein interessanter neuer Ansatz. Jedoch sind die zugrundeliegenden protektiven Mechanismen nach wie vor ungeklärt.

Weitere Untersuchungen bieten die Möglichkeit neuer pathophysiologischer Einblicke bei der bisher unbekanntenen Dissoziation zwischen Entzündung und Ödem und bzgl. des erniedrigten paO_2 bei den TRPV4 defizienten Tieren beatmet mit niedrigen V_T . Diese Befunde werden entscheidend zum Verständnis des beatmungsinduzierten Lungenschadens und der Rolle des mechanosensitiven Kanals TRPV4 beitragen.

2.5 Pharmakologische Intervention

Bisher sind alle pharmakologischen Interventionen zur Therapie des ALI/ARDS in klinischen Studien gescheitert³⁵. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die Therapien zu einem Zeitpunkt starteten, zu dem das Lungengewebe bereits irreversibel geschädigt war, dass die Therapien zu große Nebenwirkungen aufwiesen oder die Targets in den verschiedenen Formen und Ätiologien des ALI/ARDS nicht in gleichem Maße relevant waren.

2.5.1 Effekt des Phosphodiesterase-III-Inhibitors Milrinon im akuten Lungenschaden

Phosphodiesterase-Hemmer wurden bereits als mögliche Therapeutika im ALI postuliert⁷⁷. Um potentielle Nebenwirkungen aufgrund systemischer vasodilatatorischer Effekte zu minimieren, wurde in dem von uns gewählten Ansatz der PDE3-Inhibitor Milrinon nicht systemisch appliziert, sondern vernebelt, um eine pulmonale Selektivität zu erzielen. Die Effekte wurden in zwei Lungenschadensmodellen untersucht, im Säureaspirationsmodell an der Maus und im Ölsäure-induzierten Lungenschadensmodell an der Ratte. Im Rattenmodell wurde Milrinon sowohl einmalig als auch mehrmals

vernebelt, um zusätzlich die Effekte einer wiederholten Inhalation dokumentieren zu können.

2.5.1.1 Milrinon bei Säureaspirationsschaden

Eine Milrinon-Vernebelung führte zu einer deutlichen Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks im Säureaspirationsschaden bei BalbC-Mäusen. Des Weiteren kam es zu einer Reduktion der Neutrophilenkonzentration und des Feucht/Trocken-Gewichts als Anzeichen eines verminderten Lungenschadens im Vergleich zur Kontrollgruppe.

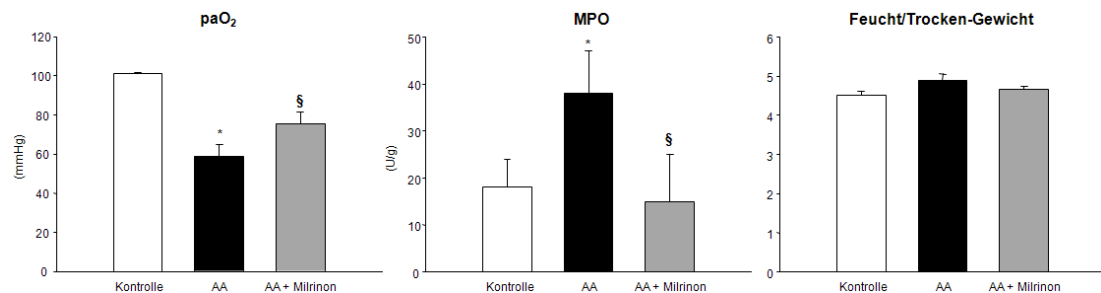


Abb. 17: Sauerstoffpartialdruck, Lungenödem und Neutrophilenakkumulation in BalbC Kontrolltieren, mit Aspirationschaden (AA) und Aspirationschaden mit einmaliger Vernebelung von Milrinon. Daten dargestellt als Mittelwert±SEM von jeweils n=6 Mäusen; *p<0,05 OA vs. Kontrolle; §p<0,05 OA + Milrinon vs. OA.

2.5.1.2 Milrinon bei OA-induziertem Lungenschaden

Eine einmalige Vernebelung von Milrinon verminderte die Hypoxämie, verringerte das Lungenödem und die Inflammationsreaktion im OA-induzierten Lungenschaden an der Ratte. Der protektive Effekt der einmaligen Vernebelung konnte durch repetitive Vernebelung sogar noch verstärkt werden. Auswirkungen auf die systemische Hämodynamik durch Inhalation von vernebeltem Milrinon waren nicht nachweisbar.

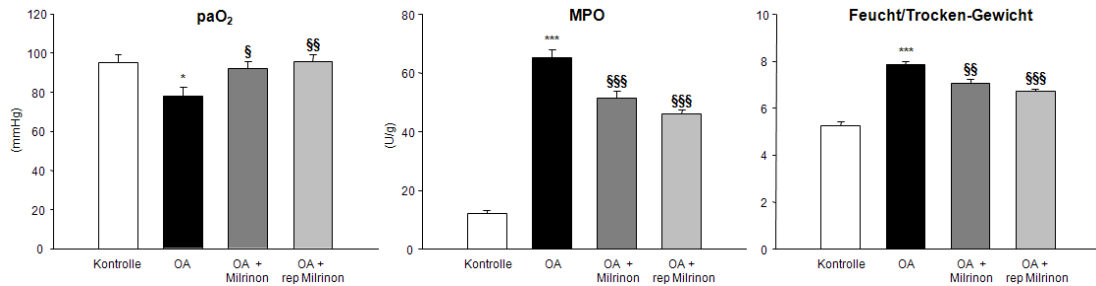


Abb. 18: Sauerstoffpartialdruck, Neutrophilenakkumulation und Lungenödem in Sprague Dawley Ratten. Kontrollgruppe, Ölsäureschaden Gruppe (OA), OA Gruppe mit einfacher Milrinon Vernebelung und OA Gruppe mit wiederholter Milrinon Vernebelung vier Stunden nach Versuchsbeginn. Daten dargestellt als Mittelwert±SEM von jeweils n=10 Ratten; *p<0,05, ***p<0,001 OA vs. Kontrolle; §p<0,05, §§p<0,01, §§§p<0,001 OA + Milrinon bzw. OA + rep. Milrinon vs. OA.

2.5.1.3 Vernebeltes Milrinon als therapeutische Strategie bei ALI/ARDS

Wir konnten in zwei unterschiedlichen Lungenschadensmodellen, die einerseits einen primär epithelialen (Säureaspiration) und andererseits einen primär endothelialen (Ölsäure-Infusion) Schadensmechanismus simulieren, den therapeutischen Effekt von vernebeltem Milrinon nachweisen⁷⁸. Unter Berücksichtigung des bereits etablierten klinischen Einsatzes von PDE3 Inhibitoren bei Herzinsuffizienz bzw. kardiopulmonalem Bypass^{79;80} könnte vernebeltes Milrinon eine vielversprechende, pulmonal-selektive und rasch klinisch zu implementierende Therapie zur Behandlung des ALI bzw. ARDS darstellen, die die typischen hämodynamischen Nebenwirkungen einer systemischen Gabe effektiv vermeidet.

Weiterführende Informationen sind der Publikation „Inhaled milrinone attenuates experimental acute lung injury“ (Buelmann M, Kong X, Mertens M, Yin N, Yin J, Liu Z, Koster A, Kuppe H, Kuebler WM; *Intensive Care Med* 2008) zu entnehmen.

2.5.2 Effekt des Peptidhormons Ang(1-7) im akuten Lungenschaden

Arbeiten der Arbeitsgruppe Penninger legen eine Rolle des Renin-Angiotensin Systems in der Pathophysiologie des akuten Lungenschadens nahe⁴². Penninger zeigte, dass ACE2 defiziente Tiere einen stärkeren Lungenschaden aufweisen und dass die Lungenschädigung durch rekombinantes ACE2 abgeschwächt werden kann. Da ACE^{-/-} oder Angiotensin II Typ 1a Rezeptor (AT_{1a}) defiziente Tiere ebenfalls eine verminderte Lungenschädigung aufwiesen, wurde eine eminente Rolle des AT_{1a}-Rezeptor in der Pathogenese des ALI postuliert. Die Resultate der Arbeitsgruppe Penninger lassen allerdings auch eine alternative Interpretation zu: Angiotensin II wird von ACE2 zu Angiotensin(1-7) abgebaut, einem Agonisten des Mas-Rezeptors⁸¹, dem bereits ein kardioprotektiver Effekt nachgewiesen werden konnte⁸². Um eine mögliche protektive Rolle von Ang(1-7) im akuten Lungenschaden nachzuweisen, wurde der Effekt einer therapeutischen Ang(1-7) Gabe in zwei verschiedenen Modellen des akuten Lungenschadens getestet.

2.5.2.1 Ang(1-7) im Beatmungsinduzierten Lungenschaden

Kontinuierliche intravenöse Gabe von Ang(1-7) im beatmungsinduzierten Lungenschaden an der Maus führt zu einer Rekonstitution des paO₂, verringert das Lungenödem und die Inflammationsreaktion auf Kontrollniveau.

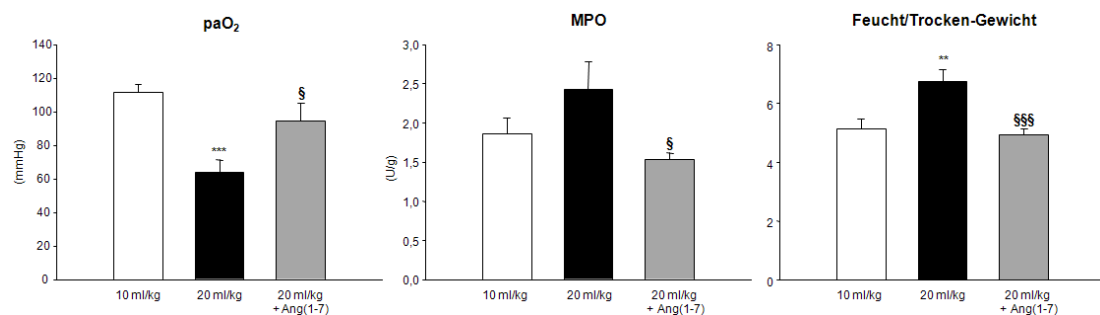


Abb. 19: Sauerstoffpartialdruck, Neutrophilenakkumulation und Lungenödem in C57/Bl6J Mäusen. Kontrollgruppe, VILI Gruppe und VILI Gruppe mit intravenöser Ang(1-7) Gabe zwei Stunden nach Versuchsbeginn. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM von jeweils n=8 Mäusen; **p<0,01, ***p<0,001 20 ml/kg bw vs. 10 ml/kg bw; §p<0,05, §§§p<0,001 20 ml/kg bw + Ang(1-7) vs. 20 ml/kg bw.

2.5.2.2 Ang(1-7) im OA Lungenschaden

Im Ölsäure Schadensmodell in der Ratte führt intravenöse Ang(1-7) Gabe zu einer Reduktion des Lungenödems und die Neutrophilenakkumulation reduziert sich auf Kontrollniveau.

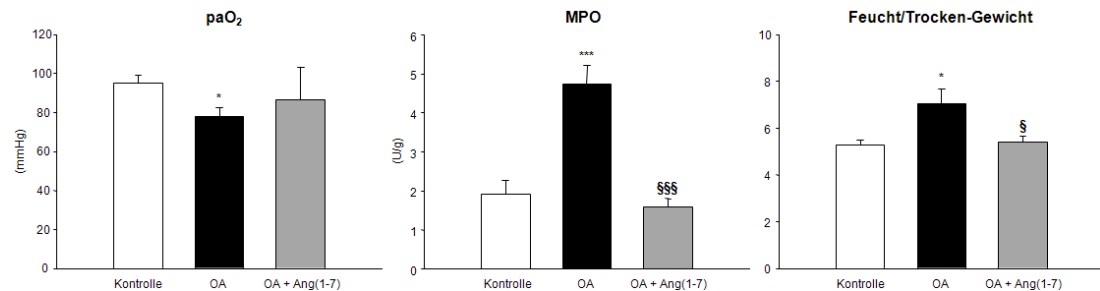


Abb. 20: Sauerstoffpartialdruck, Neutrophilenakkumulation und Lungenödem in Sprague Dawley Ratten. Kontrollgruppe, OA Gruppe und OA Gruppe mit intravenöser Ang(1-7) Gabe vier Stunden nach Versuchsbeginn. Daten dargestellt als Mittelwert \pm SEM von jeweils n=8 Ratten; *p<0,05, ***p<0,001 OA vs. Kontrolle; §p<0,05, §§§p<0,001 OA + Ang(1-7) vs. OA.

2.5.2.3 Intravenöse Gabe von Ang(1-7) als pharmakologische Intervention in zwei Lungenschadensmodellen

Ang(1-7) Gabe zeigte sowohl im VILI Maus Modell als auch im endothelialen Ölsäure Lungenschadensmodell der Ratte einen protektiven Effekt, indem es zu keinerlei Ödembildung bzw. Neutrophilenakkumulation in der Lunge kam. Hiermit wurde zum ersten Mal belegt, dass nicht nur die Reduktion von Angiotensin II durch ACE2 Überexpression einen protektiven Effekt im Lungenschaden hat, sondern auch, dass Ang(1-7), das Abbauprodukt von Angiotensin II durch ACE2, protektiv wirkt (s. Abb. 4). Dieses Ergebnis

eröffnet eine womöglich universelle, neuartige, pharmakologische Interventionsmöglichkeit im akuten Lungenschaden.

3 Zusammenfassung

3.1 Deutsche Zusammenfassung

Der akute Lungenschaden und seine schwerste Ausprägung, das akute progressive Lungenversagen, sind lebensbedrohliche Erkrankungen mit über 190.000 Patienten und 74.500 Toten pro Jahr in den Vereinigten Staaten. Bis heute gibt es, abgesehen von einer Beatmung mit niedrigen Tidalvolumina, keinerlei Therapiemöglichkeiten, welche die Morbidität oder Mortalität senken. Dies ist u.a. darauf zurückzuführen, dass Ursachen und Mechanismen des beatmungsinduzierten Lungenschadens auf Ebene der Alveolen und Alveolarkapillaren weitestgehend unbekannt sind. Pharmakologische Behandlungsstrategien werden darüberhinaus durch die Heterogenität und multiplen Co-Morbiditäten des Patientenkollektivs sowie die teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen systemischer Therapieansätze behindert.

In dieser Arbeit wurde erstmals die Alveolardynamik der gesunden und geschädigten Lunge am lebenden Tier bei geschlossenem Thorax dargestellt. Es konnte gezeigt werden, dass es bei Inspiration zu einer druckabhängigen Aufweitung der Alveolarstrukturen kommt, wohingegen zyklische Rekrutierungs-/Derekrutierungsphänomene der Alveolen weder in der gesunden noch in der geschädigten Lunge stattfinden. Dieser Befund legt nahe, dass Beatmung mit hohen Spitzendrücken oder hohen Tidalvolumina zu einer Überdehnung des Lungenparenchyms führt und somit eine präexistierende Lungenschädigung weiter verstärkt.

Weiterhin wurde der Kationenkanal TRPV4 als neuer Mechanosensor an der Alveolarmembran identifiziert und seine essentielle Rolle in der Pathogenese des beatmungsinduzierten Lungenschadens aufgezeigt. Der protektive Effekt auf den Barrierschaden bei Fehlen des TRPV4 Kanals erfolgt trotz fortbestehender Entzündungsreaktion, ein bisher in der Literatur unbekannter Prozess.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Vernebelung des Phosphodiesterase-III Inhibitors Milrinon zu einer signifikanten Verminderung des Lungenschadens in verschiedenen Lungenschadensmodellen führte und die systemischen Nebenwirkungen einer intravenösen Gabe von Milrinon verhindert werden konnten.

Mit dem Heptapeptid Angiotensin-(1-7) konnten wir ein neuartiges therapeutisches Agens identifizieren, welches über einen bisher nicht abschließend geklärten Signalweg zu einer Verminderung von Lungenschädigungen unterschiedlicher Genese führte.

Die erzielten Ergebnisse gewähren neue wesentliche Einblicke in die Pathophysiologie des beatmungsinduzierten Lungenschadens und zeigen neue Behandlungsansätze in Form protektiver Beatmungsstrategien und neuer pharmakologischer Interventionen auf. Es ist zu erwarten, dass dieses tiefere Verständnis des schweren Lungenversagens wesentlich zu einer verbesserten Behandlung und zur Entwicklung neuer Therapiestrategien in der klinischen Versorgung beiträgt.

3.2 English Summary

Acute lung injury and its pronounced form, acute respiratory distress syndrome, are life-threatening diseases with 190,000 patients and 74,500 deaths per year in the United States. Until now there have been no therapeutic approaches to lower morbidity and mortality, except for ventilation with small tidal volumes. This partially results from a lack of understanding of the underlying mechanism of ventilator induced acute lung injury on the alveolar and alveolar capillary level. In addition, pharmacological approaches to treat acute lung injury are hampered by multiple co-morbidities of the patient population and severe adverse systemic effects.

This thesis describes the alveolar dynamics in healthy and injured lungs in an *in vivo* mouse model with closed thorax. Upon inspiration, a pressure-dependent distension of alveolar structures was observed, whereas cyclic

recruitment-/derecruitment phenomena were present neither in healthy nor in injured lungs. This finding indicates that ventilation with high pressures of high tidal volumes would lead to overdistension of the lung parenchyma and would pronounce a pre-existing lung injury.

Furthermore, we identified the cation channel TRPV4 as a new mechanosensor of the alveolar membrane and its essential role in the pathogenesis of ventilator induced lung injury. The protective effect on barrier integrity in TRPV4-deficient animals was independent of persisting inflammatory responses, an effect that had never been described in the literature.

Nebulized phosphodiesterase-III inhibitor milrinone significantly decreased lung injury in different lung injury models. The systemic adverse effects of intravenous administration were abolished by this nebulization approach.

The heptapeptide angiotensin(1-7) was identified as a new therapeutic agent. It leads to a significant reduction of acute lung injury in a so far not completely understood signal transduction pathway.

The outcomes of this thesis allow considerable new insights into the pathophysiology of ventilator-induced lung injury and reveals new therapeutic approaches in form of protective ventilatory strategies and pharmacological interventions. This will likely lead to a significantly better understanding of the underlying mechanism of severe acute lung injury and to the development of new therapeutic strategies in clinical care.

4 Literaturverzeichnis

Reference List

1. Ashbaugh, D. G., D. B. Bigelow, T. L. Petty, and B. E. Levine. 1967. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2:319-323.
2. Bernard, G. R., A. Artigas, K. L. Brigham, J. Carlet, K. Falke, L. Hudson, M. Lamy, J. R. Legall, A. Morris, and R. Spragg. 1994. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 149:818-824.
3. 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.
4. Matthay, M. A. and G. A. Zimmerman. 2005. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 33:319-327.
5. Bellingan, G. J. 2002. The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax* 57:540-546.
6. Montgomery, A. B., M. A. Stager, C. J. Carrico, and L. D. Hudson. 1985. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am.Rev.Respir.Dis.* 132:485-489.
7. Bell, R. C., J. J. Coalson, J. D. Smith, and W. G. Johanson, Jr. 1983. Multiple organ system failure and infection in adult respiratory distress syndrome. *Ann.Intern.Med.* 99:293-298.
8. Dos Santos, C. C. 2008. Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury. *Intensive Care Med.* 34:619-630.
9. Tomashefski, J. F., Jr. 1990. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clin.Chest Med.* 11:593-619.
10. Hudson, L. D., J. A. Milberg, D. Anardi, and R. J. Maunder. 1995. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 151:293-301.
11. Gao, L. and K. C. Barnes. 2009. Recent Advances in Genetic Predisposition to Clinical Acute Lung Injury. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.*

12. Nieuwenhuizen, L., P. G. de Groot, J. C. Grutters, and D. H. Biesma. 2009. A review of Pulmonary Coagulopathy in Acute Lung Injury, Acute Respiratory Distress Syndrome and Pneumonia. *Eur.J.Haematol.*
13. Kim, K. K., Y. Wei, C. Szekeres, M. C. Kugler, P. J. Wolters, M. L. Hill, J. A. Frank, A. N. Brumwell, S. E. Wheeler, J. A. Kreidberg, et al. 2009. Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J.Clin.Invest* 119:213-224.
14. Frank, J. A. and M. A. Matthay. 2003. Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit Care* 7:233-241.
15. Dreyfuss, D. and G. Saumon. 1998. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157:294-323.
16. 1999. 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.* 160:2118-2124.
17. Slutsky, A. S. 1999. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 116:9S-15S.
18. Tremblay, L., F. Valenza, S. P. Ribeiro, J. Li, and A. S. Slutsky. 1997. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J.Clin.Invest* 99:944-952.
19. Uhlig, S. 2002. Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far? *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 282:L892-L896.
20. Ranieri, V. M., P. M. Suter, C. Tortorella, T. R. De, 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.
21. Dreyfuss, D., P. Soler, G. Basset, and G. Saumon. 1988. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am.Rev.Respir.Dis.* 137:1159-1164.
22. von Bethmann, A. N., F. Brasch, R. Nusing, K. Vogt, H. D. Volk, K. M. Muller, A. Wendel, and S. Uhlig. 1998. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157:263-272.

23. Yiming, M. T., K. Parthasarathi, A. C. Issekutz, and S. Bhattacharya. 2005. Sequence of endothelial signaling during lung expansion. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 33:549-554.
24. Haitzma, J. J., S. Uhlig, R. Goggel, S. J. Verbrugge, U. Lachmann, and B. Lachmann. 2000. Ventilator-induced lung injury leads to loss of alveolar and systemic compartmentalization of tumor necrosis factor-alpha. *Intensive Care Med.* 26:1515-1522.
25. Meduri, G. U., S. Headley, G. Kohler, F. Stentz, E. Tolley, R. Umberger, and K. Leeper. 1995. 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* 107:1062-1073.
26. Goodman, R. B., R. M. Strieter, D. P. Martin, K. P. Steinberg, J. A. Milberg, R. J. Maunder, S. L. Kunkel, A. Walz, L. D. Hudson, and T. R. Martin. 1996. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 154:602-611.
27. Held, H. D., S. Boettcher, L. Hamann, and S. Uhlig. 2001. 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.* 163:711-716.
28. Parker, J. C. and C. L. Ivey. 1997. Isoproterenol attenuates high vascular pressure-induced permeability increases in isolated rat lungs. *J.Appl.Physiol* 83:1962-1967.
29. 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. 2007. TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 293:L923-L932.
30. Anzueto, A., R. P. Baughman, K. K. Guntupalli, J. G. Weg, H. P. Wiedemann, A. A. Raventos, F. Lemaire, W. Long, D. S. Zaccardelli, and E. N. Pattishall. 1996. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N.Engl.J.Med.* 334:1417-1421.
31. Dellinger, R. P., J. L. Zimmerman, R. W. Taylor, R. C. Straube, D. L. Hauser, G. J. Criner, K. Davis, Jr., T. M. Hyers, and P. Papadakos. 1998. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: results of a randomized phase II trial. Inhaled Nitric Oxide in ARDS Study Group. *Crit Care Med.* 26:15-23.
32. Bone, R. C., G. Slotman, R. Maunder, H. Silverman, T. M. Hyers, M. D. Kerstein, and J. J. Ursprung. 1989. Randomized double-blind, multicenter

study of prostaglandin E1 in patients with the adult respiratory distress syndrome. Prostaglandin E1 Study Group. *Chest* 96:114-119.

33. 2000. Ketoconazole for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. The ARDS Network. *JAMA* 283:1995-2002.

34. Steinberg, K. P., L. D. Hudson, R. B. Goodman, C. L. Hough, P. N. Lanken, R. Hyzy, B. T. Thompson, and M. Ancukiewicz. 2006. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 354:1671-1684.

35. Ware, L. B. and M. A. Matthay. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 342:1334-1349.

36. Cronin, L., D. J. Cook, J. Carlet, D. K. Heyland, D. King, M. A. Lansang, and C. J. Fisher, Jr. 1995. Corticosteroid treatment for sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med.* 23:1430-1439.

37. Derian, C. K., R. J. Santulli, P. E. Rao, H. F. Solomon, and J. A. Barrett. 1995. Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators. *J.Immunol.* 154:308-317.

38. Elferink, J. G. and B. M. de Koster. 2000. Inhibition of interleukin-8-activated human neutrophil chemotaxis by thapsigargin in a calcium- and cyclic AMP-dependent way. *Biochem.Pharmacol.* 59:369-375.

39. Moore, T. M., P. M. Chetham, J. J. Kelly, and T. Stevens. 1998. Signal transduction and regulation of lung endothelial cell permeability. Interaction between calcium and cAMP. *Am.J.Physiol* 275:L203-L222.

40. Matthay, M. A., C. Clerici, and G. Saumon. 2002. Invited review: Active fluid clearance from the distal air spaces of the lung. *J.Appl.Physiol* 93:1533-1541.

41. Dhanakoti, S. N., Y. Gao, M. Q. Nguyen, and J. U. Raj. 2000. Involvement of cGMP-dependent protein kinase in the relaxation of ovine pulmonary arteries to cGMP and cAMP. *J.Appl.Physiol* 88:1637-1642.

42. Imai, Y., K. Kuba, and J. M. Penninger. 2007. Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Cell Mol.Life Sci.* 64:2006-2012.

43. Imai, Y., K. Kuba, S. Rao, Y. Huan, F. Guo, B. Guan, P. Yang, R. Sarao, T. Wada, H. Leong-Poi, et al. 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436:112-116.

44. Li, X., H. Rayford, and B. D. Uhal. 2003. Essential roles for angiotensin receptor AT1a in bleomycin-induced apoptosis and lung fibrosis in mice. *Am.J.Pathol.* 163:2523-2530.

45. 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.
46. Foti, G., M. Cereda, M. E. Sparacino, M. L. De, F. Villa, and A. Pesenti. 2000. Effects of periodic lung recruitment maneuvers on gas exchange and respiratory mechanics in mechanically ventilated acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients. *Intensive Care Med.* 26:501-507.
47. Mercat, A., J. C. Richard, B. Vielle, S. Jaber, D. Osman, J. L. Diehl, J. Y. Lefrant, G. Prat, J. Richecoeur, A. Nieszkowska, et al. 2008. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 299:646-655.
48. 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, et al. 1998. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 338:347-354.
49. Pepe, P. E., L. D. Hudson, and C. J. Carrico. 1984. Early application of positive end-expiratory pressure in patients at risk for the adult respiratory-distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 311:281-286.
50. Brower, R. G., A. Morris, N. MacIntyre, M. A. Matthay, D. Hayden, T. Thompson, T. Clemmer, P. N. Lanken, and D. Schoenfeld. 2003. Effects of recruitment maneuvers in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome ventilated with high positive end-expiratory pressure. *Crit Care Med.* 31:2592-2597.
51. Carney, D. E., C. E. Bredenberg, H. J. Schiller, A. L. Picone, U. G. McCann, L. A. Gatto, G. Bailey, M. Fillinger, and G. F. Nieman. 1999. The Mechanism of Lung Volume Change during Mechanical Ventilation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 160:1697-1702.
52. Carney, D., J. DiRocco, and G. Nieman. 2005. Dynamic alveolar mechanics and ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med.* 33:S122-S128.
53. DiRocco, J. D., L. A. Pavone, D. E. Carney, C. J. Lutz, L. A. Gatto, S. K. Landas, and G. F. Nieman. 2006. Dynamic alveolar mechanics in four models of lung injury. *Intensive Care Med.* 32:140-148.
54. Groh, J., G. E. Kuhnle, L. Ney, A. Sckell, and A. E. Goetz. 1995. Effects of isoflurane on regional pulmonary blood flow during one-lung ventilation. *Br.J.Anaesth.* 74:209-216.

55. Hillier, S. C., J. A. Graham, C. C. Hanger, P. S. Godbey, R. W. Glenny, and W. W. Wagner, Jr. 1997. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J.Appl.Physiol* 82:1084-1090.
56. Nagasaka, Y., J. Bhattacharya, S. Nanjo, M. A. Gropper, and N. C. Staub. 1984. Micropuncture measurement of lung microvascular pressure profile during hypoxia in cats. *Circ.Res.* 54:90-95.
57. Phua, J., J. R. Badia, N. K. Adhikari, J. O. Friedrich, R. A. Fowler, J. M. Singh, D. C. Scales, D. R. Stather, A. Li, A. Jones, et al. 2009. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 179:220-227.
58. Matute-Bello, G., C. W. Frevert, and T. R. Martin. 2008. Animal models of acute lung injury. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 295:L379-L399.
59. Tabuchi, A., M. Mertens, H. Kuppe, A. R. Pries, and W. M. Kuebler. 2008. Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J.Appl.Physiol* 104:338-346.
60. Kuebler, W. M., G. E. Kuhnle, J. Groh, and A. E. Goetz. 1994. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J.Appl.Physiol* 76:65-71.
61. Kuebler, W. M., K. Parthasarathi, J. Lindert, and J. Bhattacharya. 2007. Real-time lung microscopy. *J.Appl.Physiol* 102:1255-1264.
62. Imai, Y., K. Kuba, S. Rao, Y. Huan, F. Guo, B. Guan, P. Yang, R. Sarao, T. Wada, H. Leong-Poi, et al. 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436:112-116.
63. Schuster, D. P. 1994. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 149:245-260.
64. Erickson, S. E., M. G. Shlipak, G. S. Martin, A. P. Wheeler, M. Ancukiewicz, M. A. Matthay, and M. D. Eisner. 2009. Racial and ethnic disparities in mortality from acute lung injury. *Crit Care Med.* 37:1-6.
65. Barnes, K. C. 2005. Genetic determinants and ethnic disparities in sepsis-associated acute lung injury. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 2:195-201.
66. Dunnill, M. S. 1967. Effect of lung inflation on alveolar surface area in the dog. *Nature* 214:1013-1014.
67. 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.

68. Harris, R. S. 2005. Pressure-volume curves of the respiratory system. *Respir.Care* 50:78-98.
69. Tabuchi, A., M. Mertens, H. Kuppe, A. R. Pries, and W. M. Kuebler. 2008. Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J.Appl.Physiol* 104:338-346.
70. Lapinsky, S. E. and S. Mehta. 2005. Bench-to-bedside review: Recruitment and recruiting maneuvers. *Crit Care* 9:60-65.
71. Mead, J., T. Takishima, and D. Leith. 1970. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J.Appl.Physiol* 28:596-608.
72. Vaneker, M., L. A. Joosten, L. M. Heunks, D. G. Snijdelaar, F. J. Halbertsma, E. J. van, M. G. Netea, J. G. van der Hoeven, and G. J. Scheffer. 2008. Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice. *Anesthesiology* 109:465-472.
73. Mollen, K. P., R. M. Levy, J. M. Prince, R. A. Hoffman, M. J. Scott, D. J. Kaczorowski, R. Vallabhaneni, Y. Vodovotz, and T. R. Billiar. 2008. Systemic inflammation and end organ damage following trauma involves functional TLR4 signaling in both bone marrow-derived cells and parenchymal cells. *J.Leukoc.Biol.* 83:80-88.
74. Dietl, P. and T. Haller. 2005. Exocytosis of lung surfactant: from the secretory vesicle to the air-liquid interface. *Annu.Rev.Physiol* 67:595-621.
75. Abraham, E. 2003. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med.* 31:S195-S199.
76. Imanaka, H., M. Shimaoka, N. Matsuura, M. Nishimura, N. Ohta, and H. Kiyono. 2001. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth.Analg.* 92:428-436.
77. McAuley, D. F. and M. A. Matthay. 2005. Is there a role for beta-adrenoceptor agonists in the management of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome? *Treat.Respir.Med.* 4:297-307.
78. Buelmann, M., X. Kong, M. Mertens, N. Yin, J. Yin, Z. Liu, A. Koster, H. Kuppe, and W. M. Kuebler. 2009. Inhaled milrinone attenuates experimental acute lung injury. *Intensive Care Med.* 35:171-178.
79. Lamarche, Y., L. P. Perrault, S. Maltais, K. Tetreault, J. Lambert, and A. Y. Denault. 2007. Preliminary experience with inhaled milrinone in cardiac surgery. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 31:1081-1087.

-
80. Sablotzki, A., W. Starzmann, R. Scheubel, S. Grond, and E. G. Czeslick. 2005. Selective pulmonary vasodilation with inhaled aerosolized milrinone in heart transplant candidates. *Can.J.Anaesth.* 52:1076-1082.
81. Santos, R. A., Simoes e Silva AC, C. Maric, D. M. Silva, R. P. Machado, B. de, I, S. Heringer-Walther, S. V. Pinheiro, M. T. Lopes, M. Bader, et al. 2003. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:8258-8263.
82. Kostenis, E., G. Milligan, A. Christopoulos, C. F. Sanchez-Ferrer, S. Heringer-Walther, P. M. Sexton, F. Gembardt, E. Kellett, L. Martini, P. Vanderheyden, et al. 2005. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 111:1806-1813.

5 Anhang

5.1 Veröffentlichungen

5.1.1 Paper

1. **M. Mertens**, W.M. Kuebler, A.R. Pries: A two-component simulation model to teach respiratory mechanics. *Adv Phys Edu* 2007

<http://dx.doi.org/10.1152/advan.00001.2007>

2. M. Bueltmann, X. Kong, **M. Mertens**, N. Yin, J. Yin, Z. Liu, A. Koster, H. Kuppe, W.M. Kuebler: Inhaled milrinone attenuates experimental acute lung injury. *ICM* 2008

<http://dx.doi.org/10.1007/s00134-008-1344-9>

3. A. Tabuchi, **M. Mertens**, H. Kuppe, A.R. Pries, W.M. Kuebler: Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol* 2008

<http://dx.doi.org/10.1152/jappphysiol.00348.2007>

4. **M. Mertens**, A. Tabuchi, S. Meissner, A. Krueger, K. Schirrmann, U. Kertzsch, A.R. Pries, A.S. Slutsky, E. Koch, W.M. Kuebler: Alveolar dynamics in acute lung injury: heterogenous distension rather than cyclic opening and collapse. *CCM* 2009

<http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181a5544d>

5. N. Klein, **M. Mertens**, T. Walther, W.M. Kubler: The angiotensin metabolite Ang(1-7) attenuates experimental acute lung injury. *In preparation*

5.1.2 *Buchbeiträge*

A.Tabuchi, **M. Mertens**, A.R. Pries, W.M. Kuebler: Intravitalmikroskopie der pulmonalen Mikrozirkulation. 1. Dresdner Medizintechnik-Symposium Ed. Rüdiger Poll, Jens Füssel. TUDpress Dresden, ISBN 3-938863-85-4, pp. 41-46, 2006

5.1.3 *Abstracts*

1. W.M. Kuebler, **M. Mertens**, A.R. Pries: A mechanical model to teach lung compliance. Joint Meeting of the German Physiologic Society and the Federation of European Physiologic Societies, Munich, 2006 Acta Physiol. 186 (Suppl. 1): 89 (2006)
2. A. Tabuchi, **M. Mertens**, A.R. Pries, W.M. Kuebler: Intravitalmikroskopie der pulmonalen Mikrozirkulation. 1. Dresdner Medizintechnik-Symposium, Dresden, 2006. 1. Dresdner Medizintechnik-Symposium, TUDpress. (Suppl. 1):41 (2006)
3. K. Schirrmann, T. Damerow, L. Goubergrits, U. Kertzscher, **M. Mertens**, W.M. Kuebler, K. Affeld: A liquid-liquid-system as a blood model fluid in a capillary network. 3rd International Workshop of Pulmonary Functional Imaging: 56 (2006)
4. A. Tabuchi, **M. Mertens**, U. Kertzscher, A.R. Pries, W.M. Kuebler: Intravital microscopy of the pulmonary microcirculation in ventilated mice. 3rd International Workshop of Pulmonary Functional Imaging: 58 (2006)
5. **M. Mertens**, K. Schirrmann, A. Tabuchi, K. Affeld, W.M. Kuebler: Respiratory changes in lung volume of the ventilated mouse are attributable to alveolar distension rather than recruitment. 3rd International Workshop of Pulmonary Functional Imaging: 67 (2006)
6. **M. Mertens**, A. Tabuchi, A.R. Pries, W.M. Kuebler: Alveolar mechanics of lung volume change: distension rather than recruitment. ATS, San Francisco,

2007. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. Vol. 175: A34 (April 2007)

7. **M. Mertens**, A. Tabuchi, A.R. Pries, W.M. Kuebler: Lung volume changes on the subpleural level is attributable to alveolar distension rather than to recruitment. Joint Meeting of the German Physiologic Society and the Federation of European Physiological Societies, Hannover, 2007. Acta Physiol. 189 (Suppl. 653): 129 (2007)

8. **M. Mertens**, W.M. Kuebler, A.R. Radlach: A new approach to teach lung mechanics and compliance. EB, Washington D.C., 2007. FASEB J 21: A522 (2007)

9. **M. Mertens**, A. Tabuchi, W.M. Kuebler: Ventilation-dependent alveolar mechanics in murin lungs. Kinin Congress, Berlin, 2007. 2nd International Conference on "Exploring the Future of Vascular and Inflammatory Mediators":17, P41 (2007)

10. S. Meissner, **M. Mertens**, A. Krueger, A. Tabuchi, W.M. Kuebler, E. Koch: In vivo three-dimensional Fourier domain optical coherence tomography of subpleural alveoli combined with intra vital microscopy in the mouse model. Optical Society of America, St. Petersburg, FL, USA, 2008. *Accepted*

11. K. Westphal, A. Weller, **M. Mertens**, K. Stangl, V. Stangl, S. Meiners: Induction of Gluthathione Peroxidase-3 by Inhibition of the Proteasome: Human specific Protection from Oxidative Stress? IVBM, Sydney, 2008. *Accepted*

12. **M. Mertens**, A. Tabuchi, A. Krueger, E. Koch, W.M. Kuebler: Impaired alveolar mechanics in acid induced acute lung injury. ATS, Toronto, 2008. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. Vol. 177: A760 (May 2008)

13. S. Meissner, G. Mueller, L. Knels, J. Walther, M. Mehner, A. Krueger, M. Cuevas, M. Wendel, **M. Mertens**, A. Tabuchi, W.M. Kuebler, H. Morawietz, E. Koch: Innovative Anwendungen der Optischen Kohärenztomografie. AHMT, 2008.

-
14. S. Meissner, **M. Mertens**, A. Tabuchi, W.M. Kuebler: In vivo 3D imaging of lung parenchyma by Fourier Domain Optical Coherence Tomography. Eurosensor, 2008. *Accepted*
 16. **M. Mertens**, N. Klein, T. Walther, W.M. Kuebler: The angiotensin metabolite Ang-(1-7) attenuates experimental acute lung injury. ATS, San Diego, 2009. *Accepted*
 18. **M. Mertens**, A. Tabuchi, W.M. Kuebler: Preferential damage to small, distensible alveoli increases heterogeneity of lung inflation and promotes alveolar overdistension in experimental lung injury. Pulmonet, Innsbruck, 2009. *Accepted*
 19. **M. Mertens**, Wenjie Yin, Wolfgang Liedke, W.M. Kuebler: Mice deficient in the mechanosensor TRPV4 are protected from lung edema following high tidal volume ventilation. Pulmonet, Innsbruck, 2009. *Accepted*

5.2 Eigenanteil der Arbeit

M. Mertens, W.M. Kuebler, A.R. Pries: A two-component simulation model to teach respiratory mechanics. *Adv Phys Edu* 2007

Verantwortlich für die Versuchsdurchführung, Auswertung und Erstellung des Manuskripts zusammen mit W.M. Kuebler.

M. Bueltmann, X. Kong, **M. Mertens**, N. Yin, J. Yin, Z. Liu, A. Koster, H. Kuppe, W.M. Kuebler: Inhaled milrinone attenuates experimental acute lung injury. *ICM 2008*

Verantwortlich für die Tierexperimentelle Durchführung der Mausversuche, Datenauswertung, Konzeptionierung und Durchführung der Zytokinmessungen. Anteil an der Revision des Manuskripts.

A. Tabuchi, **M. Mertens**, H. Kuppe, A.R. Pries, W.M. Kuebler: Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J Appl Physiol* 2008

Messung funktioneller Lungenparameter, Anteil an der Auswertung und Erstellung des Manuskripts.

M. Mertens, A. Tabuchi, S. Meissner, A. Krueger, K. Schirrmann, U. Kertzsch, A.R. Pries, A.S. Slutsky, E. Koch, W.M. Kuebler: Alveolar dynamics in acute lung injury: heterogenous distension rather than cyclic opening and collapse. *CCM 2009*

Verantwortlich für die Durchführung der Versuche, Koordination der Kooperationspartner, Auswertung, Erstellung des Manuskripts.

N. Klein, **M. Mertens**, T. Walther, W.M. Kuebler: The angiotensin metabolite Ang(1-7) attenuates experimental acute lung injury. *In preparation*

Verantwortlich für die Tierexperimentelle Durchführung und Konzeption der Mausversuche, Datenauswertung und maßgeblicher Anteil an der Erstellung des Manuskripts.

5.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben. Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kübler, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit angefertigt wurde, vor allem für die wissenschaftliche Anleitung, sowie für die Motivation und Unterstützung in allen Phasen des Projektes.
- Herrn Prof. Dr. Carsten Niemitz, dass er sich spontan als Gutachter dieser Arbeit und Prüfer der Disputation zur Verfügung gestellt hat. Darüber hinaus für sein Interesse an meinem Promotionsthema und die Möglichkeit dieses im Rahmen von Seminaren präsentieren zu dürfen.
- Herrn Prof. Dr. Axel Pries für die freundliche Aufnahme am Institut für Physiologie.
- Sven Meißner, Dr. Alexander Krüger, Prof. Dr. Edmund Koch (TU Dresden), Dr. Michael Puderbach, Prof. Dr. Hans Ulrich Kauczor (DKFZ Heidelberg), Kerstin Schirrmann, Dr. Ulrich Kertzscher und Prof. Dr. Klaus Affeld (Labor für Biofluidmechanik, Charité-Berlin) für die gute Zusammenarbeit und erfolgreiche Kooperation.
- Herrn Prof. Dr. Wolfgang Liedke (Durham) für die freundliche Bereitstellung der TPRV4^{-/-} Mäuse.
- Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Kübler und des Instituts für Physiologie für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Unterstützung. Insbesondere Dr. Arata Tabuchi und Wenjie Lerong für experimentelle Unterstützung, sowie Nils Neye, Julia Hoffmann, Nadine Klein, Ning Yin, Renate Noske-Reimers, Beata Styp-Rekowska, Katarzyna Fiedorowicz und Isabelle Bünsch.
- Dem Graduiertenkolleg 865 für die wissenschaftliche Betreuung und Förderung, die mir vieles ermöglicht hat.
- Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung.

- Kera Westphal und Florian Freitag.
- Insbesondere meinen Eltern, welche mich immer in allen Belangen unterstützt haben, Geschwistern und Freunden für Ihre motivierende Unterstützung, besonders in schwierigen Phasen.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Berlin, den 30. April 2009

Reference List

1. Ashbaugh, D. G., D. B. Bigelow, T. L. Petty, and B. E. Levine. 1967. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2:319-323.
2. Bernard, G. R., A. Artigas, K. L. Brigham, J. Carlet, K. Falke, L. Hudson, M. Lamy, J. R. Legall, A. Morris, and R. Spragg. 1994. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 149:818-824.
3. 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.
4. Matthay, M. A. and G. A. Zimmerman. 2005. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 33:319-327.
5. Bellingan, G. J. 2002. The pulmonary physician in critical care * 6: The pathogenesis of ALI/ARDS. *Thorax* 57:540-546.
6. Montgomery, A. B., M. A. Stager, C. J. Carrico, and L. D. Hudson. 1985. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am.Rev.Respir.Dis.* 132:485-489.

7. Bell, R. C., J. J. Coalson, J. D. Smith, and W. G. Johanson, Jr. 1983. Multiple organ system failure and infection in adult respiratory distress syndrome. *Ann.Intern.Med.* 99:293-298.
8. Dos Santos, C. C. 2008. Advances in mechanisms of repair and remodelling in acute lung injury. *Intensive Care Med.* 34:619-630.
9. Tomashefski, J. F., Jr. 1990. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clin.Chest Med.* 11:593-619.
10. Hudson, L. D., J. A. Milberg, D. Anardi, and R. J. Maunder. 1995. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 151:293-301.
11. Gao, L. and K. C. Barnes. 2009. Recent Advances in Genetic Predisposition to Clinical Acute Lung Injury. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol.*
12. Nieuwenhuizen, L., P. G. de Groot, J. C. Grutters, and D. H. Biesma. 2009. A review of Pulmonary Coagulopathy in Acute Lung Injury, Acute Respiratory Distress Syndrome and Pneumonia. *Eur.J.Haematol.*
13. Kim, K. K., Y. Wei, C. Szekeres, M. C. Kugler, P. J. Wolters, M. L. Hill, J. A. Frank, A. N. Brumwell, S. E. Wheeler, J. A. Kreidberg, et al. 2009. Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J.Clin.Invest* 119:213-224.

14. Frank, J. A. and M. A. Matthay. 2003. Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit Care* 7:233-241.
15. Dreyfuss, D. and G. Saumon. 1998. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157:294-323.
16. 1999. 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.* 160:2118-2124.
17. Slutsky, A. S. 1999. Lung injury caused by mechanical ventilation. *Chest* 116:9S-15S.
18. Tremblay, L., F. Valenza, S. P. Ribeiro, J. Li, and A. S. Slutsky. 1997. Injurious ventilatory strategies increase cytokines and c-fos m-RNA expression in an isolated rat lung model. *J.Clin.Invest* 99:944-952.
19. Uhlig, S. 2002. Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far? *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 282:L892-L896.
20. Ranieri, V. M., P. M. Suter, C. Tortorella, T. R. De, 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.

21. Dreyfuss, D., P. Soler, G. Basset, and G. Saumon. 1988. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am.Rev.Respir.Dis.* 137:1159-1164.
22. von Bethmann, A. N., F. Brasch, R. Nusing, K. Vogt, H. D. Volk, K. M. Muller, A. Wendel, and S. Uhlig. 1998. Hyperventilation induces release of cytokines from perfused mouse lung. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 157:263-272.
23. Yiming, M. T., K. Parthasarathi, A. C. Issekutz, and S. Bhattacharya. 2005. Sequence of endothelial signaling during lung expansion. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 33:549-554.
24. Haitsma, J. J., S. Uhlig, R. Goggel, S. J. Verbrugge, U. Lachmann, and B. Lachmann. 2000. Ventilator-induced lung injury leads to loss of alveolar and systemic compartmentalization of tumor necrosis factor-alpha. *Intensive Care Med.* 26:1515-1522.
25. Meduri, G. U., S. Headley, G. Kohler, F. Stentz, E. Tolley, R. Umberger, and K. Leeper. 1995. 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* 107:1062-1073.

26. Goodman, R. B., R. M. Strieter, D. P. Martin, K. P. Steinberg, J. A. Milberg, R. J. Maunder, S. L. Kunkel, A. Walz, L. D. Hudson, and T. R. Martin. 1996. Inflammatory cytokines in patients with persistence of the acute respiratory distress syndrome. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 154:602-611.
27. Held, H. D., S. Boettcher, L. Hamann, and S. Uhlig. 2001. 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.* 163:711-716.
28. Parker, J. C. and C. L. Ivey. 1997. Isoproterenol attenuates high vascular pressure-induced permeability increases in isolated rat lungs. *J.Appl.Physiol* 83:1962-1967.
29. 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. 2007. TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 293:L923-L932.
30. Anzueto, A., R. P. Baughman, K. K. Guntupalli, J. G. Weg, H. P. Wiedemann, A. A. Raventos, F. Lemaire, W. Long, D. S. Zaccardelli, and E. N. Pattishall. 1996. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N.Engl.J.Med.* 334:1417-1421.

31. Dellinger, R. P., J. L. Zimmerman, R. W. Taylor, R. C. Straube, D. L. Hauser, G. J. Criner, K. Davis, Jr., T. M. Hyers, and P. Papadakos. 1998. Effects of inhaled nitric oxide in patients with acute respiratory distress syndrome: results of a randomized phase II trial. Inhaled Nitric Oxide in ARDS Study Group. *Crit Care Med.* 26:15-23.
32. Bone, R. C., G. Slotman, R. Maunder, H. Silverman, T. M. Hyers, M. D. Kerstein, and J. J. Ursprung. 1989. Randomized double-blind, multicenter study of prostaglandin E1 in patients with the adult respiratory distress syndrome. Prostaglandin E1 Study Group. *Chest* 96:114-119.
33. 2000. Ketoconazole for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. The ARDS Network. *JAMA* 283:1995-2002.
34. Steinberg, K. P., L. D. Hudson, R. B. Goodman, C. L. Hough, P. N. Lanken, R. Hyzy, B. T. Thompson, and M. Ancukiewicz. 2006. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 354:1671-1684.
35. Ware, L. B. and M. A. Matthay. 2000. The acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 342:1334-1349.
36. Cronin, L., D. J. Cook, J. Carlet, D. K. Heyland, D. King, M. A. Lansang, and C. J. Fisher, Jr. 1995. Corticosteroid treatment for

sepsis: a critical appraisal and meta-analysis of the literature. *Crit Care Med.* 23:1430-1439.

37. Derian, C. K., R. J. Santulli, P. E. Rao, H. F. Solomon, and J. A. Barrett. 1995. Inhibition of chemotactic peptide-induced neutrophil adhesion to vascular endothelium by cAMP modulators. *J.Immunol.* 154:308-317.
38. Elferink, J. G. and B. M. de Koster. 2000. Inhibition of interleukin-8-activated human neutrophil chemotaxis by thapsigargin in a calcium- and cyclic AMP-dependent way. *Biochem.Pharmacol.* 59:369-375.
39. Moore, T. M., P. M. Chetham, J. J. Kelly, and T. Stevens. 1998. Signal transduction and regulation of lung endothelial cell permeability. Interaction between calcium and cAMP. *Am.J.Physiol* 275:L203-L222.
40. Matthay, M. A., C. Clerici, and G. Saumon. 2002. Invited review: Active fluid clearance from the distal air spaces of the lung. *J.Appl.Physiol* 93:1533-1541.
41. Dhanakoti, S. N., Y. Gao, M. Q. Nguyen, and J. U. Raj. 2000. Involvement of cGMP-dependent protein kinase in the relaxation of ovine pulmonary arteries to cGMP and cAMP. *J.Appl.Physiol* 88:1637-1642.
42. Imai, Y., K. Kuba, and J. M. Penninger. 2007. Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Cell Mol.Life Sci.* 64:2006-2012.

43. Imai, Y., K. Kuba, S. Rao, Y. Huan, F. Guo, B. Guan, P. Yang, R. Sarao, T. Wada, H. Leong-Poi, et al. 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436:112-116.
44. Li, X., H. Rayford, and B. D. Uhal. 2003. Essential roles for angiotensin receptor AT1a in bleomycin-induced apoptosis and lung fibrosis in mice. *Am.J.Pathol.* 163:2523-2530.
45. 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.
46. Foti, G., M. Cereda, M. E. Sparacino, M. L. De, F. Villa, and A. Pesenti. 2000. Effects of periodic lung recruitment maneuvers on gas exchange and respiratory mechanics in mechanically ventilated acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients. *Intensive Care Med.* 26:501-507.
47. Mercat, A., J. C. Richard, B. Vielle, S. Jaber, D. Osman, J. L. Diehl, J. Y. Lefrant, G. Prat, J. Richecoeur, A. Nieszkowska, et al. 2008. Positive end-expiratory pressure setting in adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 299:646-655.
48. 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, et al. 1998. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 338:347-354.
49. Pepe, P. E., L. D. Hudson, and C. J. Carrico. 1984. Early application of positive end-expiratory pressure in patients at risk for the adult respiratory-distress syndrome. *N.Engl.J.Med.* 311:281-286.
50. Brower, R. G., A. Morris, N. MacIntyre, M. A. Matthay, D. Hayden, T. Thompson, T. Clemmer, P. N. Lanken, and D. Schoenfeld. 2003. Effects of recruitment maneuvers in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome ventilated with high positive end-expiratory pressure. *Crit Care Med.* 31:2592-2597.
51. Carney, D. E., C. E. Bredenberg, H. J. Schiller, A. L. Picone, U. G. McCann, L. A. Gatto, G. Bailey, M. Fillinger, and G. F. Nieman. 1999. The Mechanism of Lung Volume Change during Mechanical Ventilation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 160:1697-1702.
52. Carney, D., J. DiRocco, and G. Nieman. 2005. Dynamic alveolar mechanics and ventilator-induced lung injury. *Crit Care Med.* 33:S122-S128.
53. DiRocco, J. D., L. A. Pavone, D. E. Carney, C. J. Lutz, L. A. Gatto, S. K. Landas, and G. F. Nieman. 2006. Dynamic alveolar mechanics in four models of lung injury. *Intensive Care Med.* 32:140-148.

54. Groh, J., G. E. Kuhnle, L. Ney, A. Sckell, and A. E. Goetz. 1995. Effects of isoflurane on regional pulmonary blood flow during one-lung ventilation. *Br.J.Anaesth.* 74:209-216.
55. Hillier, S. C., J. A. Graham, C. C. Hanger, P. S. Godbey, R. W. Glenny, and W. W. Wagner, Jr. 1997. Hypoxic vasoconstriction in pulmonary arterioles and venules. *J.Appl.Physiol* 82:1084-1090.
56. Nagasaka, Y., J. Bhattacharya, S. Nanjo, M. A. Gropper, and N. C. Staub. 1984. Micropuncture measurement of lung microvascular pressure profile during hypoxia in cats. *Circ.Res.* 54:90-95.
57. Phua, J., J. R. Badia, N. K. Adhikari, J. O. Friedrich, R. A. Fowler, J. M. Singh, D. C. Scales, D. R. Stather, A. Li, A. Jones, et al. 2009. Has mortality from acute respiratory distress syndrome decreased over time?: A systematic review. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 179:220-227.
58. Matute-Bello, G., C. W. Frevert, and T. R. Martin. 2008. Animal models of acute lung injury. *Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol* 295:L379-L399.
59. Tabuchi, A., M. Mertens, H. Kuppe, A. R. Pries, and W. M. Kuebler. 2008. Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J.Appl.Physiol* 104:338-346.
60. Kuebler, W. M., G. E. Kuhnle, J. Groh, and A. E. Goetz. 1994. Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J.Appl.Physiol* 76:65-71.

61. Kuebler, W. M., K. Parthasarathi, J. Lindert, and J. Bhattacharya. 2007. Real-time lung microscopy. *J.Appl.Physiol* 102:1255-1264.
62. Imai, Y., K. Kuba, S. Rao, Y. Huan, F. Guo, B. Guan, P. Yang, R. Sarao, T. Wada, H. Leong-Poi, et al. 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436:112-116.
63. Schuster, D. P. 1994. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 149:245-260.
64. Erickson, S. E., M. G. Shlipak, G. S. Martin, A. P. Wheeler, M. Ancukiewicz, M. A. Matthay, and M. D. Eisner. 2009. Racial and ethnic disparities in mortality from acute lung injury. *Crit Care Med.* 37:1-6.
65. Barnes, K. C. 2005. Genetic determinants and ethnic disparities in sepsis-associated acute lung injury. *Proc.Am.Thorac.Soc.* 2:195-201.
66. Dunnill, M. S. 1967. Effect of lung inflation on alveolar surface area in the dog. *Nature* 214:1013-1014.
67. 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.
68. Harris, R. S. 2005. Pressure-volume curves of the respiratory system. *Respir.Care* 50:78-98.

69. Tabuchi, A., M. Mertens, H. Kuppe, A. R. Pries, and W. M. Kuebler. 2008. Intravital microscopy of the murine pulmonary microcirculation. *J.Appl.Physiol* 104:338-346.
70. Lapinsky, S. E. and S. Mehta. 2005. Bench-to-bedside review: Recruitment and recruiting maneuvers. *Crit Care* 9:60-65.
71. Mead, J., T. Takishima, and D. Leith. 1970. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J.Appl.Physiol* 28:596-608.
72. Vaneker, M., L. A. Joosten, L. M. Heunks, D. G. Snijdelaar, F. J. Halbertsma, E. J. van, M. G. Netea, J. G. van der Hoeven, and G. J. Scheffer. 2008. Low-tidal-volume mechanical ventilation induces a toll-like receptor 4-dependent inflammatory response in healthy mice. *Anesthesiology* 109:465-472.
73. Mollen, K. P., R. M. Levy, J. M. Prince, R. A. Hoffman, M. J. Scott, D. J. Kaczorowski, R. Vallabhaneni, Y. Vodovotz, and T. R. Billiar. 2008. Systemic inflammation and end organ damage following trauma involves functional TLR4 signaling in both bone marrow-derived cells and parenchymal cells. *J.Leukoc.Biol.* 83:80-88.
74. Dietl, P. and T. Haller. 2005. Exocytosis of lung surfactant: from the secretory vesicle to the air-liquid interface. *Annu.Rev.Physiol* 67:595-621.
75. Abraham, E. 2003. Neutrophils and acute lung injury. *Crit Care Med.* 31:S195-S199.

76. Imanaka, H., M. Shimaoka, N. Matsuura, M. Nishimura, N. Ohta, and H. Kiyono. 2001. Ventilator-induced lung injury is associated with neutrophil infiltration, macrophage activation, and TGF-beta 1 mRNA upregulation in rat lungs. *Anesth.Analg.* 92:428-436.
77. McAuley, D. F. and M. A. Matthay. 2005. Is there a role for beta-adrenoceptor agonists in the management of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome? *Treat.Respir.Med.* 4:297-307.
78. Bueltmann, M., X. Kong, M. Mertens, N. Yin, J. Yin, Z. Liu, A. Koster, H. Kuppe, and W. M. Kuebler. 2009. Inhaled milrinone attenuates experimental acute lung injury. *Intensive Care Med.* 35:171-178.
79. Lamarche, Y., L. P. Perrault, S. Maltais, K. Tetreault, J. Lambert, and A. Y. Denault. 2007. Preliminary experience with inhaled milrinone in cardiac surgery. *Eur.J.Cardiothorac.Surg.* 31:1081-1087.
80. Sablotzki, A., W. Starzmann, R. Scheubel, S. Grond, and E. G. Czeslick. 2005. Selective pulmonary vasodilation with inhaled aerosolized milrinone in heart transplant candidates. *Can.J.Anaesth.* 52:1076-1082.
81. Santos, R. A., Simoes e Silva AC, C. Maric, D. M. Silva, R. P. Machado, B. de, I, S. Heringer-Walther, S. V. Pinheiro, M. T. Lopes, M. Bader, et al. 2003. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 100:8258-8263.

82. Kostenis, E., G. Milligan, A. Christopoulos, C. F. Sanchez-Ferrer, S. Heringer-Walther, P. M. Sexton, F. Gembardt, E. Kellett, L. Martini, P. Vanderheyden, et al. 2005. G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation* 111:1806-1813.