

Aus dem Institut für Physiologie der
Charité - Universitätsmedizin in Berlin

Eingereicht über das Institut für Pharmakologie und Toxikologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

**Bestimmung des optimalen Zeitfensters für die therapeutische Anwendung von
Angiotensin-(1-7) beim akuten Atemnotsyndrom bei der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Stefanie Supé
Tierärztin aus Bad Oeynhausen

Berlin 2018

Journal-Nr.: 400

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Heidrun Fink
Zweiter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Kübler
Dritter Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

rats,
acute respiratory distress syndrome,
angiotensin,
oleic acid

Tag der Promotion: 14.06.2018

Meinen Ahnen Sophie und Margarete Sassenberg

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Akutes Atemnotsyndrom	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.3	Pathogenese	2
1.1.4	Therapiemöglichkeiten	2
1.2	Schadensmodelle	3
1.2.1	Das Ölsäuremodell	3
1.3	Das Renin-Angiotensin-System	4
1.3.1	ACE und ACE2	4
1.3.2	Angiotensin II	5
1.3.3	Lokale Wirksamkeit des Renin-Angiotensin-Systems	6
1.3.4	Pathologische Effekte von Angiotensin II	6
1.3.5	Angiotensin-(1-7)	6
1.3.6	Therapeutische Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems	7
1.4	Ziel der Arbeit	8
2	TIERE, MATERIALIEN UND METHODEN	9
2.1	Versuchstiere	9
2.2	Arbeitsgeräte, Substanzen, Verbrauchsmaterial	10
3	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG	12
3.1	Vorbereitung	12
3.2	Anästhesie und Anästhesiekontrolle	12
3.3	Operation	13
3.3.1	Operationsbesteck	13
3.3.2	Tracheotomie und Beatmung	13
3.3.3	Halspräparation	14
3.3.4	Thorakotomie und Messung der zentralen Hämodynamik	14
3.4	Versuchsablauf	17
3.4.1	Versuchsgruppen	17
3.4.2	Experimentelles Protokoll	19
3.5	Verarbeitung und Auswertung der Proben	21
3.5.1	Myeloperoxidase-Aktivitätsmessung	21
3.5.2	Bestimmung des Feucht-Trockengewicht-Verhältnisses der Lunge	22
3.5.3	Messung des Gesamtproteingehaltes der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	23
3.5.4	Messung von Tumornekrosefaktor-alpha in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	23
3.5.5	Messung der Aktivitäten von ACE2 und ACE	24
3.5.6	Statistische Auswertung	24

4	ERGEBNISSE	25
4.1	Relevante hämodynamische Messergebnisse	25
4.1.1	Arterieller Blutdruck.....	25
4.1.2	Pulmovaskulärer Gefäßwiderstand.....	27
4.2	Ergebnisse Blutgase	28
4.2.1	Sauerstoffpartialdruck	28
4.2.2	Kohlendioxidpartialdruck	28
4.3	Ergebnisse Entzündungsparameter	29
4.3.1	Myeloperoxidase-Aktivität.....	29
4.3.2	Feucht-Trockengewicht-Verhältnis der Lunge	30
4.3.3	Gesamtproteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	31
4.3.4	Konzentration von TNF- α in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	32
4.4	Verhältnis der ACE2/ACE-Aktivität im Lungengewebe.....	33
5	DISKUSSION	34
5.1	Modellkritik	34
5.1.1	Das Ölsäuremodell des akuten Lungenschadens.....	34
5.1.2	Narkose	34
5.1.3	Beatmung.....	35
5.1.4	Operation	35
5.1.5	Versuchsdauer	36
5.1.6	Messung der Myeloperoxidase.....	36
5.1.7	Durchführung der bronchoalveolären Lavage	36
5.1.8	Protokollkritik.....	36
5.1.9	Angiotensin-(1-7) als therapeutische Strategie zur Behandlung des akuten Atemnotsyndroms	37
5.2	Diskussion der Ergebnisse	38
5.2.1	Hämodynamik.....	38
5.2.1.1	Arterieller Blutdruck.....	38
5.2.1.2	Pulmovaskulärer Gefäßwiderstand	39
5.2.2	Blutgase.....	40
5.2.2.1	Arterieller Sauerstoffpartialdruck.....	40
5.2.2.2	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck	41
5.2.3	Entzündungsparameter.....	42
5.2.3.1	Myeloperoxidase-Aktivität	42
5.2.3.2	Feucht-Trockengewicht-Verhältnis der Lunge.....	43
5.2.3.3	Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.....	44
5.2.3.4	Tumornekrosefaktor-alpha in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit	45
5.2.4	Aktivitäten von ACE2 und ACE	45
5.3	Klinische Aspekte	47
5.3.1	Klinische Studien	48
5.3.2	Toxikologische Aspekte aus tierexperimentellen Arbeiten.....	48
5.4	Pharmakologische Aspekte	48
6	AUSBLICK.....	50

7	ZUSAMMENFASSUNG	51
8	SUMMARY	54
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	56
10	PUBLIKATIONSLISTE.....	78
11	DANKSAGUNG	79
12	FINANZIERUNGSQUELLEN	80
13	SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	81

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg/ml	Mikrogramm pro Milliliter
µm	Mikrometer
Abs.	Absatz
ACE	<i>angiotensin converting enzyme</i> , Angiotensin Konversionsenzym
ACE2	<i>ACE-related carboxydase</i> , Angiotensin Konversionsenzym 2
ADH	Antidiuretisches Hormon
AECC	American-European Consensus Conference
ALI	<i>acute lung injury</i> , akuter Lungenschaden
Ang II	Angiotensin II
Ang-(1-7)	Angiotensin-(1-7)
AD	mittlerer arterieller Blutdruck
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i> , akutes Atemnotsyndrom
Art. Nr.	Artikelnummer
AT ₁ R	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-1
AT ₂ R	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp-2
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit
BSA	bovines Serum Albumin
C	Kontrollgruppe
C21	Compound 21
DIC	disseminierte intravasale Gerinnung
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDA	Food and Drug Administration, Nahrungs-und-Medizin-Verwaltung der USA
FiO ₂	inspiratorischer Sauerstoffanteil bei maschineller Beatmung
Flow	Herzminutenvolumen
G	Normalerdschwerebeschleunigung
HES	HydroxyethylstärkeLösung
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
i.v.	intravenös
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
ID Liste	Identifizierungsliste
LAD	linksatrialer Blutdruck
LN ₂	flüssiger Stickstoff
M, mM	Molar, Millimolar
Mca-APK (Dnp)	ACE2-Substrat (fluorogen)
Min	Minute
ml/h	Milliliter pro Stunde
ml/kg, mg/kg	Milliliter pro Kilogramm, Milligramm per Kilogramm
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule, Maßangabe für den Blutdruck
MPO	Myeloperoxidase
mU/ml	Milliunits pro Milliliter
n	Anzahl der Versuchstiere pro Gruppe
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe
NaCl	isotone Kochsalzlösung
NEM	N-Ethylmaleimid
NEP	Neutrale Endopeptidase, Neprilysin
ng/l	Nanogramm pro Liter
nm	Nanometer
OA	Ölsäuregruppe, Ölsäure

PAI-1	Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1
paCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAD	mittlerer Pulmonalarterieller Blutdruck
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
paO ₂ /FiO ₂	alveolärer Sauerstoffpartialdruck
PEEP	<i>positive end-expiratory pressure</i> , positiv endexpiratorischer Druck
PEP	Prolyl Endopeptidase
pg/mg	Pikogramm pro Milligramm
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
pmol/kg/min	Pikomol pro Kilogramm Körpergewicht pro Minute
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PVR	pulmonalvaskulärer Gefäßwiderstand
RAS	Renin-Angiotensin-System
SEM	Mittelwert ± Standardfehler des Mittelwerts
sTNFr-1	im Serum gelöster TNF- α -Rezeptor
t	Zeitpunkt
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
TOP	Thimet Oligopeptidase
u/g	Units pro Gramm
VILI	<i>ventilator induced lung injury</i> , beatmungsinduzierter Lungenschaden
vs.	<i>versus</i> , gegen
ZVD	zentralvenöser Blutdruck

1 Einleitung

1.1 Akutes Atemnotsyndrom

Das akute Atemnotsyndrom (ARDS) ist ein gravierendes intensivmedizinisches Problem. Seine hohe Relevanz ergibt sich neben der Inzidenz von 15 bis 86 pro 100.000 Einwohner und Jahr^{1,2,3} und 16 Prozent der künstlich beatmeten Patienten⁴ aus einer hohen Sterblichkeit, die mit 22 bis 75 Prozent angegeben wird³⁻⁶.

Die Angaben zur Inzidenz und Mortalität variieren teilweise erheblich aufgrund uneinheitlicher Definitionen in der Vergangenheit, geographischer und ätiologischer Variationen sowie teilweise inadäquater Dokumentation oder Unterdiagnose des Syndroms⁷. Nichtsdestotrotz sind die Morbidität und Mortalität als hoch anzusehen.

Die häufigste Todesursache stellt Multiorganversagen^{6,8,9,10} dar. Überlebende haben häufig eine Verminderung ihrer Lebensqualität und unterschiedliche Langzeitschäden zu beklagen. Dabei handelt es sich zumeist um eine chronische Verminderung der Lungenfunktion¹¹ oder neuropsychologische Beschwerden¹².

1.1.1 Definition

Lange nach der ersten Beschreibung des komplexen Syndroms im Jahre 1967¹³ wurde 1994 eine erste einheitliche Definition durch die American-European Consensus Conference (AECC) eingeführt¹⁴, was sich für die Erhebung vergleichbarer Studien als dringend notwendig erwiesen hatte. Dem zufolge umfassten die Kennzeichen von ARDS den Grad der Oxygenierung des arteriellen Blutes, dargestellt durch den sogenannten Horowitz-Quotienten aus arteriellem Sauerstoffpartialdruck und inspiratorischer Sauerstoffkonzentration¹⁵ sowie einen akuten Verlauf, bilaterale Infiltrate im anterior-posterioren Thoraxröntgenbild sowie einen erhöhten pulmonalen Arterienverschlussdruck von unter 18 mmHg zum Ausschluss einer ursächlichen kardialen Genese.

Eine weiter präzisierte Berliner Definition¹⁶ aus dem Jahre 2011 erlaubt eine noch bessere Vergleichbarkeit klinischer Fälle und wissenschaftlicher Studien¹⁶. Dem zufolge wird ARDS anhand des Sauerstoffgehaltes des arteriellen Blutes in die Grade „mild“ ($\text{paO}_2/\text{FiO}_2$ zwischen 200 und 300 mmHg), „mäßig“ ($\text{paO}_2/\text{FiO}_2$ 100 bis 200 mmHg), und „schwer“ ($\text{paO}_2/\text{FiO}_2 \leq 100$ mmHg) unterteilt. Auch diese Definition sieht ein akutes Auftreten innerhalb einer Woche, röntgenologisch darstellbare Lungeninfiltrate und den Ausschluss einer ursächlichen Herzinsuffizienz vor.

1.1.2 Ätiologie

Die möglichen Auslöser des ARDS sind vielgestaltig. In drei von vier Fällen liegt eine direkte Lungenschädigung zugrunde², häufig eine Pneumonie. Aber auch die Aspiration von Mageninhalt oder von Süß- oder Salzwasser („Beinaheertrinken“), Inhalation toxischer Gase wie im Falle einer Rauchvergiftung, Inhalationstrauma durch maschinelle Beatmung¹⁷, Inhalation von hyperbarem Sauerstoff, Vergiftung durch Narkosemittel oder eine Lungenkontusion können zu einem Lungenschaden führen¹⁸.

Extrapulmonale Ursachen können eine Sepsis sein^{19,20}, sowie (Poly-)Trauma, Schock, Fettembolie nach Fraktur eines markhaltigen Röhrenknochens²¹, disseminierte intravasale Gerinnung (disseminated intravascular coagulation, DIC), Verbrennung²², akute Pankreatitis²³, kardiopulmonaler Bypass, Bluttransfusion²⁴, Organtransplantation²⁵, schwerer Verlauf einer

Malariainfektion²⁶, sowie die Infektion mit dem SARS-Virus (Severe Acute Respiratory Syndrome)¹⁸ sein.

Auch mögliche genetische Faktoren hinsichtlich der Anfälligkeit für pulmonale Erkrankungen werden diskutiert²⁷⁻³⁰.

1.1.3 Pathogenese

Unabhängig von der Art der auslösenden Noxe handelt es sich beim ARDS um eine entzündliche Reaktion, die von der alveolokapillären Membran ausgehend³¹, zum Untergang der Zellen der Austauschflächen und im weiteren Verlauf zu einer Fibrosierung und narbiger Umgestaltung der Lunge führt³².

Dementsprechend wird zwischen einer initialen exsudativen Phase unterschieden, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wird und die noch reversibel ist, und einer fibroproliferativen Spätphase³³.

Nach Eintritt der Noxe kommt es bereits binnen kürzester Zeit zu Schädigungen des Alveolarepithels und des Lungenkapillarendothels³⁴, die zusammen die hauchdünne, 0,1 bis 0,2 µm messende³⁵ Blut-Luft-Schranke darstellen. Durch die resultierende erhöhte Permeabilität kommt es durch den Austritt proteinreicher und zellhaltiger Flüssigkeit zur Etablierung eines interstitiellen und alveolären Lungenödems³⁶, das nicht mehr durch die natürlichen Regulationsmechanismen³⁷ reabsorbiert werden kann. Eine überschießende Entzündungsreaktion aktivierter Immunzellen unterhält und verstärkt diesen Vorgang³⁸. Der hieraus resultierende Funktionsverlust der Lunge verursacht eine zunehmende Hypoxie, die bereits in dieser Phase lebensbedrohliche Ausmaße erreichen kann.

Infolge der Proteinexsudation im Übergang zur fibroproliferativen Phase bilden sich hyaline Membranen innerhalb der Alveolen. Durch kapilläre Mikrothromben- und Atelektasenbildung kommt es zu einer Ventilations-Perfusions-Störung als Folge von Totraumventilation und intrapulmonalen Shunts³⁹. Dadurch wird dem Kreislauf venöses Blut ohne erfolgte Sauerstoffanreicherung in der Lunge rückgeführt.

Durch Schädigung und Untergang der Alveolarepithelzellen Typ II, deren Aufgabe neben der „fluid clearance“⁴⁰ unter anderem die Bildung von Surface Active Agent (Surfactant)⁴¹ ist, kommt es zusätzlich zu einer verminderten Compliance. Klinisch tritt eine zunehmende, andauernde Luftnot und eine pathognomonische Veränderung des Thoraxröntgenbildes mit fleckigen und streifigen Verdichtungen beider Lungen in den Vordergrund.

Im weiteren Verlauf kommt es innerhalb weniger Tage zum Ersatz der untergegangenen Alveolarzellen durch einwandernde Fibrozyten und eine verminderte Fibrinolyseaktivität⁴² und einer fortschreitenden Dickezunahme der Alveolarsepten⁴³. Die fatalen Folgen sind eine weiter herabgesetzte Compliance und eine weitere Verminderung des Gasaustausches.

Die besondere Bedeutung des ARDS für die medizinische Forschung erwächst aus dem Mangel wirksamer pharmakologischer Interventionsmöglichkeiten, um die hohe Sterberate betroffener Patienten zu verringern⁴⁴.

1.1.4 Therapiemöglichkeiten

Seit der ersten Erwähnung hat es weltweit umfangreiche Forschungsbemühungen um wirkungsvolle pharmakologische Therapiemöglichkeiten gegeben, es konnten jedoch bis heute keine befriedigenden Resultate in Form einer Senkung der Letalität erzielt werden⁴⁵. Zu den zahlreichen untersuchten Substanzen zählen beispielsweise Glukokortikoide⁴⁶⁻⁵⁰, inhaliertes Stickstoffmonoxid^{51,52}, das Atemstimulanz Almitrin⁵³, Surfactant-Ersatz^{54,55}, inhaliertes Prostacyclin⁵⁶, das Beta-2-Sympatomimetikum Salbutamol⁵⁷⁻⁵⁹, Ketokonazol^{60,61}, der Neutrophile Elastase-Inhibitor Sivelestat^{62,63}, Lisofyllin⁶⁴, Ibuprofen^{65,66}, Aspirin⁶⁷⁻⁶⁹,

Furosemid⁷⁰ und N-acetylcystein^{71,72}.

Vielversprechend sind zum Beispiel klinische Studien mit Muskelrelaxantien⁷³, zellbasierten Therapien mit Stammzellen⁷⁴⁻⁷⁸, Statinen⁷⁹⁻⁸¹, Curcumin⁸², Vitamin C⁸³, Vitamin D⁸⁴ und Interferon^{85,86}.

Die erfolgsversprechendste, standardisierte Behandlungsmethode ist neben kausaler Behandlung der auslösenden Ursache die Anwendung einer lungenschonenden Beatmungsstrategie als Kombination von kleinen Tidalvolumina von 6 ml/kg idealem Körpergewicht mit niedrigen Spitzendrücken⁸⁷⁻⁸⁹. Durch einen hohen PEEP (positive end-expiratory pressure, positiver endexpiratorischer Druck) wird die Oxygenierung verbessert⁹⁰, indem es am Ende der Expirationsphase nicht zum völligen Abfall des Beatmungsdruckes und damit zum Kollaps der geschädigten Alveolen kommt. Dabei werden ein zyklisches Zusammenfallen und wieder Aufdehnen der Alveolen verhindert und minderbelüftete Areale wie kollabierte Alveolen oder Atelektasen wieder rekrutiert⁹¹. In schwersten Fällen kann eine Pronationslagerung des Patienten⁹²⁻⁹⁴, kontinuierliche Rotation um sechzig Grad⁹⁵ oder schließlich ein extrakorporaler Membranoxygenator eingesetzt werden⁹⁶⁻⁹⁸. Während der Beatmung ist des Weiteren eine optimale Mundhygiene essentiell⁹⁹.

1.2 Schadensmodelle

Zur Untersuchung der Komplexität und der systemischen Zusammenhänge des ARDS gibt es verschiedene etablierte Modelle zur Erzeugung eines ARDS am Versuchstier. Zwar vermag keines der Modelle die gesamte Palette der Auswirkungen des ARDS darzustellen, sie können jedoch durch die einzelnen Modelle z.T. gut repliziert und mechanistisch untersucht werden¹⁰⁰. Dabei wurden zahlreiche Versuchsmodelle etabliert, die entweder eine direkte Lungenschädigung auslösen (zum Beispiel durch Überbeatmung¹⁰⁰⁻¹⁰⁴, Instillation von Salzsäure¹⁰⁵⁻¹⁰⁷ oder Endotoxin^{108,109}, saline Auswaschungen^{110,111}), oder eine indirekte Schädigung der Lunge (systemische Gabe von Ölsäure^{112,113} oder Endotoxin¹¹⁴⁻¹¹⁶, Sepsisinduktion durch zäkale Ligation und Perforation¹¹⁷ oder intraperitoneale Bakterieninstillation¹¹⁸).

1.2.1 Das Ölsäuremodell

Eine intravenöse Gabe von Ölsäure bildet einen ARDS der Ätiologie eines Fettembolie-Syndroms nach^{21,119}, das sich vornehmlich nach Frakturen langer, markhaltiger Röhrenknochen¹²⁰, aber auch in Folge von Verbrennung¹²¹, Weichteiltrauma¹²² oder Liposuktion¹²³ entwickeln kann. Auch Sepsis, Pankreatitis und Fehlernährung¹²⁴ können zu einem erhöhten Blutspiegel von Ölsäure führen¹²⁵. Zirkulierende Fetttröpfchen verstopfen das pulmonale Gefäßbett¹²⁶ mit anschließender Thrombusbildung durch Ablagerung von Fibrin und Thrombozyten¹²⁷. Zusammen mit hypoxisch bedingter Vasokonstriktion, die eine Ausschüttung von Thromboxan und Prostaglandin¹²⁸ bedingt, führt dies zu einem sekundären Anstieg des pulmovaskulären Druckes¹²⁹.

Zudem wirkt Ölsäure nach Bindung an Endothelzellen und Membranen direkt toxisch und greift die alveolo-kapilläre Schranke an^{35,130}. Dabei übersteigt die Empfindlichkeit der Lunge gegen eine Schädigung durch Ölsäure um ein Vielfaches die anderer Organe, wie zum Beispiel der Leber¹³⁰.

Unmittelbar nach der Applikation kommt es zu nekrotischen Veränderungen der kapillären Endothelzellen und mikrovaskulären Thrombosierungen¹³¹, gefolgt von Nekrosen des Alveolarepithels. Rasch entwickeln sich eine Hypoxämie und ein Anstieg des pulmovaskulären Widerstandes¹³².

Dieses Modell erzeugt entsprechend gut nachweisbar und verlässlich reproduzierbar die frühen Auswirkungen des ARDS wie Permeabilitätsveränderungen, die entzündliche Veränderung der Lunge und der Lungenmechanik¹³³.

Patienten mit ARDS weisen im Vergleich zu nicht Betroffenen sowohl einen im Blut höheren Ölsäurespiegel auf¹³⁴ als auch eine größere Menge integrierter Ölsäure in den Phospholipiden des Surfactant^{135,136}. Der Ölsäuregehalt im Blut kann sogar als prognostischer Faktor bei ARDS herangezogen werden¹³⁷.

1.3 Das Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) stellt durch Regulation der Gefäßspannung und des zirkulierenden Blutvolumens das wichtigste blutdruckregulierende System dar¹³⁸. In den letzten Jahren konnte darüber hinaus ein enormer Kenntniszuwachs über zahlreiche weitere Funktionen des RAS infolge der Aktivierung unterschiedlicher Signalwege in verschiedenen Geweben errungen werden, die in den folgenden Unterkapiteln erläutert werden.

So gibt es nicht nur das „klassische“, lang bekannte und erforschte, grafisch gradlinig dargestellte RAS mit der Aufgabe der Bildung eines einzigen Effektors, des Angiotensin II, sondern mittlerweile stellt sich das RAS vielmehr als ein sich selbst regulierendes und ausbalancierendes System mit weiteren Effektoren und Enzymen dar¹³⁹.

1.3.1 ACE und ACE2

Angiotensin Konversionsenzym (ACE, angiotensin converting enzyme)¹⁴⁰ und Angiotensin Konversionsenzym 2 (ACE2, angiotensin converting enzyme 2, Human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase)¹⁴¹ sind Peptidasen in der RAS-Kaskade. Trotz hoher genetischer Sequenzhomologie von 61 Prozent¹⁴¹ erfüllen sie unterschiedliche Aufgaben.

ACE ist eine Peptyl-dipeptidase, die unter anderem den Entwicklungsschritt vom Angiotensin I zum Angiotensin II katalysiert, sowie Ang-(1-7) um zwei Aminosäuren verkürzt (siehe Abbildung 2). Dies geschieht hauptsächlich im vaskulären Endothel der Lunge. ACE findet sich aber auch in fast allen anderen Organen¹⁴², sowohl plasmamembranständig, als auch in Körperflüssigkeiten gelöst¹⁴³.

ACE2 dagegen ist eine Carboxypeptidase¹⁴⁴, die eine einzelne Aminosäure vom C-terminalen Ende seiner Substrate abspaltet¹⁴⁵. Auch ACE2 ist ein Ektoenzym¹⁴⁶ und membranständig auf Endothelzellen zahlreicher Organe vertreten¹⁴¹.

Dabei trägt es nicht wie ACE zur Bildung von Ang II bei, sondern spaltet Ang II vielmehr zum Ang-(1-7)¹⁴⁷. Außerdem spaltet es unter anderem Ang I zu Ang-(1-9), das seinerseits weiter zu Ang-(1-7) abgebaut wird und damit nicht mehr für die Synthese zu Ang II zur Verfügung steht. Dabei ist das katalytische Potenzial für die Spaltung von Ang II etwa 400-fach höher als für Ang I¹⁴⁵.

Seit seiner Entdeckung unlängs im Jahre 2000^{141,144} werden ACE2 als Gegenspieler von Ang II benefizielle Eigenschaften bei zahlreichen Erkrankungen, wie beispielsweise bei Bluthochdruck, Herzfibrose¹⁴⁸ und -hypertrophie¹⁴⁹ zugeschrieben.

Die herausragende Erkenntnis über den protektiven Effekt von ACE2 auf den akuten Lungenschaden bei Mäusen¹⁵⁰ stellt einen Meilenstein in Richtung einer Etablierung von Ang-(1-7) als Therapeutikum dar. Dieser Zusammenhang ergibt sich aus der enzymatischen Funktion des ACE2, Ang-(1-7) aus Ang II zu generieren.

1.3.2 Angiotensin II

Das Oktapeptid Angiotensin II (Ang II) gilt als der Haupteffektor des RAS und erweckte seit seiner ersten Erwähnung im Jahre 1940^{151,152} großes wissenschaftliches Interesse.

Ein Abfallen des systemischen Blutdruckes bewirkt eine Freisetzung des Enzyms Renin, die in Abbildung 1 schematisch dargestellt ist. Das zirkulierende Prohormon Angiotensinogen dient Renin als Substrat, um das inaktive Dekapeptid Angiotensin I abzuspalten. Hieraus entsteht durch die hydrolytische Wirkung des ACE schließlich Angiotensin II¹⁵³.

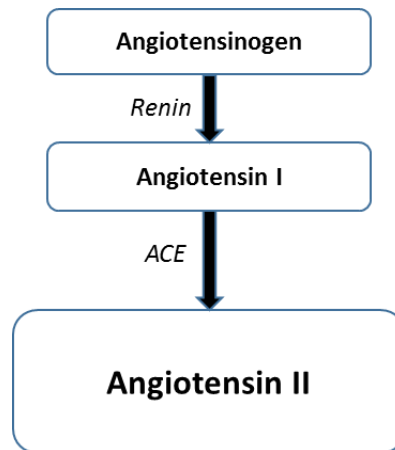


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Bildungswegs von Angiotensin II.
ACE = Angiotensin Konversionsenzym

Seine Hauptaufgabe wird traditionell in der direkten Erhöhung des Blutdrucks durch Vasokonstriktion gesehen. Seine Stimulation der Aldosteronausschüttung mit Folge einer Wasserretention durch Osmose, sowie seine Freisetzung des Antidiuretischen Hormons (ADH), das eine vermehrte Rückresorption von Wasser bewirkt, steigern weiterhin den Blutdruck.

Weiterhin ist das RAS an den unterschiedlichen Stadien des Entzündungsgeschehens in vielfältiger Weise beteiligt. So trägt es zur Initiierung einer Entzündung¹⁵⁴ durch Erhöhung der vaskulären Permeabilität bei^{155,156} und erleichtert einen Austritt von Entzündungskomponenten aus dem Gefäßsystem in das Gewebe. Zudem bewirkt es durch Stimulation der Expression von Chemokinen eine vermehrte Rekrutierung und Mobilisierung^{157,158} sowie Aktivierung von Leukozyten¹⁵⁹ und erhöht deren Einwanderung ins Gewebe über die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen^{160,161} an Gefäßwänden. Außerdem ist es an Reparaturprozessen durch Regulation von Regeneration und Fibrose¹⁶²⁻¹⁶⁴ sowie Apoptose¹⁶⁵ beteiligt.

Die meisten der genannten Wirkungen werden über den Hauptrezeptor AT₁R (AT₁-Rezeptor) vermittelt. Darüber hinaus existiert noch ein AT₂-Rezeptor, der hauptsächlich vorgeburtlich, aber auch anschließend in weniger hohem Ausmaß in verschiedenen Organen exprimiert wird¹⁶⁶ und in den meisten Fällen konträr zum AT₁R wirkt.

1.3.3 Lokale Wirksamkeit des Renin-Angiotensin-Systems

Neben den systemischen Effekten gibt es auch eine wachsende Zahl von bekannten Beispielen von unabhängigen, lokal begrenzten Aktivierungen des RAS (Renin¹⁶⁷, Angiotensinogen¹⁶⁸, ACE^{169,170}) mit voller Wirkungsentfaltung¹⁷¹. Lokale RAS finden sich zum Beispiel in der Lunge¹⁷² in den Gefäßwänden^{173,174}, im Myokard^{175,176}, Gehirn¹⁷⁷, Neuronen¹⁷⁸, in der Niere¹⁷⁹, Nebenniere^{180,181}, den Geschlechtsorganen^{182,183}, im Pankreas^{184,185}, Fettgewebe¹⁸⁶ und im Darm¹⁸⁷ und Zahnfleisch^{188,189}. Sogar intrakrine Prozesse sind bekannt, das bedeutet, die Wirkung findet bereits innerhalb der Mutterzelle statt¹⁹⁰⁻¹⁹².

1.3.4 Pathologische Effekte von Angiotensin II

Eine hohe klinische Relevanz des RAS ergibt sich aus den vielfach bei pathologischen Prozessen erhöhten Ang II-Spiegeln. Dazu zählen beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen (Myokardinfarkt¹⁹³, Atherosklerose¹⁹⁴, Bluthochdruck¹⁹⁵), Nierenerkrankungen¹⁹⁶ und Diabetes¹⁹⁵ und seinen Komplikationen^{197,198}. Zudem trägt Ang II zur Entstehung von Entzündungen bei¹⁹⁹ und ist an rheumatoiden Prozessen beteiligt²⁰⁰.

1.3.5 Angiotensin-(1-7)

Angiotensin-(1-7) ist die bedeutendste Verbindung der „neuen“, erst später identifizierten Achse des RAS. Seine gegenregulatorischen Eigenschaften zum „klassischen“ RAS legen einen möglichen Einsatz als antiinflammatorisches Therapeutikum nah. Seit seiner Entdeckung im Jahre 1991²⁰¹ als weiterer bioaktiver Bestandteil des RAS haben ausgiebige Forschungsarbeiten kontinuierlich sowohl weitere Erkenntnisse über seine Funktion hervorgebracht als auch unser Verständnis des RAS reformiert.

Wie in Abbildung 2 ersichtlich, ist der bedeutendste Bildungsweg von Ang-(1-7) der Abbau von Ang II durch die Abspaltung einer Aminosäure durch die Exopeptidase ACE2²⁰². Weitere, wenn auch weniger effiziente Bildungswege sind die direkte Abspaltung dreier Aminosäuren von Angiotensin I durch die ACE2-unabhängigen gewebsspezifischen Enzyme NEP (Neutralendopeptidase, Neprilysin)²⁰²⁻²⁰⁴, Prolylendopeptidase (PEP)^{205,206} und Thimet Oligopeptidase (TOP)²⁰⁷, sowie über das Zwischenprodukt Angiotensin-(1-9)^{202,208}.

Die Metabolisierung verläuft über die Hydrolyisierung durch ACE²⁰⁹ und andere Peptidasen in kleinere Peptidfragmente.

Ang-(1-7) entfaltet seine Wirkung über seinen eigenen Rezeptor, den G-Protein-gekoppelten Rezeptor Mas²¹⁰. Daneben scheint es neuesten Erkenntnissen nach auch mit dem AT₂-Rezeptor zu interagieren^{211,212}, möglicherweise durch eine Dimerisierung dieser beiden Rezeptoren²¹³. Eine Beteiligung weiterer Rezeptoren kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, es liegen jedoch noch keine gesicherten Kenntnisse darüber vor.

Zahlreiche Effekte des Ang-(1-7) antagonisieren die Wirkungen seines Vorläufermoleküls Ang II. So bewirkt es eine Vasodilatation²¹⁴ durch Prostaglandin- und Bradykininfreisetzung²¹⁵⁻²¹⁸ und somit eine Blutdrucksenkung²¹⁹⁻²²². Es verfügt über antiinflammatorische Eigenschaften durch Reduktion proinflammatorischer Zytokine^{223,224} und wirkt antifibrotisch^{225,226} durch Hemmung von Fibrozyten²²⁷ und unterstützt die Wundheilung²²⁸. Es wirkt vasoprotektiv und kann vor Arteriosklerose schützen²²⁹.

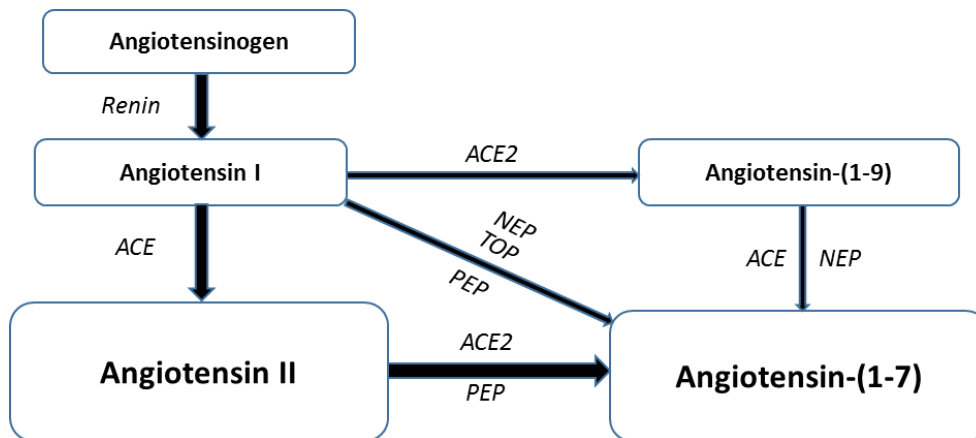


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Bildungswege von Angiotensin-(1-7) und Angiotensin II.
 ACE = Angiotensin Konversionsenzym, ACE2 = Angiotensin Konversionsenzym 2, NEP = Neutrale Endopeptidase, PEP = Prolylendopeptidase, TOP = Thimet Oligopeptidase.

1.3.6 Therapeutische Beeinflussung des Renin-Angiotensin-Systems

Es stehen diverse Pharmaka zur Hemmung der kardiovaskulären Wirkungen des Angiotensin über seinen AT₁-Rezeptor zur Verfügung.

Das vorrangige therapeutische Ziel dieser Pharmaka stellt eine antihypertensive Wirkung sowie eine Entlastung des Herzens und der Nieren zur Behandlung von Bluthochdruck, chronischer Herzinsuffizienz und diabetischer Nephropathie dar.

Ein Ansatz liegt in der Behinderung der Produktion von Angiotensin II mit Hilfe von Enzymhemmern (ACE-Blocker, Reninhemmer). Unerwünschte Wirkungen der ACE-Blocker stellen Hypotonie, trockener Reizhusten, Exantheme, Nierenfunktionsstörungen und Hyperkaliämie dar. Den gleichen Effekt, jedoch mit weniger Nebenwirkungen behaftet, erzeugt eine direkte Blockade des AT₁R mit Hilfe von selektiven AT₁-Rezeptor-Antagonisten.

Geringe Nebenwirkungen sind auch von dem Einsatz der Komponenten des „neuen“ Armes des RAS zu erwarten, da es sich um körpereigene Substanzen handelt. Dabei kann es sich sowohl um eine Hemmung der Wirkung des Ang II durch den Einsatz von ACE2 handeln, der eine Verstoffwechselung von Ang II zu Ang-(1-7) katalysiert und damit die Menge des zirkulierenden Ang II reduziert, als auch um den in dieser Arbeit durchgeführten Ansatz der Verabreichung von Ang-(1-7) selbst.

Derzeit bahnen vielversprechende klinische Studien den Weg für einen baldigen Einsatz von Ang-(1-7) als Therapeutikum. Die antiinflammatorischen Eigenschaften von Ang-(1-7) stellen einen idealen Ansatzpunkt zur therapeutischen Behandlung des ARDS dar, der sich durch eine überschießende Immunreaktion auszeichnet.

1.4 Ziel der Arbeit

Eine Vielzahl an Forschungsarbeiten belegen positive Effekte von Ang-(1-7) bei diversen Krankheitsgeschehen²³⁰⁻²³². Auch im Falle des akuten Lungenschadens sind die protektiven Eigenschaften des Ang-(1-7) unumstritten^{233,234}, so dass sein Einsatz als neue therapeutische Behandlungsmethode gegen das akute Atemnotsyndrom zu berechtigter Hoffnung auf eine Senkung der Letalität veranlasst. Auf dem Weg zur klinischen Einführung sind zunächst noch einige wichtige Fragen zu beantworten.

So müssen die ideale Dosierung, der am besten geeignete Applikationsweg, sowie das optimale Zeitfenster für eine Intervention evaluiert werden. Letztere Problematik wird im Rahmen dieser Arbeit tierexperimentell untersucht.

Zu diesem Zweck kommen vier verschiedene Szenarien zum Vergleich. Eine umgehend nach Induktion eines akuten Lungenschadens eingeleiteten Dauertropfbehandlung mit Ang-(1-7) über den gesamten Zeitraum des Experimentes steht einer Kurzzeitbehandlung gegenüber. Daneben wird ein späterer Therapiebeginn zu einem Zeitpunkt der fortgeschrittenen Symptomatik des akuten Lungenschadens durchgeführt, sowie eine präventive Behandlung, die beim Eintritt des Lungenschadens bereits abgeschlossen ist.

2 Tiere, Materialien und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden männliche Ratten der Rasse Sprague-Dawley mit einem Körpergewicht von 330 bis 360 g verwendet. Sie wurden von Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen und unter standardisierten Bedingungen gemäß des deutschen Tierschutzgesetzes in der Versuchstieranlage des Physiologischen Institutes der Charité Berlin gehalten und durch fachkundiges Personal betreut. Alle Tiere erhielten bis zu Beginn des Versuches Standardfutter für Ratten sowie Trinkwasser ad libitum und befanden sich in Gruppen von bis zu fünf Tieren in den Käfigen. Sie wurden unmittelbar vor Versuchsbeginn adspektorisch auf mögliche Krankheitssymptome hin untersucht und gewogen.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß § 8 Abs. 1 des Deutschen Tierschutzgesetzes ordnungsgemäß vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin genehmigt.

2.2 Arbeitsgeräte, Substanzen, Verbrauchsmaterial

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Beatmungsgerät Ratte	Animal-Respirator Advanced 4601-1	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Wärmeunterlage	Homeothermic Blanket System, Control Unit model 50-7129	Hugo-Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH
Temperatur- Messgerät	GTH 175/Pt	Greisinger electronic, Regenstauf, Deutschland
Operationsmikroskop	Op-Mi-1	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Infusionspumpe	Perfusor, Typ 8713820	Braun, Melsungen, Deutschland
Infusionspumpe	Injectomat cp-PS Fresenius	Fresenius AG, Schweinfurt, Deutschland
Computer, Software DasyLab	DasyLab® 32	DasyLab, Mönchengladbach, Deutschland
Signalanschlussbox	Plugsys basic system case, Katalognummer 73-0045	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March- Hugstetten, Deutschland
Druckmesswandler	differential pressure transducer, MPX type 399/2	Hugo-Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH
Druckeichgerät		Marke Eigenbau
Elektro-Lötpistole mit gebogener Lötspitze	Engel-Löter 100S 80 W 230V/AC; Lötspitze gebogen, 100 WB	HSGM GmbH, Walluf, Deutschland
Flussmesser	Transonic Flowprobe, Serial Nr. 2.5SB1115	Hugo Sachs Elektronik - Harvard Apparatus GmbH, March- Hugstetten, Deutschland
Blutgasanalysegerät	RapidLab 348	Rapidlab Chiron Diagnostics, Emeryville, CA, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Elektrowaage		Ohaus, Nänikon, Schweiz
Feinwaage	Elektronische Analysewaage 1801 MP8	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
Trockenschrank		Ehret, Emmendingen

Tabelle 1: Arbeitsgeräte für die Versuchsdurchführung.

Generikum	Handelsname	Hersteller	Dosierung
Kochsalzlösung	NaCl 0,9 % Fresenius	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg	
Heparin	Heparin-Rotex medica 5.000 IE/ml	FROTEX MEDICA GmbH, Trittau, Deutschland	
HES	6% Infusionslösung	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg	
Ölsäure	Oleic acid ≥ 99%	Sigma-Aldrich Co	0,2 mg/kg
Angiotensin-(1-7)	Angiotensin I/II-(1-7) trifluoracetate salt	Bachem Bubendorf, Schweiz	5 pmol/kg/h
LN ₂	Flüssiger Stickstoff		
Formalin 4%	Formalin		
Pentobarbital	Narcoren®	Merial GmbH, Hallbergmoos	400 mg/kg

Tabelle 2: Substanzen für die Versuchsdurchführung.

	Handelsname	Hersteller
Trachealtubus Ratte	Überleitungsschlauch PVC für Spritzpumpen, Durchmesser 3 mm, auf 3,5 cm Länge gekürzt	Blocon GmbH, Mönchberg, Deutschland
Aortencclip Ratte	Biemer Clip, Force: 0,29-0,39 NN, REF FD 561 R	Aesculap AG & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Einmalspritze 50 ml für Perfusor	BD Plastipak, REF 300865	BD Drogheda, Levante, Spanien
Chirurgisches Nahtmaterial	6/0 Prolene, EH 7830H, Nadel 10 mm (TF-1), ½ c	Ethicon GmbH & CO KG, Norderstedt, Deutschland
Skalpell	Feather, Disposable Scalpel	
Kapillarröhrchen und Aufsätze	Multi Cap Kapillarröhrchen, 100 µl	Menzel GmbH & CO KG, Braunschweig, Deutschland
Einmalspritzen 2 ml		BD Drogheda, Levante, Spain
Injektionskanülen 30G	REF 304000	BD Drogheda, Levante, Spanien
Zwirnfäden, Länge 15 cm		handelsüblich
Ultraschallgel	Art.-Nr. 4260216470387	Alerion Health Care GmbH

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien für die Versuchsdurchführung.

3 Versuchsdurchführung

3.1 Vorbereitung

Vor Versuchsbeginn wurden die Druckabnehmer mit Hilfe des Druckeichmessgerätes zwei-Punkt-kalibriert. Die benötigten Substanzen wurden der Kühlung entnommen und nötigenfalls angemischt, die Katheterschläuche blasenfrei mit heparinierter NaCl-Lösung befüllt, das Operationsbesteck bereitgelegt und das Operationsmikroskop positioniert.

3.2 Anästhesie und Anästhesiekontrolle

Die Einleitung der Anästhesie erfolgte durch einmalige intramuskuläre Injektion einer Kombination aus Fentanyl (0,05 mg/kg), Medetomidin (0,5 mg/kg) und Midazolam (5 mg/kg)²³⁴. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde nach Implantierung des Venenkatheters fünfzig Prozent der Initialdosis pro Stunde zusammen mit der Flüssigkeitssubstituierung (NaCl) von insgesamt vier ml pro Stunde per intravenöser Dauerinfusion verabreicht.

Generikum	Handelsname	Hersteller	Konzentration	Dosierung
Medetomidin	Dormitor®	Pfizer GmbH, Karlsruhe	1 mg/ml	0,5 mg/kg
Midazolam	Dormicum®	Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz	5 mg/ml	5 mg/kg
Fentanyl	Fentanyl- Janssen®	Janssen GmbH, Neuss	0,05 mg/ml	0,05 mg/kg

Tabelle 4: Anästhetika.

Um ein Auskühlen des Tieres und damit verbundene unerwünschte Auswirkungen auf Herz-Kreislaufsystem und Metabolismus zu verhindern, wurde die Ratte sofort nach Eintreten der Narkosewirkung in Rückenlage auf eine Heizplatte verbracht und in dieser Position sicher fixiert. Die rektale Körpertemperatur wurde per digitaler Temperatursonde überwacht und die Heizplatte so eingestellt, dass ständig eine Körpertemperatur von 37,5°C bis 38°C sichergestellt war.

Das Erreichen des Toleranzstadiums und damit operationsfähiger Narkosetiefe wurde durch Ausfall des Zwischenzehenreflexes sichergestellt.

3.3 Operation

3.3.1 Operationsbesteck

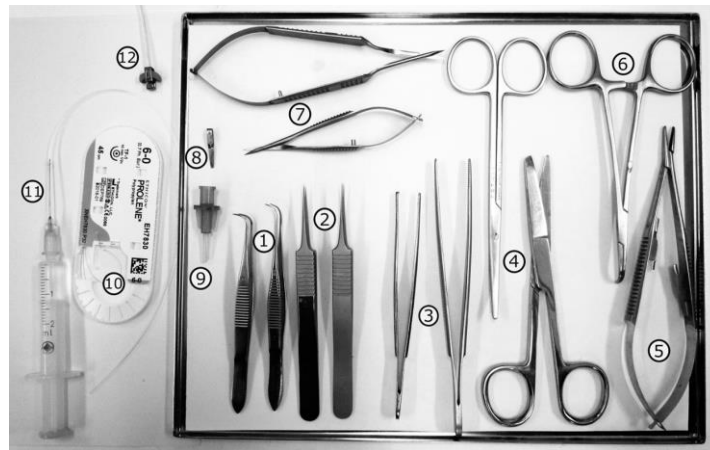


Abbildung 2: Operationsbesteck.

1. Mikropinzetten, gebogen; 2. Mikropinzetten, gerade; 3. anatomische und chirurgische Pinzette; 4. Scheren; 5. Nadelhalter; 6. Klemme, gebogen; 7. Sprungfederscheren für Trachea (groß) und Gefäß (klein); 8. Mikro-Gefäßclip; 9. Trachealtubus; 10. Nahtmaterial; 11. Spritze mit aufgesetztem Katheter; 12. Flussmesser

Nicht abgebildet: Arterienklemmen, gerade; Thoraxspreizer; Zwirnfäden

3.3.2 Tracheotomie und Beatmung

Mit einer anatomischen Pinzette wurde das Fell über dem Trigonum musculare, ventral am Hals etwa zwischen Kehlkopf und Schlüsselbein, angehoben und die Haut über dem für die Operation benötigten Bereich per Scherenschlag abgesetzt.

Nach Darstellung der Luftröhre wurde der Musculus sternohyoideus mit der gebogenen, spitzen Pinzette medial längs gespalten und die darunterliegende Trachea mit zwei zirka 15 Zentimeter langen Fäden unterführt. So konnte mittels einer leichten Spannung nach vorn die Luftröhre zunächst fixiert und anschließend beide Fäden zur Sicherung des Trachealtubus verwandt werden.

Mit einer Sprungfederschere wurde eine interkartilaginäre Öffnung geschaffen, um den Trachealtubus einzuführen, vorzuschieben und zu fixieren, um das Beatmungsgerät anzuschließen.

In Tabelle 5 werden die Einstellungen für die maschinelle Ventilation dargestellt, die mit einem Spitzenbeatmungsdruck von 140 mmH₂O (das entspricht etwa 10,3 mmHg), 65 Atemzügen pro Minute, einem Inspirations-Expirationsverhältnis von 3:1, einer Plateauphase von fünf Prozent und einem positiv endexpiratorischen Druck (PEEP) von drei Zentimetern auf der Wassersäule mit Raumluft durchgeführt wurde.

Atemzüge/min	65
Spitzendruck	140 mmH ₂ O
PEEP	30 mm H ₂ O
Inspiration : Expiration	1 : 3
Plateau	5 %
FiO ₂	0,21

Tabelle 5: Einstellungen am Beatmungsgerät.

3.3.3 Halspräparation

Die rechte Vena jugularis externa wurde freipräpariert und zwei Fäden unterführt, um eine kraniale Ligatur und eine offene Ligatur kaudal zu legen. Die Kanülierung der Vene erfolgte unter dem Operationsmikroskop bei zehnfacher Vergrößerung. Nach Anlegen einer leichten Spannung auf das Gefäß durch Fixierung des Fadens der kranialen Ligatur mit einem Klebestreifen auf der Unterlage wurde die Vene mit einer Sprungfederschere eröffnet und der NaCl-gefüllte Polyethylenkatheter mit aufgesetzter, Kochsalzlösung enthaltender 2 ml Spritze zirka 0,5 cm weit eingebracht. In dieser Position wurde der Katheter mit den Fäden fixiert, der korrekte Sitz durch widerstandsfrei mögliche Injektion einer kleinen Menge Kochsalzlösung ins Gefäß sichergestellt und die Infusionspumpe angeschlossen und in Betrieb genommen.

Zur Erhaltung der Narkose und zur Flüssigkeitssubstitution wurde ein Volumen von vier ml pro Stunde der 1:2 verdünnten Narkoselösung kontinuierlich infundiert.

Zur Katheterisierung der Halsarterie wurde die linke Arteria carotis communis durch stumpfe Präparation in die Tiefe in der gemeinsamen bindegewebigen Gefäß-Nerven-Scheide mit dem Nervus vagus und der Vena jugularis interna freigelegt und unter größter Vorsicht separiert.

Die Kanülierung erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie die der Vene, jedoch musste vor Eröffnung des Gefäßes der arterielle Blutfluss mittels des Aortenclips reversibel unterbrochen werden. Nach Verschieben des Katheters in Herzrichtung wurde er fixiert, der korrekte und sichere Sitz überprüft, der Clip entfernt und der Katheter an den Druckabnehmer angeschlossen. Zur Verhinderung von Thrombosierungen beim Aufstieg von Blut enthielt der arterielle Katheter eine einprozentige Heparin-Kochsalzlösung. Über diesen Katheter erfolgten während des Versuches die kontinuierliche Überwachung des arteriellen Blutdrucks sowie die arteriellen Blutabnahmen. Anschließend wurde auch die Vena jugularis sinister entsprechend kanüliert und an den Druckabnehmer zur Darstellung des zentralvenösen Druckes (ZVD) angeschlossen.

3.3.4 Thorakotomie und Messung der zentralen Hämodynamik

In der Medianen des Thorax wurde mit einer geraden Schere ein schmaler Fellstreifen abgesetzt und mit dem Skalpell die Muskulatur bis auf das knöcherne Brustbein durchtrennt. Der Schaufelknorpel wurde mit der anatomischen Pinzette emporgezogen und direkt darunter durch stumpfe Penetration des Zwerchfells mit der Klemme ein kleiner Zugang zur Brusthöhle geschaffen. Diesen Zugang nutzend wurde unter maximal möglicher Anhebung des Brustbeines eine streng mediane Sternotomie mit einer geraden, scharfen Schere bis zur Clavicula durchgeführt. Die Lungen durften auf keinen Fall berührt werden, und eventuell auftretende Blutungen in der Brustwand wurden durch punktuelle Hitzeverödung mit Hilfe des Thermokauters umgehend zum Stillstand gebracht. Schließlich wurde vorsichtig der Rippenspreizer eingelegt und so weit wie notwendig geöffnet, um einen operativen Zugang zum Herzen und Aorta ascendens zu gewährleisten. Die serösen Häute des Mediastinums und

des Herzbeutels wurden mit Pinzette und Wattestäbchen vorsichtig entfernt, wieder, ohne die empfindlichen Lungen zu berühren und damit zu verletzen. Der paarige Thymus wurde behutsam durch Auseinanderziehen geteilt und der rechte Thymuslappen abgebunden und per Scherenschlag entfernt, um die Aorta frei zugänglich zu machen.

Zur Messung des Herzminutenvolumens wurde ein Ultraschallflussmesskopf um die herznahe Aorta ascendens angelegt. Behutsam wurde das Gefäß auf einer Länge von einem Zentimeter freipräpariert, unter strikter Schonung der umliegenden nervalen Strukturen und in Belassung in seiner physiologischen Lage, um mechanische Auswirkungen auf das Herz-Kreislaufsystem zu vermeiden. Zur Optimierung der Signalübertragung wurde der Messkopf zunächst mit Ultraschallgel benetzt, dann das Gefäß darin eingehakt und der Schiebeverschluss des Messkopfes geschlossen. Das Kabel wurde in seinem Verlauf mittels Klebestreifen im Fell der Ratte und auf der Heizplatte fixiert, um einen schwebenden und zugfreien Sitz beizubehalten und ein versehentliches Spannen des Kabels zu verhindern. Bei Übertragungsschwierigkeiten konnte mit Zugabe weiterer blasenfreier Gelflüssigkeit Abhilfe geschaffen werden.

Zur intrakardialen Messung des pulmoarteriellen Druckes (PAD) wurde im Epikard der rechten Herzkammer eine Tabaksbeutelnaht vorgelegt und anschließend mit einem spitz zugeschnittenen, mit einer einprozentigen NaCl-Heparinlösung blasenfrei gefüllten Polyethylenkatheter der Herzmuskel durchstoßen. Der Katheter wurde vorsichtig bis in die Abzweigung der Arteria pulmonalis vorgeschoben und mit dem Nahtmaterial sowie in seinem Verlauf durch Klebestreifen fixiert und an den Druckabnehmer angeschlossen.

Ein weiterer Katheter wurde durch das linke Herzohr im linken Vorhof platziert und mit dem Nahtmaterial in seiner Lage fixiert.

Die hämodynamischen Werte (mittlerer arterieller Blutdruck (AD), zentralvenöser Druck (ZVD), Herzminutenvolumen (Flow), pulmonalarterieller Druck (PAD) und linksatrialer Druck (LAD)) wurden über die Druckabnehmer registriert und die Signale mit Hilfe des Computerprogrammes DASYLab (National Instruments, Austin, USA) umgewandelt und kontinuierlich auf dem Monitor dargestellt, überwacht und zu den gegebenen Zeitpunkten per Mausclick gespeichert, um später den jeweiligen Mittelwert zu errechnen.

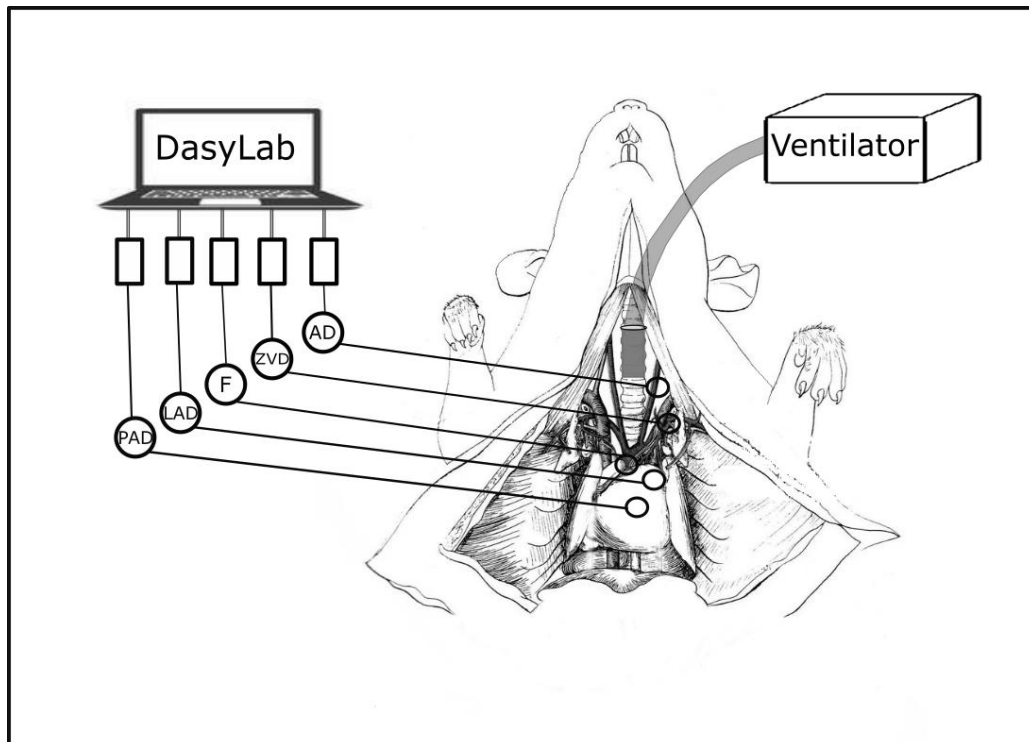


Abbildung 3: Operationssitus.

Messung hämodynamischer Parameter mittels Katheter, Druckwandler und Software, maschinelle Beatmung (im Bild sind die Lungenflügel kollabiert).

PAD = pulmonalarterieller Druck, LAD = linksatrialer Druck, F = Flow, Herzminutenvolumen, ZVD = zentralvenöser Druck, AD = arterieller Blutdruck.

3.4 Versuchsablauf

3.4.1 Versuchsgruppen

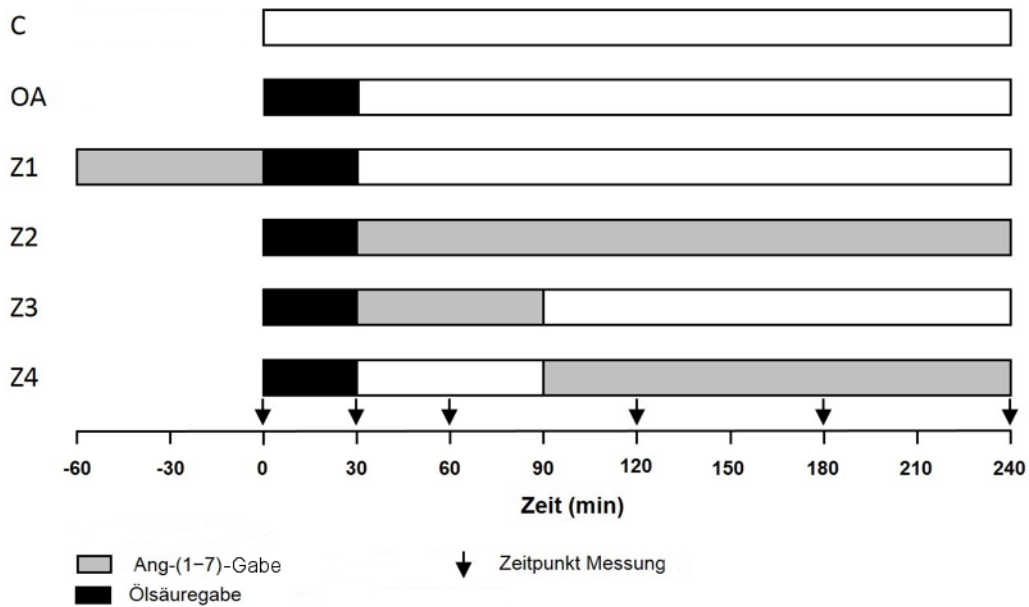


Abbildung 4: Zeitschiene des Versuchsablaufes.

Die Gabe von Ölsäure erfolgte jeweils über dreißig Minuten (schwarz gekennzeichnet). Die Intervention mit Ang-(1-7) begann zu unterschiedlichen Zeitpunkten und erfolgte über unterschiedliche Zeitspannen. Die Zeitpunkte der Erfassung der hämodynamischen Parameter und der Blutgase sind durch Pfeile gekennzeichnet.

C = Kontrollgruppe, OA = Ölsäuregruppe, Z1-4 = Behandlungsgruppen

Die Experimente wurden in sechs annähernd gleich großen Gruppen durchgeführt:

1. Kontrollgruppe (**C**)
Nach erfolgter Präparation wurde weder Ölsäure noch Ang-(1-7) verabreicht. n = 9.
2. Schadensgruppe (**OA**)
Es wurde ein akuter Lungenschaden durch Ölsäureinfusion ausgelöst (0,2 mg/kg, i.v. über 30 min). Anschließend wurde kein Ang-(1-7) verabreicht. n = 10.
3. Zeitversuch 1 (**Z1**): Präkonditionierung
Eine Infusion von Ang-(1-7) erfolge sofort nach der Operation über einen Zeitraum von 60 Minuten (Minuten -60 bis 0) vor der ersten Messung. Die Schadensinduktion durch Ölsäure fand anschließend wie bei den anderen Gruppen in den ersten 30 Minuten statt. n = 9.
4. Zeitversuch 2 (**Z2**): Kontinuierliche Gabe über gesamten Versuch
Nach Ölsäuregabe über die ersten 30 Minuten des Versuches wurde ab der 30. Minute bis zum Versuchsende in der 240. Minute Ang-(1-7) infundiert. n = 11.
5. Zeitversuch 3 (**Z3**): Kurze Gabe
Nach Ölsäuregabe wurde ab der 30. Minute bis zur 90. Minute Ang-(1-7) infundiert. n = 11.
6. Zeitversuch 4 (**Z4**): Spät einsetzende Gabe
Nach Ölsäuregabe wurde ab der 90. Minute bis zum Versuchsende in der 240. Minute Ang-(1-7) infundiert. n = 10.

3.4.2 Experimentelles Protokoll

t = 0	Hämodynamik
	Blutgase
	Ölsäure (über 30 min) (alle Gruppen außer C)
t = 30	Hämodynamik
	Blutgase
t = 60	Hämodynamik
	Blutgase
t = 120	Hämodynamik
	Blutgase
t = 180	Hämodynamik
	Blutgase
t = 240	Hämodynamik
	Blutgase
	BAL: TNF- α , Gesamtprotein
	Lunge, rechter Vorderlappen: MPO
	Lunge, rechter Mittel- und Unterlappen: Feucht-Trockengewicht
	Lunge, linke: ACE, ACE2-Aktivität

Tabelle 6: Versuchsprotokoll. *t = Versuchsminute.*

Nach Beendigung der Operation und fünf Minuten Wartezeit zur Erholung vom Operationsstress ($t = 0$) wurden die initialen Messungen der Ausgangswerte der hämodynamischen Parameter vorgenommen (mit Ausnahme der Gruppe Z1, hier wurde zunächst über sechzig Minuten Ang-(1-7) infundiert, wie im Protokoll beschrieben).

Aus den hämodynamischen Messwerten wurde der pulmonovaskuläre Perfusionswiderstand (PVR) ermittelt, der sich nach der unten dargestellten Formel errechnet und in der Druckeinheit $\text{dynes}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$ wiedergegeben wird.

$$PVR = \frac{PAD - LAD}{Flow} \times 80$$

Abbildung 5: Formel zur Berechnung des pulmonalvaskulären Gefäßwiderstandes.

PVR = pulmonalvaskulärer Widerstand, PAD = pulmonalarterieller Blutdruck, LAD = linker Vorhofdruck, Flow = Herzzeitvolumen, 80 = Umrechnungsfaktor von mmHg in $\text{dynes}\cdot\text{s}\cdot\text{cm}^{-5}$.

Zur Messung der Blutgase (paO_2 , paCO_2) wurde 0,1 ml arterielles Blut in ein Kapillarröhrchen eingelassen, die Enden zunächst luftdicht mit einem Pfropfen abgeschlossen und es unverzüglich dem Blutgasmessgerät zugeführt.

Die Initiierung eines Lungenschadens erfolgte durch langsame, fraktionierte intravenöse Gabe von Ölsäure (0,2 mg/kg Körpergewicht), suspendiert in einer 0,1-prozentigen Lösung bovines Serum-Albumins, über einen Zeitraum von dreißig Minuten.

Für die therapeutische Gabe wurde das pulverförmige Ang-(1-7) in physiologischer Kochsalzlösung dissoziiert, in Aliquots aufgeteilt, bei -80°C aufbewahrt und bei Bedarf kurzfristig einzeln aufgetaut.

Nach einer weiteren Verdünnung mit NaCl auf 3,5 ml Volumen wurde es in einer Dosierung von 50 pmol/kg/min per Infusator über den Venenkatheter verabreicht (0,5 ml/h). Die Gabe reiner Kochsalzlösung zur Flüssigkeitssubstitution wurde dem entsprechend verringert.

Die Messungen zur Hämodynamik und des Blutgases wurden zu den Zeitpunkten 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten nach Beginn des Experimentes wiederholt.

Nach dem Versuchsablauf von 240 Minuten wurde zusätzlich 1 ml arterielles Blut entnommen und zentrifugiert, um das Plasma bis zur Weiterverarbeitung zu verwahren.

Die Tötung des narkotisierten Tieres erfolgte durch eine intravenöse Sturzinjektion einer Überdosis Pentobarbital in Form von 2 ml Narcoren®.

Anschließend wurde eine bronchoalveoläre Lavage (BAL) der linken Lunge durchgeführt. Die rechte Lunge wurde zunächst mit einem Faden im Bereich ihrer Hili ligiert. Dann wurde die noch zugängliche linke Lunge mit je 2,5 ml physiologischer Kochsalzlösung aus zwei Einzelspritzen über den Tubus gespült. Hierzu wurde die Flüssigkeit langsam durch den Trachealtubus instilliert und wieder sanft in die Spritze rückaspiriert, drei Mal je Spritze. Die Gesamtmenge des Aspirats (Recovery) wurde notiert – für eine korrekte Messung wurde eine Rückholmengung von mindestens sechzig Prozent als notwendige Voraussetzung definiert -, in ein steriles Plastikröhrchen verbracht und durch vorsichtiges Schwenken vermischt. Der durch Zentrifugation (4°C, 800 G, 10 min) gewonnene Überstand wurde in zwei gleich großen Portionen schockgefroren und bei -80°C verwahrt, um später den Gehalt an Gesamtprotein zu ermitteln.

Die lavagierte Lunge wurde auf drei Eppendorfgefäße verteilt und nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -80°C aufbewahrt, um zur späteren Ermittlung der Aktivität von ACE und ACE2 im Labor von Professor Thomas Walther am University College in Cork, Irland verwendet zu werden.

Der rechte vordere Lungenlappen wurde zur späteren Bestimmung der Aktivität der Myeloperoxidase in drei Portionen zu etwa 150 mg eingewogen, schockgefroren und ebenfalls bei -80 °C verwahrt.

Der verbleibende Anteil der rechten Lunge wurde unverzüglich zur Ermittlung des Feucht-Trockengewicht-Verhältnisses verwendet.

3.5 Verarbeitung und Auswertung der Proben

3.5.1 Myeloperoxidase-Aktivitätsmessung

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
pH-Meter	CyberScan pH 510	Eutech Instruments Pte Ltd.
Magnetrührer und Wärmeplatte	IKA-combimag, Typ RCT	IKA®-Werke, Staufen, Deutschland
Dispergierer	T 18 digital ULTRA-TURRAX®	IKA®-Werke, Staufen, Deutschland
Ultraschall-Homogenisierer	Sonifier Cell Disrupter B-12 & Sonifier Converter	Branson sonic power company, Danbury, USA
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
ELISA Reader		Tecan Spectra, Männedorf, Schweiz
96-well-Platten		Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
8-Kanal-Pipette	Reference® 2, Mehrkanal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipette	Research® plus, 1-Kanal, fix	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Computer, Software Magellan	Magellan™ - Data Analysis Software	Tecan Group Ltd., Schweiz

Tabelle 7: Geräte für die Messung der Myeloperoxidaseaktivität.

Formel /Abkürzung	Handelsname	Hersteller
K_2HPO_4	di-Kaliumhydrogenphosphat, wasserfrei	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
NEM	N-Ethylmaleimid, Nr. E1271	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
HTAB	0,5% hexa-1,6-bis-decyltrimethylammoniumbromid, Nr. H9151	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
TMB	3,3'-5,5'-tetramethylbenzidin, Nr. T2885	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
DMSO	Dimethyl-sulfoxid, Nr. D5879	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
Na_2HPO_4	di-Natriumhydrogenphosphat, wasserfrei	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Reinstwasser		Biochrom AG Deutschland
H_2SO_4	Schwefelsäure, 2 M	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
HRP	Horse radish peroxidase, 100U/mg, Nr. 77330	Sigma-Aldrich Co., Steinheim, Deutschland
H_2O_2	Wasserstoffperoxid, 30%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LN_2	flüssiger Stickstoff	

Tabelle 8: Substanzen für die Messung der Myeloperoxidaseaktivität.

Zum Nachweis der Aktivität des Enzyms Myeloperoxidase als Indikator der Infiltration neutrophiler Granulozyten ins Gewebe wurde ein durch Kuebler et al. verbessertes Verfahren²³⁵ angewendet.

Zur Freisetzung der Myeloperoxidase aus den Zellorganellen mussten die Gewebe und Zellen der Proben zunächst schrittweise aufgeschlossen werden. Hierfür wurden die Gewebestücke schonend auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 2 ml Pufferlösung (0,02-molarer Kaliumphosphatpuffer, pH 7,4 mit 0,626 mg NEM pro ml) mit Hilfe des Ultra-Turrax mechanisch homogenisiert. Nach Zentrifugation (40°C, 12000 G, 20 min) wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet mit HTAB-Puffer (1 ml 0,05-molarer Kaliumphosphatpuffer, pH 6,0 mit 5 mg HTAB pro ml) resuspendiert.

Nach der dreimaligen Prozedur von zehnkündigem Sonifizieren, Schockgefrieren und Auftauen wurde ein weiteres Mal zentrifugiert (4°C, 8000 G, 20 min). Der so gewonnene Überstand wurde wiederum bei -80 °C zwischengelagert.

Am Tag der Messung wurden zunächst Verdünnungsreihen der Proben bis zu einer Verdünnung von 1:32, sowie der Eichlösung aus Meerrettichperoxidase (Verdünnungen mit 25000 bis 1,95 mU/ml) je mit HTAB-Puffer hergestellt.

Im Computerprogramm Magellan (Tecan, Männedorf, Schweiz) mussten zunächst die Probanden (Versuchsnummer, Entnahmedatum und Gewicht des Lungenstückchens) in die ID-Liste eingepflegt werden. Für jede Probe wurde eine Doppelmessung vorgesehen.

Anschließend wurde eine 96-well-Mikropipettierplatte mit je 0,3 ml der Proben- und Standardverdünnungen beschickt. Zur Orientierung diente der Ausdruck der ID-Liste.

Der Start der Oxidationsreaktion wurde durch Zugabe einer frisch angesetzten Lösung aus gleichen Volumenanteilen H₂O₂ (Finalkonzentration 0,6 mM in 0,08M Natriumphosphatpuffer pH 5,4) und TMB (Finalkonzentration 1,6 mM in DMSO) eingeleitet, um die Mikropipettierplatte umgehend dem ELISA-Reader zuzuführen. Die Messungen des Farbumschlages von farblos nach blaugrün erfolgten minütlich bei 623 nm, und nach einem durch 0,3 ml Schwefelsäure (2M H₂SO₄) forcierten Reaktionsstopp exakt fünf Minuten nach Reaktionsstart noch eine finale Extinktionsmessung bei 450 nm.

Zur Auswertung wurden die Extinktionen der Finalmessung ausschließlich derjenigen Probenverdünnungen verwendet, deren Aktivitätskurve über die gesamten fünf Minuten der stattfindenden Reaktion einen linear ansteigenden Kurvenverlauf aufwies. Diese wurden mit den Extinktionen der Standardlösungen mit definiertem Peroxidasegehalt in Korrelation gebracht und anhand des Gewichtes der Gewebeprobe die Menge Myeloperoxidase pro Gramm Probe errechnet.

3.5.2 Bestimmung des Feucht-Trockengewicht-Verhältnisses der Lunge

Zur Evaluierung von extravaskulären Wassereinlagerungen in der Lunge wurde das Verhältnis ihres Feucht- zum Trockengewicht (wet-to-dry lung weight ratio) bestimmt. Unmittelbar nach Entnahme des Lungengewebes wurde es auf der Feinwaage gewichtsbestimmt und in einem Trockenschrank für vierundzwanzig Stunden einer Temperatur von 70°C ausgesetzt. Nach vollständiger Trocknung wurde es erneut gewogen und der Quotient der beiden Gewichte als Maß des Lungenwassergehaltes errechnet.

3.5.3 Messung des Gesamtproteingehaltes der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

	Bezeichnung	Hersteller
Protein Assay Kit	Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1 Nr. 500-0201	Bio-Rad Laboratories, Inc., USA
Küvetten für Spektrophotometer	REF 67.742	Sarstedt AG & Co. KG
Spektrophotometer	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences Corp, Schweiz
Multipette	Research® plus, 1-Kanal, fix	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Reinstwasser	Aqua bidest	

Tabelle 9: Materialien und Substanzen für die Messung des Gesamtproteingehaltes der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.

Die Messung des Gesamtproteingehaltes der Lavageflüssigkeit erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen "Quick Start Bradford Protein assay" (Bio-Rad, Hercules, USA) nach dem Prinzip der von Bradford entwickelten Methode²³⁶.

Zunächst wurde zur Erstellung einer Referenzkurve die Verdünnungsreihe des mitgelieferten Standards (Bovines Serum Albumin, BSA) mit bidestilliertem Wasser gemäß der Vorgabe hergestellt (2 mg Protein/ml bis 0,125 mg/ml), sowie Probenverdünnungen von 1:1, 1:2 und 1:4. Von jeder Verdünnung wurde eine Menge von 0,2 ml in ein zuvor beschriftetes Eppendorfgefäß gegeben. Zum Starten der Reaktion wurde mit Hilfe einer Multipette jeweils 1 ml Färbelösung (Dye Reagent) zugefügt und nach einer Inkubationszeit von mindestens fünf Minuten erfolgten die Messungen in einer Küvette mithilfe des Photometers. Zunächst wurde mit einer Wellenlänge von 595 nm der Leerwert gemessen (1 ml Dye Reagent mit 0,2 ml bidestilliertem Wasser) und dessen Absorption als Nullpunkt definiert. Dann wurden alle Standard- und Probenverdünnungen gemessen und die Ergebnisse notiert. Mit Hilfe der Extinktionen der definierten BSA-Lösungen wurde eine Standardkurve erstellt, anhand derer die für die jeweiligen Probenwerte gemessenen Extinktionen ein Proteingehalt zugeordnet werden konnte.

3.5.4 Messung von Tumornekrosefaktor-alpha in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die Bestimmung von TNF- α in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit wurde mit dem rattenspezifischen ELISA Kit der Firma Hölzel (Hölzel Diagnostika Handels GmbH, Köln, Deutschland) gemäß beiliegender Anleitung durchgeführt. Die Empfindlichkeit des Tests ist mit 15 pg/ml angegeben.

3.5.5 Messung der Aktivitäten von ACE2 und ACE

Die Messungen der Aktivitäten von ACE und ACE2 im Lungengewebe wurden extern durch die Arbeitsgruppe Thomas Walther im Labor des University College Cork in Irland durchgeführt.

Die bei -80°C gelagerten Proben wurden per Expresslieferung eisgekühlt transportiert und vor Ort bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

Nach Homogenisierung der Gewebeprobe wurde zunächst die Proteinkonzentration des Gewebes mittels eines gebrauchsfertigen Messkits (BCA protein assay kit, Thermo Fisher Scientific, Bonn) gemäß der Herstellerempfehlung evaluiert.

Zur Darstellung der ACE-Aktivität wurde der Probe das ACE-Substrat Hippuryl-Histidyl-Leucin-Hydrat (Hip-His-Leu) hinzugefügt, was durch das vorhandene aktive ACE zu Histidylleucin (His-Leu) umgewandelt wurde. Nach Zugabe von o-Phthalaldehyd als Indikator zu His-Leu wurde Fluoreszenzmessungen bei 365 (Exzitation) und 500 nm (Emission) vorgenommen. Das Ergebnis wurde in Relation zur Proteinkonzentration als nm His-Leu \cdot min \cdot 1 \cdot mg \cdot protein-1 dargestellt²³⁷.

Zur Messung der Aktivität des ACE2 wurde der Probe in DMSO gelöstes Mca-APK (Dnp) hinzugegeben, dies ist ein selektives, fluorogenes Substrat des ACE2. Das Ausmaß des Umsatzes des Substrates durch aktives ACE2 wurde per Fluoreszenzmessung bei einer Exzitation von 320 nm und einer Emission von 405 nm evaluiert und das Ergebnis ebenfalls in Relation zur Proteinkonzentration als nmol Mca-AP \cdot min-1 \cdot mg \cdot protein-1 angegeben¹⁴⁵.

3.5.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte gemäß den Empfehlungen für experimentelles Arbeiten von Curtis²³⁸ und unter Zuhilfenahme des Programmes SigmaStat (SigmaStat 3.10; Systat Software, San Jose, CA, USA). Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Zur Anwendung kam die Varianzanalyse ANOVA mit anschließendem Dunnett's Post-hoc-Test. Die Daten des Gehaltes von TNF- α in der BALF wurden aufgrund einer Varianzheterogenität in log 10 umgewandelt. Als Signifikanzwert wurde $p < 0,05$ festgelegt.

4 Ergebnisse

4.1 Relevante hämodynamische Messergebnisse

4.1.1 Arterieller Blutdruck

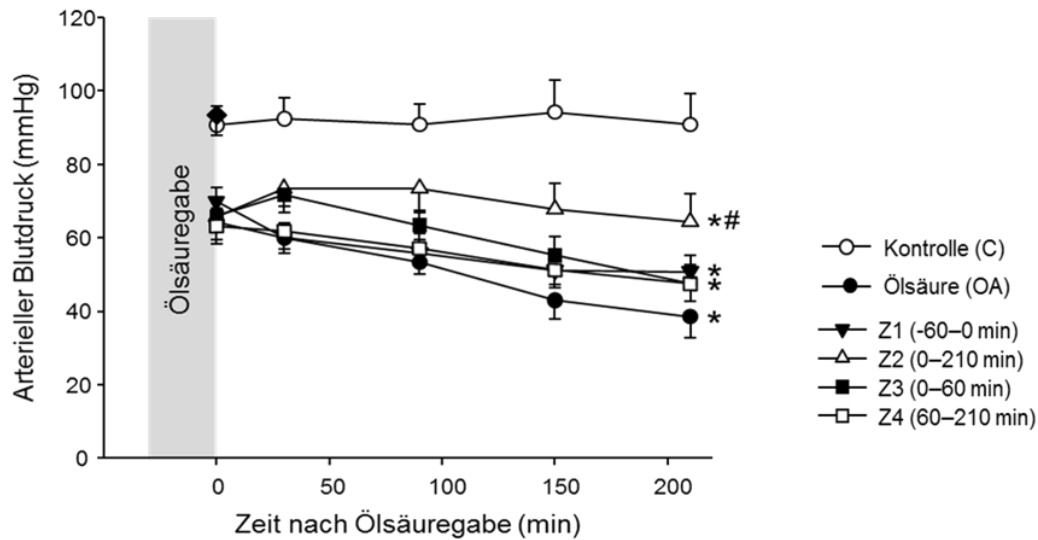


Abbildung 6: Verlauf des arteriellen Blutdrucks über den gesamten Zeitraum des Experiments. Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM); * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; # $p < 0,05$ vs. Ölsäuregruppe.

	AD (mmHg)	ZVD (mmHg)	PAD (mmHg)	LAD (mmHg)	Flow (ml/min)	PVR ($10^3 \cdot \text{dynes} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$)
C	90.8 \pm 8.5	3.0 \pm 0.6	11.6 \pm 1.8	2.1 \pm 0.2	36.1 \pm 3.9	23.6 \pm 3.8
OA	38.6 \pm 3.8*	2.4 \pm 0.3	13.3 \pm 1.5	1.6 \pm 0.2	16.2 \pm 2.7*	57.2 \pm 6.3*
Z1	50.8 \pm 4.4*	1.6 \pm 0.2	10.2 \pm 1.7	2.3 \pm 0.4	24.9 \pm 2.7#	23.3 \pm 3.4#
Z2	64.3 \pm 7.7*#	2.2 \pm 0.5	9.9 \pm 1.9	1.7 \pm 0.3	28.9 \pm 3.0#	21.1 \pm 3.0#
Z3	47.6 \pm 4.9*	1.9 \pm 0.2	11.1 \pm 1.9	2.2 \pm 0.2	21.7 \pm 2.6	33.8 \pm 3.6
Z4	47.5 \pm 4.7*	1.7 \pm 0.2	12.8 \pm 2.1	1.7 \pm 0.3	22.1 \pm 2.5	38.9 \pm 5.9*

Tabelle 10: Hämodynamische Werte nach 240 Minuten des Experiments.

AD = mittlerer arterieller Blutdruck, ZVD = zentralvenöser Druck, PAD = pulmonalvaskulärer Druck, Flow = Herzminutenvolumen, PVR = pulmonalvaskulärer Widerstand.

Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM); * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; # $p < 0,05$ vs. Ölsäuregruppe.

Die Ausgangswerte des arteriellen Blutdrucks (AD) zu Beginn des Experimentes lagen im Bereich zwischen $93,4 \pm 5,5$ (Z3) und $98,4 \pm 8,3$ (C) mmHg, mit Ausnahme derer der vorbehandelten Gruppe (Z1), deren AD mit $74,3 \pm 3,4$ mmHg niedriger lag (nicht grafisch dargestellt).

Die mit Ölsäure behandelten Gruppen wiesen bei der ersten Messung nach dreißig Minuten einen vergleichbaren Blutdruckabfall auf. Über den gesamten Versuchszeitraum von 240 Minuten war der bedeutendste Abfall des arteriellen Blutdrucks bei der Ölsäure-Schadensgruppe zu registrieren. Hier kam es zu einem kontinuierlichen Abfall um etwa sechzig Prozent auf einen Wert von $38,6 \pm 5,8$ mmHg.

Bei der Kontrollgruppe kam es in den ersten dreißig Minuten zu einem Blutdruckabfall von zirka acht Prozent, danach blieb der Wert stabil.

Die vortherafierte Versuchsgruppe (Z1) erfuhr einen kontinuierlich langsam fortschreitenden AD-Abfall um 31,6 Prozent gegenüber des Ausgangswertes. Der Wert nach der dreißigminütigen Ölsäuregabe lag jedoch geringgradig höher als bei den anderen Gruppen, die Ölsäure verabreicht bekommen hatten.

Bei der Gruppe Z2 blieb der Blutdruck stabil, nachdem er durch die Ölsäuregabe um zirka ein Drittel des Basalwertes abgesunken war. Nach 240 Minuten lag der Wert signifikant höher als der der Schadensgruppe.

Während der einstündigen Gabe von Ang-(1-7) bei der Gruppe Z3 ähnelte der Blutdruck dem der Gruppe der kontinuierlichen Gabe (Z2). Nach Beendigung der Applikation kam es dann zu einem kontinuierlich fortschreitenden Blutdruckabfall bis zu einem Endwert um etwa fünfzig Prozent niedriger gegenüber dem Ausgangswert.

Auch Gruppe Z4 erfuhr einen Blutdruckabfall um etwa fünfzig Prozent über den gesamten Zeitraum. Dabei entsprachen die Werte vor der Gabe von Ang-(1-7) etwa denen der Schadensgruppe. Nach Beginn der Gabe verlangsamte sich der Blutdruckabfall.

Demnach induzierte Ölsäure einen progradienten Abfall des AD, der durch kontinuierliche Infusion von Ang-(1-7) vermindert werden konnte, nicht jedoch bei eines der anderen angewandten Applikationsschemata.

4.1.2 Pulmovaskulärer Gefäßwiderstand

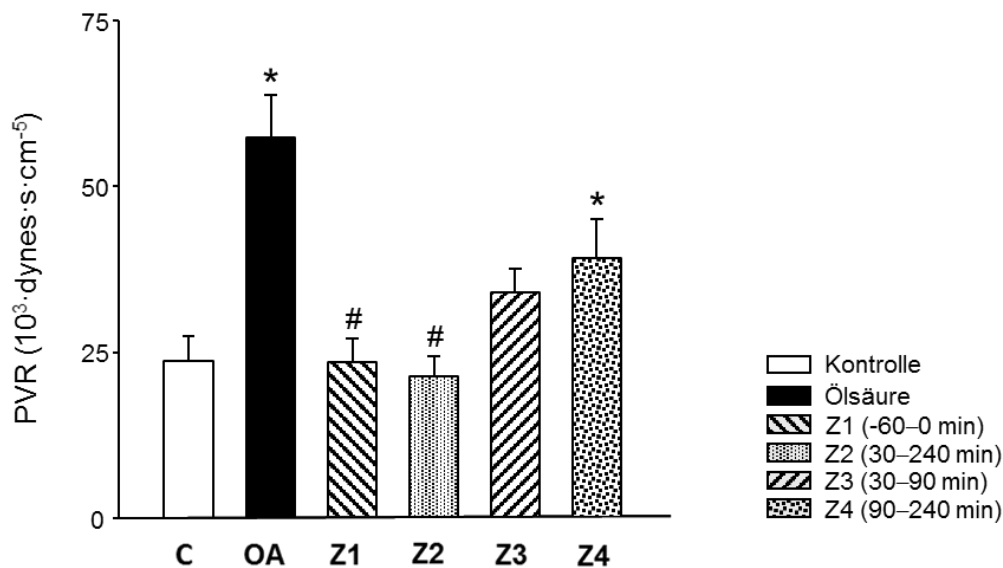


Abbildung 7: Pulmovaskulärer Gefäßwiderstand.

Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM); * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe; # $p < 0,05$ vs. Ölsäuregruppe.

Der pulmovaskuläre Gefäßwiderstand (PVR) errechnet sich aus den einzelnen Ergebniswerten von LVD, Flow und PAD mit Hilfe der in Abbildung 5 angegebenen Formel und wird in dynes·s·cm⁵ angegeben.

Bei der Schadensgruppe war 240 Minuten nach Versuchsbeginn ein gegenüber der Kontrollgruppe deutlich erhöhter pulmonalvaskulärer Widerstand zu verzeichnen. Auch in der späten Behandlungsgruppe Z4 erhöhte sich der Gefäßwiderstand signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Werte des PVR der Gruppen Z1 und Z2 entsprachen hingegen nahezu denen der Kontrollgruppe und lagen damit signifikant niedriger als die der Schadensgruppe.

Der Widerstand war bei der Gruppe Z3 im Gegensatz zu C erhöht, lag jedoch deutlich niedriger als bei OA. Signifikante Unterschiede wurden gegenüber keiner anderen Gruppe nachgewiesen.

4.2 Ergebnisse Blutgase

4.2.1 Sauerstoffpartialdruck

Der arterielle Sauerstoffpartialdruck (paO_2) lag bei sämtlichen Messungen in allen Versuchsgruppen im geringfügig hypoxischen Bereich zwischen 75 und 95 mmHg. Der physiologische Wert liegt um 100 mmHg²³⁹. Die Werte der Kontrollgruppe entwickelten sich von 78 ± 9 nach $89,2 \pm 9,1$ mmHg, die der Schadensgruppe von $89,64 \pm 4,2$ nach $93,97 \pm 8,8$ mmHg. Bei den Behandlungsgruppen kam es, mit Ausnahme der Gruppe Z3, zu einem leichten Abfall des AD über die Versuchsdauer von vier Stunden: Z1 von $92,1 \pm 4,6$ auf $76,3 \pm 7$, Z2 von $93,6 \pm 3,8$ auf $74,3 \pm 8,7$, Z3 von $86 \pm 4,9$ auf 88 ± 6 und Z4 von $83,5 \pm 4,9$ auf $77,9 \pm 12,6$ mmHg. Bei einer insgesamt leicht hypoxischen Sauerstofflage kam es zu geringen Schwankungen über die Dauer des Versuches ohne signifikante Bedeutung.

4.2.2 Kohlendioxidpartialdruck

Der Kohlendioxidpartialdruck im arteriellen Blut (paCO_2) lag bei allen Versuchsgruppen im Bereich des Normwert von 32 bis 46 mmHg²⁴⁰ oder leicht darunter. Bei der Kontrollgruppe entwickelte sich der paCO_2 von $35,9 \pm 4,9$ mmHg zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns hin zu einem Wert von $32,2 \pm 3,5$ mmHg zum Versuchsende. Bei der Schadensgruppe entwickelte sich der paCO_2 von $31,9 \pm 2,1$ mmHg zu $33,3 \pm 4$ mmHg. Auch bei den Behandlungsgruppen kam es außer bei Z2 zu keinen bedeutenden Schwankungen des paCO_2 : Z1 $26,6 \pm 2,6$ nach $32,7 \pm 4$, Z2 von $28,1 \pm 1,2$ nach $37,9 \pm 5,3$, Z3 von $29,3 \pm 4,3$ nach $25,9 \pm 3,5$, Z4 von $31,6 \pm 2,9$ nach $31,9 \pm 5,2$. Somit ruft weder die Schadensinduktion noch eines der Behandlungsschemata signifikante Abweichungen vom Ausgangswert des paCO_2 aus.

4.3 Ergebnisse Entzündungsparameter

4.3.1 Myeloperoxidase-Aktivität

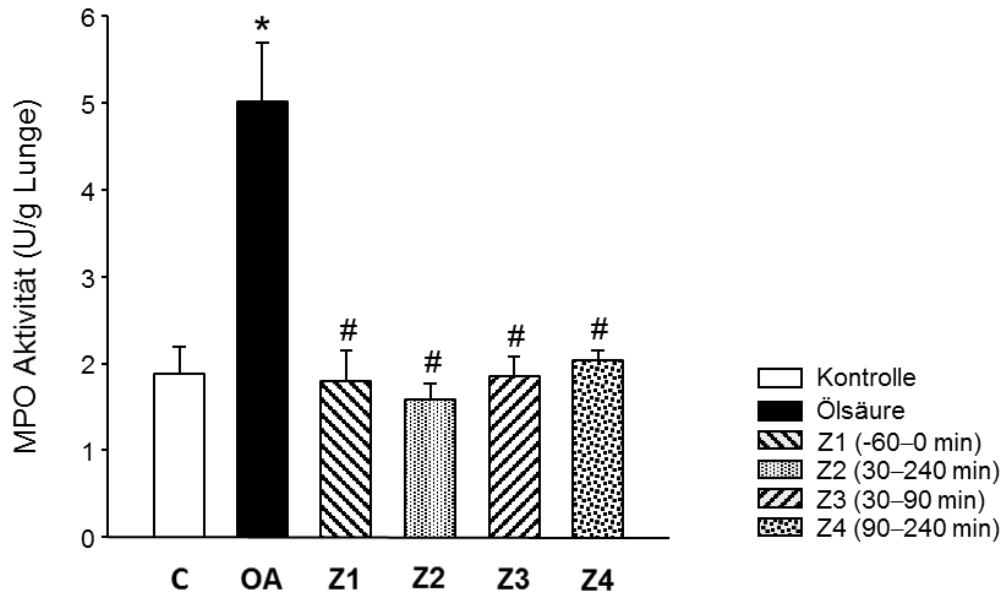


Abbildung 8: Aktivität der Myeloperoxidase im Lungengewebe.

Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM); * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ vs. Ölsäuregruppe.

Die Aktivität der Myeloperoxidase im Gewebe der Lunge war bei der mit Ölsäure behandelten Schadensgruppe im Gegensatz zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant auf etwa 270 Prozent erhöht. Die vier Behandlungsgruppen wiesen ähnlich niedrige Gehalte an MPO wie die Kontrollgruppe auf, und lagen damit signifikant niedriger als die Werte der Ölsäuregruppe. Somit konnte die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Lunge nach Ölsäuregabe durch alle vier Therapieregimes weitgehend verhindert werden.

4.3.2 Feucht-Trockengewicht-Verhältnis der Lunge

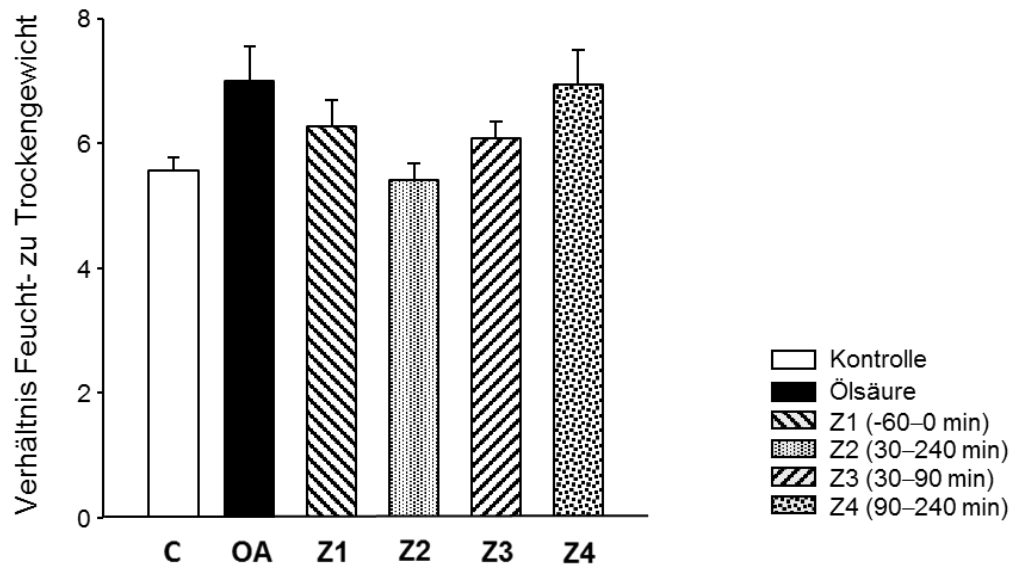


Abbildung 9: Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Lungengewebes.

Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM).

Das Verhältnis von Feucht- zu Trockengewicht des Lungengewebes lag bei der Ölsäuregruppe (OA) deutlich höher als das der Kontrollgruppe (C). Aufgrund unterschiedlicher Varianzen wurden bei diesen Ergebnissen keine weiteren Post-hoc-Signifikanztests durchgeführt.

Das niedrigste Verhältnis kam bei der durchgehend behandelten Therapiegruppe Z2 vor. Sowohl Z2, als auch Z3 und Z1 wiesen einen erkennbaren Trend zu einer geringeren Ödembildung gegenüber der Schadensgruppe auf. Z1 und Z3 lagen mit ihren Werten ziemlich genau zwischen der Kontroll- und Schadensgruppe. Die Gruppe Z4 hingegen wies einen kaum geringeren Wert als die Schadensgruppe auf.

Somit war eine Dauerbehandlung im Tierversuch in der Lage, die Entstehung eines Lungenödems komplett zu unterbinden. Auch die Kurzzeit- und die Vorbehandlung konnten einen Teileffekt erzielen.

4.3.3 Gesamtproteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

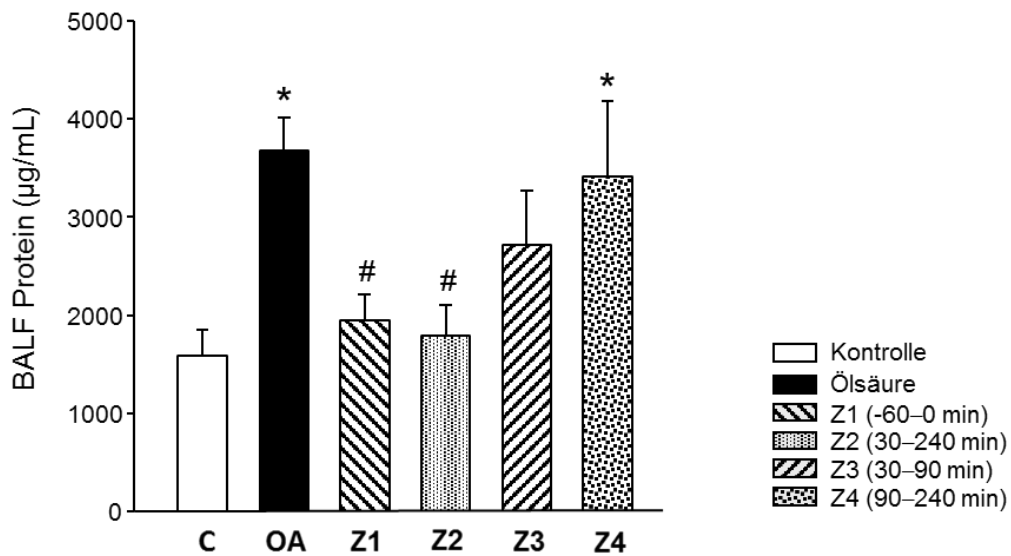


Abbildung 10: Gesamtproteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.
 Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM); * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ vs. Ölsäuregruppe.

Die Gesamtproteinkonzentration der Lavageflüssigkeit war bei der Schadensgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht.

Die Konzentrationen der Versuchsgruppen Z1 und Z2 wiederum waren im Vergleich zur Schadensgruppe signifikant vermindert. Dabei wies die Gruppe Z2 eine geringgradig höhere Proteinkonzentration als die Kontrollgruppe auf. Die Gesamtproteinkonzentration bei Z3 zeigte sich tendenziell niedriger als die der Schadensgruppe und lag etwa zwischen der Schadens- und der Kontrollgruppe. Die Gruppe der später einsetzenden Therapie lag mit ihrer Proteinkonzentration nur leicht unter der Schadensgruppe.

Die Veränderungen spiegeln die zuvor gezeigte Entwicklung im Verhältnis vom Feucht- zum Trockengewicht wider, die Unterschiede erreichen allerdings aufgrund der hier möglichen Post-hoc-Analyse das Signifikanzniveau.

4.3.4 Konzentration von TNF- α in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

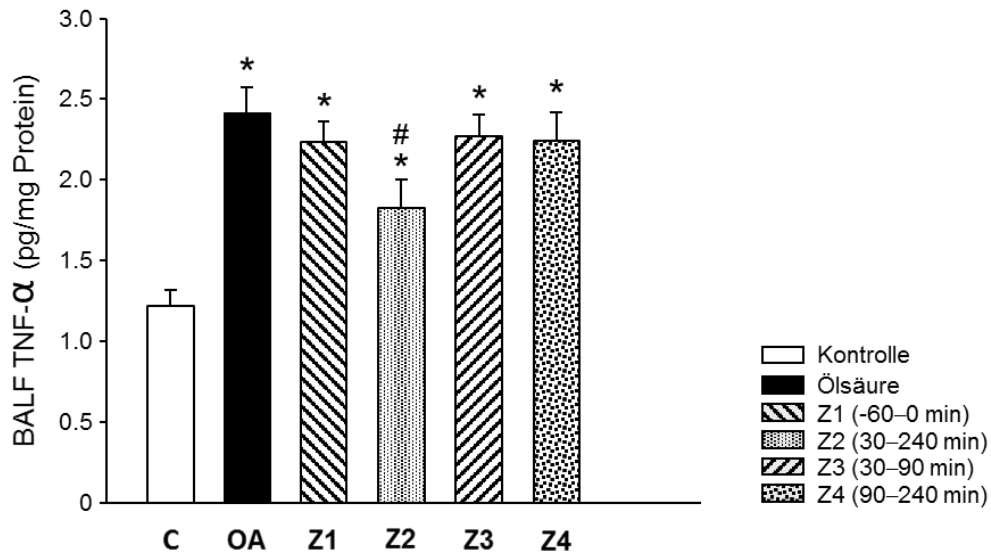


Abbildung 11: Konzentration von Tumornekrosefaktor- α in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit.

Daten wurden Log 10 transformiert aufgrund von Heteroskedastizität und dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM); * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ vs. Ölsäuregruppe.

In der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit der Kontrollgruppe wurde eine signifikant geringere Konzentration von TNF- α gegenüber den übrigen Versuchsgruppen nachgewiesen. In der Schadensgruppe war die Konzentration von TNF- α drastisch angestiegen auf Werte, die sich um das 19-fache der Kontrollgruppe bewegten.

Statistisch signifikant niedrigere Werte gegenüber der Schadensgruppe kamen lediglich bei Z2 zustande. Bei den anderen Versuchsgruppen zeichnete sich ein deutlicher Trend zu niedrigeren TNF- α -Konzentrationen in der BALF gegenüber der Schadensgruppe ab, jedoch ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Von diesen Gruppen wies Z1 den niedrigsten Wert auf.

Das Konzept einer prompt einsetzenden und kontinuierlichen Therapie zeigte sich auch hier den anderen untersuchten Behandlungsschemata gegenüber überlegen, indem es die TNF- α -Konzentration signifikant verminderte.

4.4 Verhältnis der ACE2/ACE-Aktivität im Lungengewebe

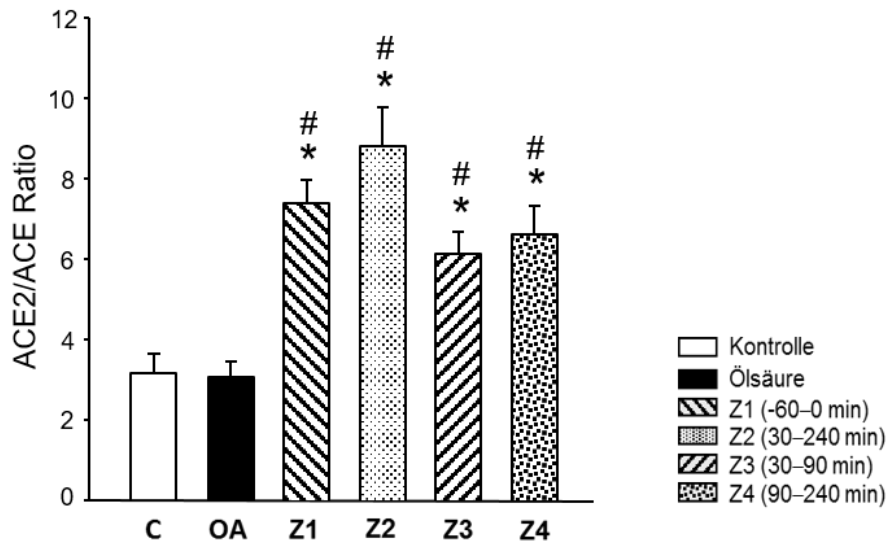


Abbildung 12: Verhältnis der ACE2/ACE-Aktivität.

Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM); * $p < 0,05$ vs. Kontrollgruppe, # $p < 0,05$ vs. Ölsäuregruppe.

Darstellung mit freundlicher Genehmigung von Professor Thomas Walther, Cork, Irland.

Zur Darstellung des Verhältnisses der Aktivität von ACE2 und ACE in der Lunge diente der Quotient aus ihren gemessenen Aktivitäten im Gewebe.

Gegenüber den mit Ang-(1-7) unbehandelten Gruppen ist das Verhältnis der ACE2/ACE-Aktivität bei allen Behandlungsgruppen signifikant erhöht.

Dies war bei der Dauerbehandlung (Z2) am deutlichsten ausgeprägt, bei der das Verhältnis auf das etwa dreifache anstieg. Auch die Vorbehandlung (Z1) erhöhte das Verhältnis der ACE2/ACE-Aktivität auf das etwa zweieinhalbfache. Auch die Behandlungsgruppe Z3 und Z4 wiesen immer noch eine Erhöhung um mehr als hundert Prozent auf.

Bei einer Behandlung mit Ang-(1-7) kam es zur Erhöhung der ACE2/ACE-Aktivitätsverhältnisses, das sich bei einer konstanten Applikation am deutlichsten ausgeprägte.

5 Diskussion

5.1 Modellkritik

5.1.1 Das Ölsäuremodell des akuten Lungenschadens

Das akute Atemnotsyndrom ist ein Resultat komplexer systemischer, multizellulärer Vorgänge auf eine zugrunde liegende Noxe, die selbst nicht in der Lunge situiert sein muss. Aus diesem Grunde stand zur Beantwortung der Fragestellung nach dem optimalen Zeitfenster für eine therapeutische Intervention mit Ang-(1-7) keine sinnvolle Alternative zu Versuchen am intakten Organismus zur Verfügung.

Die Entscheidung fiel auf das Modell der intravenösen Ölsäuregabe an Ratten, da es sich um ein etabliertes Modell zur Erzeugung eines ARDS handelt und damit eine gute Vergleichsmöglichkeit mit Ergebnissen anderer Forschungsgruppen weltweit gegeben ist^{241,242}. Dieses Modell erzeugt gut nachweisbar und verlässlich reproduzierbar die frühen Auswirkungen des ARDS, wie Permeabilitätsveränderungen, entzündliche Veränderungen der Lunge und Verschlechterung der Lungenmechanik^{100,242}.

Als Nachteil dieses Modells wird die Notwendigkeit der intravenösen Applikation gesehen, die gegenüber inhalierten Noxen (Lipopolysaccharide, Hyperoxie) einen höheren Grad an Invasivität darstellt und in kleineren Versuchstieren wie der Maus oder Ratte einen geschickten Operateur voraussetzt. Darüber hinaus vermag das Ölsäuremodell lediglich die Pathogenese eines Teils der Ursachen eines Lungenschadens direkt widerzuspiegeln. Zur Darstellung von Ätiologien wie Aspiration, Rauchvergiftung, Überbeatmung oder Sepsis werden üblicherweise andere etablierte Modelle bevorzugt.

Typischerweise führt die Gabe von Ölsäure nicht zu einer Verminderung des paO_2 ¹²⁸, was auch in dieser Arbeit bestätigt wurde. Dies steht im Gegensatz zur klinischen Definition des ARDS, die auf einem verminderten paO_2 beruht.

Das Versuchsprotokoll hatte sich in unserer Arbeitsgruppe bereits im Rahmen der Vorgängerstudie zur Beweisbringung der grundlegenden Erkenntnis über die Wirksamkeit von Ang-(1-7) gegen den Lungenschaden bewährt^{233,234}. Die vorliegende Studie sollte der direkten Vergleichbarkeit der Ergebnisse dienen, gemeinsame Veröffentlichungen ermöglichen und die bereits gewonnenen Erkenntnisse durch die Ermittlung des optimalen Applikationszeitfensters erweitern.

5.1.2 Narkose

Die Kombinationsnarkose aus Fentanyl (zur Analgesie und Sedation), Medetomidin (zur Sedation und Muskelrelaxation) und Midazolam (zur Sedation) gewährleistete eine kontinuierliche, zuverlässige Anästhesie über die Dauer des Versuches. Bereits in den Vorversuchen wurde eine hohe Dosierung²⁴³ vor allem des Opiats und potenten Analgetikums Fentanyl verwandt, um eine profunde Schmerzausschaltung während des invasiven Vorgangs des Eröffnens und Spreizens des Thorax zu gewährleisten. Mögliche unerwünschte Wirkungen dieser Narkose stellen vor allem eine moderate Atemdepression und eine Hypothermie dar. Beidem wurde durch die mechanische Ventilation und die exogene Zufuhr von Wärme entgegengewirkt.

5.1.3 Beatmung

Die künstliche Beatmung der Versuchstiere erfolgte mit Hilfe eines druckgesteuerten Kleintierrespirators unter Verwendung von Raumluft. Die Einstellungen wurden so gewählt, dass eine möglichst lungenschonende Beatmung mit niedrigen Spitzendrücken gewährleistet wurde, wie sie zur Behandlung von ARDS-Patienten empfohlen wird²⁴⁴. Eine zusätzliche Belastung des zarten Lungengewebes durch zu hohe Atemzugvolumina führt zur Überdehnung der Alveolen (Volutrauma)²⁴⁵ und muss vermieden werden. Der Beatmungsdruck soll laut Resümee des ARDS-Network bei Patienten einen Wert von 30 cm auf der Wassersäule nicht überschreiten, das Atemhubvolumen möglichst gering bei 6 ml pro Kilogramm idealem Körpergewicht gehalten werden^{88,246}. Bei der Umsetzung war außerdem zu beachten, dass bei den hier beschriebenen Experimenten durch die Eröffnung und Aufweitung des Brustkorbes der das Organvolumen einschränkende Gegendruck durch die Brustwand wegfällt. Dies verlangt besonders geringe Spitzendrücke, um Schäden durch ein Barotrauma durch alveoläre Überblähung zu vermeiden.

Die Herausforderung bestand darin, eine Balance zwischen einer einerseits möglichst hohen Anzahl Atemzüge pro Minute zur Verringerung des inspiratorischen Druckes und des Atemzugvolumens zu finden, ohne eine Hypokapnie durch übermäßiges Abatmen des Kohlendioxids zu provozieren. Ein weiterer Faktor war der PEEP, der die funktionale Residualkapazität (das Lungenvolumen zu Ende der Expiration) erhöht, um die belüftete Austauschfläche der Lunge möglichst groß zu halten. Ein schädliches zyklisches Kollabieren und wieder Aufblähen der Alveolen (Atelektrauma) wird dadurch verhindert. Ein zu hoher PEEP dagegen erhöht den intrathorakalen Druck und vermindert dadurch die Durchblutung der Lunge, beziehungsweise verursacht die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch vaskulären Scherstress und erhöhten intraluminalen Druck²⁴⁷. Weiter führt ein überhöhter PEEP zu einer Erhöhung des zentralvenösen Druckes und verminderter Organperfusion durch eine Verminderung des Herzzeitvolumens²⁴⁸.

Die über den Versuchszeitraum stabilen Werte von arteriellem Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck bei der Kontrollgruppe zeugen von einer gelungenen Beatmungsstrategie mit einem Beatmungsdruck von 140 mmH₂O, 65 Atemzügen pro Minute und einem PEEP von 30 mmH₂O.

Die Verwendung des druckkontrollierenden Beatmungsgerätes hat gegenüber einem volumengesteuerten Beatmungsmodus den Vorteil der Verhinderung von überhöhten Beatmungsspitzenrücken mit ihren beschriebenen negativen Folgen²⁴⁹.

Die Arbeitsgruppe um Kuiper²⁵⁰ hat ein ähnliches Beatmungsregime von Ratten mit induziertem Lungenschaden über vier Stunden eingesetzt: Beatmungsdruck von 140 mmH₂O mit einem PEEP von 50 mmH₂O. Wösten-van Asperen und Mitarbeiter²⁵¹ fanden eine andere erfolgreiche Beatmungsstrategie unter Verwendung eines Beatmungsdruckes von 260 mmH₂O, 30 Atemzügen pro Minute, PEEP von 50 mmH₂O mit einem 100-prozentigem Sauerstoffgemisch, letzteres kann allerdings nach Krieger und Mitarbeitern²⁵² per se zu einem Lungenschaden als Folge einer Hyperoxie führen.

5.1.4 Operation

Der operative Eingriff mit Eröffnung und Aufspreizung des Brustkorbes stellt einen invasiven Eingriff dar. Darum erfolgten die Operationsschritte mit dem notwendigen Fingerspitzengefühl und unter maximaler Schonung des umliegenden Gewebes, insbesondere der Nervenstrukturen. Bei der Eröffnung des Thorax wurde die Anwendung des Elektrokauters nur punktuell auf eröffnete Blutgefäße beschränkt. Der Rippenspreizer wurde so gering wie möglich geöffnet und so platziert, dass sein Eigengewicht nicht auf den Thorax oder Weichteile drückte.

5.1.5 Versuchsdauer

Mit der Versuchsdauer steigt der Anspruch an die Stabilität des Modells, das durch eine sorgfältige und rasche Operationstechnik und optimierte Einstellungen der die Lebensfunktionen unterstützenden Geräte gewährleistet wird. Eine Versuchsdauer von mindestens 240 Minuten war für die Ausbildung einer ausgeprägten Immunantwort als charakteristischem Kennzeichen des ARDS erforderlich, deren Höhepunkt nach vier Stunden zu erwarten ist²⁵³.

5.1.6 Messung der Myeloperoxidase

Die Sensibilität der Myeloperoxidase gegenüber Abbau durch andere Gewebsenzyme erfordert behutsames Handling und rasches Arbeiten beim Aufbereiten und Messen der Proben²⁵⁴.

Die individuellen Messungen wurden etappenweise an unterschiedlichen Tagen durchgeführt und auf jeder Mikrotiterplatte Proben unterschiedlicher Versuchsgruppen bearbeitet, um eine gleichmäßige Verteilung eventueller externer Einflüsse zu gewährleisten.

Die hier angewendete manuelle Technik birgt aufgrund der zahlreichen Zwischenschritte ein vergleichsweise höheres Risiko für eine Einbuße an Exaktheit des Ergebnisses gegenüber der Verwendung eines kommerziellen ELISA-Kits.

Es ergibt sich allerdings der nicht zu vernachlässigende Vorteil der Schonung von zur Verfügung stehenden finanziellen Mitteln.

Zudem messen die meisten kommerziellen Kits die Aktivität der MPO in Flüssigkeiten, ohne einen zuvorigen Aufschluss des Gewebes und der Granula der Neutrophilen Granulozyten zur Freisetzung der MPO vorzunehmen. Somit werden mit Hilfe von Kits eher bereits freigesetzte aktive MPO erfasst, nicht jedoch die Fragestellung der vorhandenen Akkumulation von neutrophilen Granulozyten beantwortet.

5.1.7 Durchführung der bronchoalveolären Lavage

Da eine Lavage selbst einen invasiven Prozess darstellt, der die Atemwegsepithelien leicht schädigen und die gewonnene Zellfraktion beschädigen kann, wurde sie sehr behutsam durchgeführt. Das instillierte Volumen physiologischer Kochsalzlösung war dem Fassungsvermögen der Rattenlunge angepasst. Die Rückgewinnung erfolgte jeweils mit möglichst geringer Sogkraft, und die Flüssigkeit wurde in ein Plastikröhrchen verbracht, da das Material Glas die Alveolarmakrophagen aktivieren und damit das Messergebnis verfälschen würde²⁵⁵.

Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse ist ein bestenfalls gleiches, zumindest ähnliches Volumen der rückgewonnenen Flüssigkeit relevant. Diese Voraussetzung war in der vorliegenden Versuchsreihe gegeben.

5.1.8 Protokollkritik

Bei der Versuchsgruppe Z1 bedingt die einstündige Vorbehandlung eine längere Gesamtversuchsdauer als für die übrigen Versuchsgruppen. Idealerweise sollten die anderen Versuchsgruppen ebenfalls eine Vorlaufzeit mit Gabe eines Placebos erhalten, um ebenfalls eine Gesamtversuchszeit von 300 Minuten zu durchlaufen. In der Vorgehensweise bei den hiesigen Versuchen ohne Vorlaufzeit wurde ein Kompromiss gefunden, um auch bei den Gruppen, bei denen ein schwererer Verlauf des Lungenschadens zu erwarten war, eine ausreichende Stabilität der Versuchstiere bis zum Ende der Versuche aufrechtzuerhalten. Zudem sollte eine direkte Vergleichbarkeit zu den vorangegangenen Studien möglich sein, was die Einhaltung des gleichen Protokolls voraussetzt.

5.1.9 Angiotensin-(1-7) als therapeutische Strategie zur Behandlung des akuten Atemnotsyndroms

Den Anstoß für die Erforschung der protektiven Eigenschaften des Ang-(1-7) gab eine bemerkenswerte Veröffentlichung in *Nature*-Journal im Jahre 2005¹⁵⁰. Erstmals wiesen hier Imai und Mitarbeiter¹⁵⁰ im Tiermodell eine protektive Wirkung von ACE2 gegen den bis heute an effizienter pharmakologischer Therapie mangelnden akuten Lungenschaden nach.

In dieser Studie zeigte Imai zunächst, dass Ang II als Haupteffektor des „klassischen“ RAS über seine Wirkung am AT₁-Rezeptor zur Entstehung eines experimentellen Lungenschadens maßgeblich beiträgt. Dieser Zusammenhang wurde anhand der signifikant geringeren Ausprägung eines induzierten Lungenschadens bei genetisch modifizierten Mäusen, denen der AT₁-Rezeptor oder ACE fehlt, belegt.

Die Komponenten der „neuen“ Achse des RAS dagegen (das ist die Achse der Generierung von Ang-(1-7) durch ACE2) schützen vor einem experimentellen Lungenschaden, was Imai an ACE2-knockout-Mäusen zeigte, die nach Schadensinduktion einen ausgeprägteren Lungenschaden als Wildtypmäuse entwickelten. Dies wurde durch die Gabe von rekombinantem ACE2 an diese Mäuse wiederum unterbunden.

Seine Ergebnisse erklärte Imai mit der Eigenschaft von ACE2, durch den Abbau von Ang II dessen Wirkung über seinen AT₁-Rezeptor zu vermindern. Daneben drängt sich eine weitere Interpretationsmöglichkeit auf, der zufolge eine direkte Einwirkung des biologisch aktiven Ang-(1-7) zugrunde liegt, welches nach der Gabe von ACE2 vermehrt endogen gebildet wird. Diese protektive Wirkung des Ang-(1-7) auf einen Lungenschaden ist mittlerweile mehrfach belegt. Sowohl beim Modell des ölsäureinduzierten Lungenschadens²³³, als auch bei Lungenschaden durch chronische Hypoxie²⁵⁶ und Säureaspiration mit anschließender Überbeatmung²⁵⁷ unterdrückt Ang-(1-7) die Entzündungsreaktion.

Eine Entfaltung dieser protektiven Eigenschaften ist auch bei der therapeutischen Anwendung von Ang-(1-7) an Patienten mit akutem Atemnotsyndrom zu erwarten. Aus diesem Grunde steht Ang-(1-7) im Fokus vielversprechender Forschungsbemühungen, die den Weg zu klinischen Tests und bestenfalls zum Einsatz von Ang-(1-7) im Kampf gegen das ARDS ebnen sollen. Ein wichtiger Schritt in diese Richtung ist die Ermittlung des optimalen Zeitfensters für eine Applikation, dem in dieser Arbeit nachgegangen wird.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Hämodynamik

Beim ölsäureinduzierten Lungenschaden kommt es zur Destabilisierung hämodynamischer Parameter. Es sind eine verminderte Herzleistung mit abfallendem mittleren arteriellen Blutdruck und ein erhöhter pulmonovaskulärer Druck beschrieben^{100,113,258}.

5.2.1.1 Arterieller Blutdruck

Im Verlauf der hier beschriebenen Experimente über 240 Minuten entwickelte sich in der Kontrollgruppe ein geringer Abfall des Blutdruckes von zirka acht Prozent. Dies geschah in den ersten 30 Minuten des Experimentes und ist vermutlich dem postoperativen Stress, Verharren in Rückenlage und eventuell der Wirkung der Narkotika zu schulden. Danach stabilisierte sich der arterielle Blutdruck und blieb über den Rest des Experiments nahezu konstant.

Durch die Induktion des Ölsäureschadens über 30 Minuten wurde bei allen betroffenen Versuchsgruppen ein Abfall des arteriellen Blutdrucks herbeigeführt, der sich allein bei der Schadensgruppe im weiteren Verlauf kontinuierlich fortsetzte und in eine deutliche Hypotension unter 40 mmHg mündete. Das entspricht einem Blutdruckabfall von insgesamt zirka 60 Prozent.

Bei den entsprechenden Versuchen von Klein und Mitarbeitern²³³ war es nach der Ölsäurezufuhr zunächst zu einem Blutdruckabfall um zirka 40 Prozent gekommen. Eine kontinuierliche Ang-(1-7)-Infusion über weitere 210 Minuten hatte den Ausgangswert weitestgehend wiederherstellen können.

Auch bei den hier beschriebenen Versuchen wurde durch den Einfluss von Ang-(1-7) der initiale Blutdruckabfall bei den Therapiegruppen in unterschiedlichem Ausmaß wieder angehoben.

Dies war bei der kontinuierlichen, dauerhaften Zufuhr (Z2) am deutlichsten und statistisch signifikant der Fall. Bei den Gruppen Z1 und Z3 war der arterielle Blutdruck am Ende der Experimente trotz Abfall nach Beendigung der Gabe von Ang-(1-7) immerhin noch zirka 15 mmHg höher als bei der Schadensgruppe. Bei der spät einsetzenden Therapie (Z4) setzte mit Beginn der Gabe von Ang-(1-7) nach neunzig Minuten eine Abgrenzung zu den niedrigeren Werten der OA-Gruppe ein, die in einen um zwanzig Prozent höheren Endwert bei Z4 gegenüber OA mündete.

Blutdruckregulierende Eigenschaften waren die ersten Effekte²⁵⁹, die Ang-(1-7) nach seiner Entdeckung im Jahre 1988^{260,261} zugeschrieben wurden. Dabei wurde insbesondere beobachtet, dass Ang-(1-7) einer chronischen Hypertension durch Vasorelaxation diverser Gefäßbetten entgegenwirkt^{262,263}. Diesen vasodilatativen und damit hypotensiven Eigenschaften ist vermutlich der niedrigere arterielle Blutdruck bei der Vorbehandlungsgruppe (Z1) zum Zeitpunkt der Baseline zuzuschreiben. Nach 60 Minuten Gabe von Ang-(1-7) liegt er 22 Prozent unter dem Durchschnittswert der anderen Gruppen.

Nach der Ölsäuregabe über die folgenden 30 Minuten befand sich der arterielle Blutdruck (AP) auf dem Niveau der anderen ölsäuregeschädigten Gruppen. Dies steht im Einklang mit der Plasmahalbwertszeit von Ang-(1-7), die mit 20 bis 30 Minuten angegeben wird²⁶⁴.

Die Stabilisierung des AD im Verlauf der Applikation von Ang-(1-7) wirkt aufgrund seiner vasodilatativen Eigenschaften zunächst kontraintuitiv, da eine weitere Absenkung des

Blutdrucks zu erwarten wäre. Im Rückschluss muss von einer indirekten Blutdruckstabilisierung durch protektive Effekte von Ang-(1-7) auf die durch Ölsäure geschädigten Organe ausgegangen werden. Ursächlich kommt eine reflektorische Verhinderung einer pulmonal verursachten Hypoxie nicht in Betracht, da sich die paO_2 Werte zwischen den Versuchsgruppen nicht signifikant unterschieden. Hier ist vielmehr von einer positiven Beeinflussung der Herzfunktion durch Ang-(1-7) auszugehen.

Insbesondere eine Dilatation der Koronararterien durch das Ang-(1-7)^{217,265} könnte einen Ausgleich einer ölsäureinduzierten Herzmuskelschwäche durch eine Verbesserung der Durchblutung des Herzmuskels bedingen und so den Blutdruck stabilisieren. Entsprechend dieses Konzeptes konnten Sampaio und Mitarbeiter²⁶⁶ nach Gabe von Ang-(1-7) eine signifikant erhöhte Durchblutung des Herzmuskels und Anstieg des Herzindex um 30 Prozent mit erhöhtem Herzminuten- und Auswurfvolumen bei mit Urethan anästhesierten Ratten nachweisen²⁶⁶.

Zur Verhinderung des fortschreitenden, durch Ölsäuregabe bedingten Blutdruckabfalls hat sich die permanente Verabreichung mit Ang-(1-7) als effektive Behandlungsstrategie erwiesen. Alle anderen hier untersuchten Zeitschemata konnten keine befriedigende Stabilisierung des Blutdrucks hervorrufen.

5.2.1.2 Pulmovaskulärer Gefäßwiderstand

Die Widerstandserhöhung der pulmonalen Gefäßstrombahn (PVR) ist eine häufig dokumentierte klinische Komplikation beim akuten Atemnotsyndrom^{267,268,19,269}. Manche Autoren sehen in einem erhöhtem PVR einen unabhängigen Prädiktor für eine schlechtere Prognose^{270,271}. Andere Arbeiten wiederum konnten diesen Zusammenhang zwischen erhöhtem PVR und erhöhter Mortalität nicht bestätigen^{272,273}.

Die Ursachen für eine erhöhte PVR beim ölsäureinduzierten ARDS sind vor allem in vasookklusiven Mikrothrombosen^{274,275}, einer hypoxischen Vasokonstriktion durch präkapillare Arteriolen in beschädigten Lungenbereichen^{276,277} und ödembedingtem Druck auf die Kapillaren zu finden. Darüber hinaus kommt es zur Schädigung des Endothels, das damit seine Fähigkeit zur ausgewogenen Bereitstellung von Mediatoren zur Vasodilatation (Stickstoffmonoxid²⁷⁸, Prostacyclin) und -konstriktion (Thromboxane, Leukotriene, Endothelin²⁷⁹, Serotonin, Ang II²⁸⁰) einbüßt²⁸¹.

Der in der Schadensgruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöhte PVR ist entsprechend zu erwarten, und bezeugt die erfolgreiche Initiierung eines Lungenschadens.

Die Behandlungsgruppen Z1 und Z2 wiesen einen ähnlich niedrigen PVR wie die Kontrollgruppe auf, allesamt bewegten sie sich unter $25 \text{ dynes} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^5$. Hier war Angiotensin-(1-7) in der Lage, den ölsäurebedingten Anstieg des Gefäßwiderstandes zu verhindern.

Dies deckt sich mit der weiter unten erläuterten verminderten Ausbildung eines Lungenödems bei diesen beiden Gruppen, das die Kapillargefäße durch Druck von außen komprimiert und so zum Anstieg der Resistance beitragen kann.

Die beobachtete Verminderung des pulmonal-vaskulären Druckes und des PVR durch Ang-(1-7) erfolgt vermutlich indirekt durch die Verbesserung des Lungenschadens und ist nicht direkt auf die bekannten vasodilatatorischen Eigenschaften des Ang-(1-7) zurückzuführen.

Sowohl die Dauerbehandlung als auch die präventive Gabe von Ang-(1-7) sind geeignet, einen Anstieg des PVR komplett zu unterbinden.

5.2.2 Blutgase

5.2.2.1 Arterieller Sauerstoffpartialdruck

In der vorliegenden Arbeit induzierte die Gabe von Ölsäure trotz ansonsten deutlicher biochemischer, hämodynamischer und histologischer²⁸² Anzeichen eines akuten Atemnotsyndroms keine Verschlechterung des pulmonalen Gasaustausches, insofern als der arterielle Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck sich nicht von den Werten der Kontrollgruppe unterschieden.

Gust und Mitarbeiter^{283,284} schreiben die Aufrechterhaltung der arteriellen Oxygenierung bei bestehendem Lungenschaden der intrapulmonalen Umverteilung des Blutflusses aus ödematisierten in intakte Lungenareale durch die hypoxische Vasokonstriktion zu. Diese ist im Einklang mit dem typischen histologischen Bild des ölsäureinduzierten Lungenschadens, der ein multifokales, heterogenes Muster zeigt²⁸⁵. Dabei liegen geschädigte Areale mit interstitieller und alveolärer Ödematisierung unterschiedlicher Ausprägung, hämorrhagische Infiltration und Kongestionen und intakte Bereiche mosaikartig beieinander^{100,286}.

Wie in der vorliegenden Arbeit, unterblieb auch in früheren Arbeiten unserer Arbeitsgruppe eine signifikante Hypoxie nach Ölsäuregabe^{233,234}.

Einen wichtigen Beitrag zur befriedigenden Sauerstoffversorgung hat sicherlich auch die optimierte Ventilationsstrategie geleistet, durch eine lungenschonende Beatmung mit niedrigem Atemzugvolumina, angemessenem PEEP zum Offenhalten luftführender Atemwege und Alveolen bei niedrigen Spitzendrücken.

Die weiter unten dokumentierte mehr oder weniger stark ausgeprägte Ödematisierung des Lungengewebes (unter Ausnahme der Versuchsgruppe Z2) wirkte sich dabei nicht negativ auf den arteriellen Sauerstoffpartialdruck aus. Die Fähigkeit des Lungeninterstitiums, sein Volumen bis zu 40 Prozent auszudehnen, erlaubt eine große Aufnahme von Flüssigkeit, ohne den Gasaustausch zu behindern²⁸⁷.

Obwohl das Ausbleiben einer Hypoxie ein charakteristisches Kennzeichen des Modells des ölsäureinduzierten Lungenschadens ist, berichten einige Arbeitsgruppen von teilweise fulminanten Hypoxien im Zusammenhang mit einer Ölsäureverabreichung. Ausschlaggebend für diese Differenz mag eine unterschiedliche technische Umsetzung der Schadensinduktion sein. So wurden teilweise größere Mengen Ölsäure appliziert (100 mg/kg, Chen und Mitarbeiter²⁸⁸), die Ölsäure pur instilliert (0,1 ml/kg pure Ölsäure innerhalb einer Minute, Davidson und Mitarbeiter³⁵), oder auch als Bolus über einen sehr kurzen Zeitraum verabreicht (70 mg/kg pure Ölsäure als Bolus, Cassiano Silveira und Mitarbeiter²⁸⁹).

Das Ausbleiben einer Hypoxie bei den vorliegenden Versuchen ist insofern kritisch zu bewerten, als die Entwicklung eines hypoxischen Zustandes ein herausragendes Merkmal im klinischen Kontext darstellt. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass kein Versuchsmodell alle Aspekte des klinischen ARDS, sondern jeweils nur Teilbereiche darzustellen vermag. Darum ist unter Anbetracht der kompletten, weiter unten diskutierten Resultate vor allem innerhalb der Schadensgruppe bezüglich der erhöhten Entzündungsparameter und der Gefäßpermeabilität die Auslösung des Lungenschadens unzweifelhaft als gelungen anzusehen.

Dies ist besonders der Fall, als auch die Ansprüche der American Thoracic Society, eine der weltweit größten medizinischen Gesellschaften, erfüllt wurden. Diese hat zur besseren Vergleichbarkeit international durchgeführter tierexperimenteller Studien eine Richtlinie (Consensus Statement) zur Definition des akuten Lungenschadens mit vier Kernparametern erarbeitet²⁹⁰: histologischer Schadensnachweis, geschädigte kapilläre Barrierefunktion, Entzündung, funktioneller Schaden. Zur Stellung der Diagnose eines akuten Lungenschadens

im Experiment müssen drei dieser vier Kriterien erfüllt sein, was ist im vorliegenden Fall zweifelsfrei gegeben ist²⁸².

5.2.2.2 Arterieller Kohlendioxidpartialdruck

Bei keiner der Versuchsgruppen waren bedeutende Veränderungen des arteriellen $p\text{CO}_2$ über den Verlauf des Versuches zu verzeichnen. Diese Stabilität des Parameters spricht für ein gelungenes Beatmungsregime, da es bei einer Hyperventilation zu einem Abfall des $p\text{aCO}_2$ durch dessen vermehrte Abatmung kommt, bei einer Hypoventilation dagegen zu einem Anstieg²⁹¹.

Genauso wie im Zusammenhang mit dem Sauerstoffpartialdruck, ist beim experimentellen Lungenschaden, der durch Ölsäureapplikation ausgelöst wird, keine Veränderung des $p\text{aCO}_2$ zu erwarten.

5.2.3 Entzündungsparameter

5.2.3.1 Myeloperoxidase-Aktivität

Das Enzym Myeloperoxidase ist in den Granula der neutrophilen Granulozyten (PMN, Polymorphkernigen Neutrophilen) gelagert, den Haupteffektorzellen des angeborenen Immunsystems. Aufgrund dieser Spezifität für neutrophile Granulozyten ist der Nachweis der Myeloperoxidaseaktivität ein hervorragend geeigneter quantitativer Biomarker für das Ausmaß einer akuten Entzündungsreaktion²⁹². Im Lungengewebe gemessen, spiegelt sie zuverlässig die Dimension der interstitiellen Neutrophilenakkumulation wider^{293,294}.

Eine intravenöse Gabe von Ölsäure bewirkt Nekrosen der Endothelien der Lungenkapillaren und Epithelien der Alveolen und löst in weiterer Folge eine akute Entzündungsreaktion mit Einwanderung von neutrophilen Granulozyten aus^{295,296}. Dabei ist der initiale Schaden selbst nicht maßgeblich durch die Einwirkung von Neutrophilen, sondern direkt durch den Kontakt mit der Ölsäure bedingt¹³². Dies macht den indirekten Nachweis von neutrophilen Granulozyten, über die Aktivitätsbestimmung der MPO, für die Beurteilung des Ausmaßes des ölsäureinduzierten Lungenschadens zu einem äußerst sinnvollen und häufig verwendeten Marker. Auch bei Patienten sind PMN nicht unbedingt für die Entstehung des ARDS ursächlich. Dies wird daran deutlich, dass auch stark neutropenische Patienten einen ARDS entwickeln können²⁹⁷.

Beim akuten Lungenschaden erfolgt die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten innerhalb kürzester Zeit. So verdreifachte sich ihre Zahl in der Lunge innerhalb von 5 Minuten nach einer hohen Dosis von 0,1 ml/kg purer Ölsäure (Davidson und Mitarbeiter, die Menge entspricht 89 mg Ölsäure/kg)³⁵. Diese initiale Akkumulation ist jedoch in erster Linie im intravasalen Raum zu lokalisieren, da die Emigration der PMN in den Alveolarraum frühestens nach einem Zeitraum von zirka zwei Stunden nach Eintreten der Noxe zu erwarten ist²⁹⁸. Daneben untersuchten Ito und Mitarbeiter histologische Präparate von Ratten vier Stunden nachdem sie etwa 0,03 ml Ölsäure pro Kilogramm Körpergewicht erhalten hatten. Sie fanden sechsmal mehr neutrophile Granulozyten pro Gesichtsfeld als in den Präparaten der Kontrollgruppe²⁹⁹. Außerdem registrierten sie einen deutlichen Anstieg der Myeloperoxidaseaktivität im ölsäuregeschädigten Lungengewebe nach einer Stunde, hier mit einem Peak nach drei Stunden.

In einer ähnlichen Studie fanden Derks und Mitarbeiter bereits im Jahre 1977 nach zwei und nach drei Stunden erhöhte Zahlen an neutrophilen Granulozyten in histologischen Präparaten von ölsäuregeschädigten Hundelungen²⁸⁶.

Bereits zu einem früheren Zeitpunkt ist das Oberflächenprotein ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) nachweisbar. Hierbei handelt es sich um ein Adhäsionsmolekül, das eine gerichtete Migration von Entzündungszellen zum Ort der Noxe steuert, und schon innerhalb von 30 Minuten nach Ölsäureinjektion präsent ist³⁰⁰.

Etwas später als die vorgenannten Autoren, nämlich erst sechs Stunden nach Schadensinduktion durch Gabe von 0,2 ml/kg Ölsäure, fanden Huang und Mitarbeiter eine massiv angestiegene Aktivität von MPO in der Lunge, die sich von 1,74 u/g auf 6,81 u/g erhöht hatte⁴⁶.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind mit diesen früheren Arbeiten, wie auch mit vorausgegangenen Studien der eigenen Arbeitsgruppe im Einklang. In Letzteren ging der Ölsäureschaden mit einer zirka 2,4-fachen Erhöhung der MPO-Aktivität einher²³³. Die kontinuierliche Gabe von Ang-(1-7) über 210 Minuten vermochte diesen Anstieg komplett zu verhindern.

Das vorliegende Ergebnis zeigt eine 2,6-fache Erhöhung der Aktivität der MPO in der Schadensgruppe. Mit Ang-(1-7) wiederum konnte diese Entwicklung in allen Therapiegruppen komplett unterbunden werden.

Damit steht fest, dass eine Behandlung mit Ang-(1-7) eine vermehrte Präsenz oder gar Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der Lunge zuverlässig verhindert. Dies trifft auch zu, wenn eine Therapie mit Ang-(1-7) nicht umgehend nach der auslösenden Noxe eingeleitet wird, wie es in Versuchsgruppe Z4 der Fall ist.

Die Ursache für die Effektivität auch bei der später einsetzenden Intervention liegt in dem zuvor beschriebenen zeitlich verzögerten Verlauf der Neutrophilenimmigration²⁹⁸.

Die Ausbildung des Lungenödems setzt hingegen prompt und zeitgleich mit der durch Ölsäurekontakt eintretenden Schädigung der Blut-Luft-Schranke ein. Dieser Vorgang ist irreversibel und durch eine späte Intervention nicht mehr nennenswert zu beeinflussen.

5.2.3.2 Feucht-Trockengewicht-Verhältnis der Lunge

Ein interstitielles und alveoläres Lungenödem ist eines der Hauptmerkmale des akuten Atemnotsyndroms. Im Tierexperiment manifestiert sich das Lungenödem durch ein erhöhtes Organgewicht, das sich mit einfachen Mitteln nach Trocknung des Gewebes über die Evaluierung des Gewichtsverlustes ermittelt lässt.

Das Lungenödem entsteht in der vorliegenden Versuchsreihe direkt durch den Einfluss der Ölsäure. Es kommt durch Perforationen der Kapillar- und Alveolarsepten zur Ansammlung extravaskulärer Flüssigkeit¹¹³ im Lungeninterstitium mit nachfolgendem Einstrom von proteinreicher Flüssigkeit in die Alveolarräume³⁰¹.

Gleichzeitig behindert Ölsäure die Resorption von Flüssigkeit aus den Alveolen. Sie blockiert³⁰² die dafür verantwortlichen Natriumkanäle³⁰³ und die Na⁺-K⁺-ATPase³⁰⁴, die aktiv Natrium in die Epithelzellen transportieren und damit einen osmotischen Gradienten aufbauen, dem Wasser passiv folgt.

Unter der Einwirkung von Ölsäure wurde in der vorliegenden Versuchsreihe ein ausgeprägtes Lungenödem ausgelöst. Dies entspricht den Erwartungen an einen ölsäureinduzierten Lungenschaden.

Im Rahmen einer ähnlichen Versuchsreihe, die von Huang und Mitarbeitern durchgeführt wurde, entstand innerhalb von sechs Stunden nach Gabe von 0,2 ml/kg Ölsäure an Ratten ein Anstieg des Feucht-Trockengewichtsverhältnisses von 4,46 auf 6,37⁴⁶. Das ist vergleichbar mit dem hier vorliegenden Verhältnis von 5,6 (Kontrollgruppe) gegenüber 7,14 (Schadensgruppe). Aber auch bereits zu einem deutlich früheren Zeitpunkt, eine Stunde nach einer intravenösen Applikation von Ölsäure, sind etliche Lungenkapillaren verstopft und Endothelzellen nekrotisch und von ihrer Basalmembran abgelöst²⁸⁶. Das zeigten Dickey und Mitarbeiter im Jahre 1981, als sie bei ihrer ersten Messung nach Ablauf einer Stunde sogar einen siebenfachen Anstieg der Lungenpermeabilität verzeichnen konnten²⁴¹. Dieses Ergebnis wurde nach einer Gabe von 0,5 ml Ölsäure pro Ratte erzielt, das entspricht grob 0,17 ml oder 150 mg Ölsäure pro Kilogramm Körpergewicht. Auch Erhart und Mitarbeiter beschreiben eine lineare Zunahme des Lungengewichtes zwischen ihrer ersten Messung nach einer und drei Stunden³⁰⁵.

Die durchgehende Behandlung mit Ang-(1-7) (Z2) kann diese Entwicklung eines Lungenödems vollständig unterbinden. Ein entsprechendes Ergebnis hatten bereits die früheren Studien unserer Arbeitsgruppe ergeben²³³. Hier verringerte sich das Feucht-Trockenverhältnis von 7 (Schadensgruppe) auf 5,4 (durchgehende Behandlung mit Ang-(1-7)).

Die sofort einsetzende Behandlung über nur eine Stunde hinweg (Z3) verringerte die Entstehung eines Lungenödems ebenfalls signifikant, die später einsetzende Behandlung dagegen (Z4) erzielte nur noch eine geringgradige Verminderung des Ödems. Das ist insofern plausibel, als die Zerstörung der Endothelien in den Alveolarkapillaren bereits innerhalb von

Sekunden nach der Ölsäuregabe einsetzte¹³¹ und zu dem Zeitpunkt der Einleitung der späten Behandlung bereits fortgeschritten war.

Die Vorbehandlung konnte die Entwicklung eines Lungenödems nicht komplett verhindern, wohl aber reduzieren. Die früh einsetzende und dauerhafte therapeutische Gabe (Z2) dagegen bewirkte die effektivste Verhinderung des Lungenödems.

5.2.3.3 Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Die bronchoalveoläre Lavage ist eine probate Methode zur Gewinnung von Material aus den tiefen Atemwegen. Der Nachweis der Gesamtproteinmenge in der so gewonnenen Recovery (Rückholmenge) ist ein weiterer anschaulicher Parameter für das Ausmaß der Zerstörung der alveolokapillären Membran, die den Übertritt proteinreicher Flüssigkeit aus dem Blutstrom in den Alveolarraum zur Folge hat. Intravenöse Ölsäureapplikation stößt diesen Prozess bereits innerhalb von Sekunden¹³¹ an.

Im Verlauf der hier durchgeführten Experimente kam es zu einem massiven Einstrom von Proteinen in die luftführenden Bereiche der Lungen in der Schadensgruppe. Dieser übersteigt den Gesamtproteingehalt der Kontrollgruppe um 137 Prozent und entspricht damit den Erwartungen an das Modell des ölsäureinduzierten Lungenschadens.

Andere Arbeitsgruppen konnten bereits eine Stunde nach einer Ölsäuregabe vermehrt Protein im Interstitium und Alveolarraum nachweisen^{129,258}. Davidson und Mitarbeiter fanden bei ihren Versuchen bereits nach 15 Minuten eine fünffache, und nach vier Stunden eine achtfache Erhöhung des Proteingehaltes in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit³⁵. In diesem Fall wurde 0,1 ml Ölsäure pro Kilogramm Körpergewicht der Ratte als unverdünnter Bolus innerhalb einer Minute verabreicht. Bueltmann und Mitarbeiter fanden bei Verwendung eines mit dem hiesigen vergleichbaren Versuchsprotokolls etwa eine Verdreifachung des Gesamtproteingehaltes vier Stunden nach Ölsäuregabe²³⁴.

Die umgehend einsetzende und permanent verabreichte Therapie mit Ang-(1-7) (Z2) verhinderte in der vorliegenden Studie den Einstrom von Proteinen in den Alveolarraum signifikant und fast komplett. Dieser Befund ist im Einklang mit den vorausgegangenen Untersuchungen von Klein und Mitarbeitern, die ebenfalls eine signifikante Verbesserung durch Ang-(1-7) gegenüber der Schadensgruppe zeigten³⁰⁶. Desgleichen vermochte auch eine präventive Behandlung (Z1) der Ratten mit Ang-(1-7) die Zerstörung der alveolokapillären Grenzschicht signifikant zu verringern. Die kurz andauernde Initialbehandlung (Z3) zeigte einen gewissen benefiziellen Effekt, nicht hingegen die spät einsetzende Behandlung (Z4).

Dieser fehlenden Effektivität liegt vermutlich die gleiche Ursache wie beim Feucht-Trockengewichtsverhältnis, nämlich die sofort nach der Noxe einsetzende und rasch fortschreitende Zerstörung der alveolokapillären Membran durch Ölsäure zugrunde.

5.2.3.4 Tumornekrosefaktor-alpha in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit

Der Entzündungsmediator TNF- α spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des ARDS¹³. Er wird hauptsächlich von Alveolarmakrophagen, aber auch von Endothelzellen auf einen inflammatorischen Stimulus hin gebildet und setzt die Kaskade der Entzündungsreaktion in Gang. Diese stimuliert die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, sowie Zellproliferation, Apoptose und Geweberegeneration. Die quantitative Darstellung des proinflammatorischen Zytokins TNF- α veranschaulicht daher das Ausmaß einer sich entwickelnden Entzündungsreaktion bereits in ihrem Frühstadium, und ein Anstieg des TNF- α -Spiegels ist beim ölsäureinduzierten Lungenschaden hinreichend belegt. Aus diesem Grunde ist die Veröffentlichung der Gehalte an TNF- α Bestandteil vieler Studien über den ölsäureinduzierten Lungenschaden. So verzeichneten Zhu und Mitarbeiter³⁰⁷ gegenüber der Ausgangsmenge von zirka 7,5 pg/ml TNF- α im Serum einen drastischen Anstieg auf zirka 80 pg/ml sechs Stunden nach Ölsäuregabe.

Ito und Mitarbeiter²⁹⁹ dokumentierten zu Ende eines vierstündigen Versuchsprotokolls einen deutlichen Unterschied von zirka 120 pg/g Lungengewebe bei der Kontrollgruppe gegenüber 1000 pg/g nach intravenöser Verabreichung von 1,2 ml/kg Ölsäure. Der Peak der TNF- α -Konzentration wurde hier bereits nach einer Stunde erfasst.

Der Bildungsort von TNF- α beim Lungenschaden ist im Lungengewebe selbst lokalisiert, wie Abd-Allah und Mitarbeiter durch den Nachweis einer signifikant erhöhten Menge von TNF- α -mRNA im Interstitium belegen konnten³⁰⁸.

So fanden Bueltmann und Mitarbeiter eine etwa 13-fache Erhöhung des TNF- α vier Stunden nach Ölsäuregabe (zirka 65 vs. 840 ng/l)²³⁴, Liu und Mitarbeiter wiesen nach sechs Stunden einen etwa achtfachen Anstieg (84,82/l vs. 656,51 ng/l) nach³⁰⁹.

Eine hohe TNF- α -Präsenz initiiert die Bildung weiterer Entzündungsmediatoren und die Einwanderung von Entzündungszellen mit nachfolgender weiterer Schädigung von Epi- und Endothelien im Sinne eines Circulus vitiosus³¹⁰. Eine Reduktion von TNF- α in seiner Funktion als proinflammatorisches Agens vermag somit auch mechanistisch die Progression der Entzündungskaskade abzuschwächen²⁹⁹.

Bei der vorliegenden Ergebnisdarstellung wird TNF- α der Proteinmenge in der Lavageflüssigkeit gegenübergestellt (pg/mg Protein). Das gibt einen Bezug zur Menge der Extravasation in den Alveolarraum.

Auch für diesen Parameter konnte die größte Reduktion im akuten Lungenschaden durch die sofortige, dauerhafte Intervention mit Ang-(1-7) (Z2) erzielt werden. Dieser Befund kongruiert mit dem geringsten Feucht-Trockengewichtverhältnis und der geringsten Proteinextravasation bei dieser Behandlungsgruppe. Die anderen Behandlungsgruppen zeigten ebenfalls einen Trend zu einer geringeren TNF- α -Konzentration, der jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte. Dabei befanden sich die TNF- α -Konzentrationen bei der Vorbehandlung, der kurzen und der spät einsetzenden Behandlung auf nahezu dem gleichen Niveau.

5.2.4 Aktivitäten von ACE2 und ACE

Die Hauptaufgabe der beiden Enzyme ACE2 und ACE ist die Generierung der beiden funktionellen Gegenspieler innerhalb des RAS. Ang II wird durch ACE gebildet, Ang-(1-7) entsteht durch Hydrolyse des Ang II durch ACE2.

Die Schadensgruppe (OA) zeigte gegenüber der Kontrollgruppe geringfügig erhöhte ACE- und erniedrigte ACE2-Aktivitäten im Lungengewebe. Dies stimmt mit klinischen Befunden überein, in denen die Aktivität des ACE in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von ARDS-Patienten ebenfalls erhöht ist³¹¹. Desgleichen fanden Wösten-van Asperen und Mitarbeiter³¹² in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit von Mäusen mit Lungenschaden

einen erhöhten Aktivitätsgrad von ACE, begleitet von einer erniedrigten ACE2-Aktivität. Diese gingen einher mit erhöhten Ang II- und erniedrigten Ang-(1-7)-Konzentrationen. Der Anstieg der zirkulierenden ACE-Menge erfolgt rasch, Nikiwa und Mitarbeiter konnten im tierexperimentellen Modell des ölsäureinduzierten Lungenschadens bereits nach 2,5 Minuten einen Anstieg der Aktivität des zirkulierenden ACE feststellen³¹³.

Eine entzündungsbedingte Herunterregulierung des ACE2 konnten Hanafy und Mitarbeiter³¹⁴ anhand der Verminderung der ACE2-Genexpression im Herzen von mit Mykobakterium infizierten Ratten dokumentieren. Selbiges wurde in den Nieren diabetischer Ratten registriert³¹⁵.

Der sich aus der Gegenüberstellung von ACE2 und ACE ergebende Quotient (hier als Ratio bezeichnet) zeigt Veränderungen in der Balance der Aktivität der beiden Enzyme, und damit gleichbedeutend eine Modifikation im Ausmaß der Neubildung der Gegenspieler Ang II und Ang-(1-7). Eine Dysregulation des Verhältnisses von ACE2/ACE durch dominierendes ACE-Vorkommen wird im Zusammenhang von pathologischen oder entzündlichen Prozessen häufig beobachtet, zum Beispiel bei akuter Pankreatitis³¹⁶, experimentellem Lungenschaden durch Lipopolysaccharide³¹⁷ oder beim Ischämie-Reperfusionsschaden³¹⁸, sowie beim Herzversagen³¹⁹.

Bei einer Dominanz der Aktivität von ACE liegt die Haupteffektivität des RAS auf der Bildungsachse, die zur Formation von Ang II und seiner Wirkung führt (ACE - Ang II - AT₁-Rezeptor)³²⁰, anstatt der kontraregulativen, protektiven Achse (ACE2 - Ang-(1-7) - Mas-Rezeptor).

Bei allen Versuchsgruppen, die Ang-(1-7) erhalten haben, war die Aktivität des ACE am Ende des Experimentes vermindert, und jene des ACE2 bei den Gruppen Z1 und Z2 erhöht.

Das Verhältnis der Aktivität von ACE2 gegenüber ACE war bei diesen Gruppen am Versuchsende gegenüber dem der Kontroll- und Schadensgruppe signifikant erhöht.

Somit ist hier die Enzymwirkung von ACE2 gegenüber der von ACE dominierend und führt zur überwiegenden Produktion von weiterem, endogenen Ang-(1-7) bei verhältnismäßig geringerer Ang II-Synthese. Das bedeutet, dass durch die Gabe von Ang-(1-7) zusätzlich auch die endogene Ang-(1-7) Bildung in einem positiven Feed-Forward-Mechanismus stimuliert wird.

Der hemmende Effekt von Ang-(1-7) auf ACE, der durch Bindung von Ang-(1-7) an die aktive Region des ACE zustande kommt, wurde bereits 1998 beschrieben³²¹.

Eine Verminderung des ACE durch Inhibition wiederum erhöht zwangsläufig die zirkulierende Menge des Ang-(1-7)²⁰⁹, dies geschieht zumindest teilweise durch verminderten Abbau von Ang-(1-7) durch ACE. Gleichzeitig wird weniger Ang II durch ACE gebildet³²².

Die Ankurbelung der endogenen Produktion von Ang-(1-7) als Reaktion auf eine exogene Zufuhr ist eine weitere Erklärung für die benefizielle Wirkung von Ang-(1-7) über seine Applikationsdauer hinaus. Vor allem bei der Gruppe der therapeutischen Vorbehandlung ist dies ersichtlich, bei der die Infusion von Ang-(1-7) bereits 240 Minuten vor Versuchsende abgeschlossen war.

5.3 Klinische Aspekte

Den Erkenntnissen aus der vorliegenden Versuchsreihe nach verspricht eine frühe einsetzende und dauerhafte Behandlung mit Ang-(1-7) in der initialen Phase des ARDS den größten Erfolg. Die Früherkennung eines beginnenden Lungenversagens stellt eine Herausforderung für den klinischen Diagnostiker dar. Routinemäßig soll das Eintreten einer respiratorischen Insuffizienz des Patienten durch engmaschige blutgasanalytische und pulsoxymetrische Überwachung unmittelbar erkannt werden³²³.

Zhang und Mitarbeiter fanden im Mengenverhältnis von IL-6 und seines löslichen Rezeptors (serum IL-6/sIL-6R ratio) einen pathophysiologischen Marker für das Eintreten eines ARDS als Komplikation einer akuten Pankreatitis bei Mäusen³²⁴. Diese Erkenntnis konnte anhand von Patientenproben verifiziert werden. Die Validierung dieses und ähnlicher früher Biomarker des ARDS verleiht Hoffnung auf eine zukünftig mögliche klinische Anwendung zur Detektierung eines sich entwickelnden Lungenschadens noch vor dem Zeitpunkt der Notwendigkeit einer assistierten oder maschinellen Beatmung.

Bei der retrospektiven Sichtung von Patientendaten konnten durch eine Kombination von zwanzig Biomarkern und funktionellen Parametern zwei unterschiedliche Subphänotypen voneinander abgegrenzt werden. Dabei war der „Phänotyp 2“ durch die gravierendere Ausprägung von Entzündungsreaktionen, Schock und metabolischer Azidose, sowie signifikant schlechtere Prognose und höhere Mortalität gegenüber dem „Phänotyp 1“ gekennzeichnet. Beim „Phänotyp 2“ sind die Konzentrationen von Interleukin-6, Interleukin-8, gelöstem TNF- α -Rezeptor (sTNFr-1) und Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI-1) gegenüber dem „Phänotyp 1“ im Blut erhöht, auch die Herzfrequenz und das Atemminutenvolumen sind höher. Dagegen sind Bikarbonat, Protein C und der systolische Blutdruck erniedrigt³⁰.

Auch zeigte sich bei diesem Phänotyp die Optimierung der mechanischen Beatmung weniger erfolgreich, wie die nachträgliche Aufarbeitung einer großen Studie zur Evaluierung des optimalen PEEP³²⁵ ergab.

Eine Ausweitung der Kenntnisse und Etablierung eines schnellen, für den täglichen Einsatz am Krankenbett geeigneten Tests wäre ein weiterer großer Schritt im Kampf gegen ARDS. So könnten besonders gefährdete Patienten bereits vor dem Einsetzen einer klinisch relevanten Lungeninsuffizienz detektiert und eine Behandlung eingeleitet werden, sowie auch geeignete Teilnehmer für klinische Studien identifiziert werden.

Da in dieser Arbeit auch die Vorbehandlung mit Ang-(1-7) einen eindeutigen positiven Effekt zeigte, stellt sich die Frage nach einer prophylaktischen Dauerbehandlung.

Dabei fällt auf, dass Ang-(1-7) auch bei verschiedenen für eine ARDS prädisponierenden Erkrankungen im Tierversuch benefizielle Effekte gezeigt hat und durch eine Vorbehandlung potentiell die Entstehung eines Lungenschadens zu verhindern vermag, so gezeigt für: Sepsis, Pankreatitis³²⁶, Entzündungsgeschehen³²⁷ und Organtransplantation³²⁸.

Obwohl bei klinischen Studien in einem anderen Zusammenhang keine nennenswerten unerwünschten Wirkungen an Patienten festgestellt wurden, sollte der Einsatz von Ang-(1-7) bei Intensivpatienten individuell abgewogen werden, da durch die physiologische Eigenschaft der Vasodilatation ein moderates Absinken des peripheren Blutdrucks trotz gegenteiliger Hinweise in Tierversuchen nicht endgültig auszuschließen ist.

5.3.1 Klinische Studien

Im Jahre 2008 hieß es nach präklinischen³²⁹ und klinischen Studien der Arbeitsgruppe um diZerega endlich „Ang-(1-7) ist sicher“³³⁰. Neu diagnostizierte Brustkrebspatientinnen bekamen subkutane Injektionen von Ang-(1-7) in zwei Etappen über sieben, beziehungsweise zehn Tage vor und nach einer Chemotherapie. Ziel der Studie war die Evaluierung der optimalen, sowie der maximalen Dosierung von Ang-(1-7) zur Stimulation der Hämatopoese. Dosierungen von 2,5 bis 100 mg/kg/d ergaben keine dosislimitierende Toxizität und weniger unerwünschte Nebenwirkungen als das Standardpräparat Filgrastim.

In einer weiteren Studie wurde an Patienten mit hartnäckigen Krebsarten eine höchste ungefährliche Dosierung von 0,4 mg/kg/d ermittelt. Nach subkutanen Verabreichungen von Lösungen mit 35 pg/ml an 5 aufeinander folgenden Tagen war Ang-(1-7) rasch bioverfügbar und erreichte seine maximale Plasmakonzentration nach etwa einer Stunde.

In dieser Studie der klinischen Phase 2 konnte eine tägliche subkutane Gabe von 0,1 mg/kg die aus einer Chemotherapie resultierende Thrombozytopenie bei einigen Patienten verbessern. Interessanterweise vermochte die höhere Dosierung von 0,3 mg/kg keine Verbesserung gegenüber der Placebogruppe zu bewirken³³¹.

5.3.2 Toxikologische Aspekte aus tierexperimentellen Arbeiten

Bei einer Studie mit Gabe einer sehr hohen Dosis von 10 mg/kg Ang-(1-7) über 28 Tage an Beagles und Ratten²⁶⁴ konnten keinerlei toxische Auswirkungen festgestellt werden. Die maximalen Plasmakonzentrationen wurden fünfzehn, beziehungsweise dreißig Minuten nach subkutaner Applikation gemessen und lagen bei zirka 1000 ng/ml beim Hund und zirka 25 (am ersten Tag) und 250 ng/ml (am Tag 27) bei der Ratte. Beim Hund kam es demnach nicht zu einer Akkumulation, bei der Ratte dagegen stieg die Plasmakonzentration in 28 Tagen auf das zirka zehnfache an. Die Plasmahalbwertszeit lag bei zirka 28 Minuten beim Hund und 27 Minuten (am ersten Tag), beziehungsweise 16 Minuten (am Tag 27) bei der Ratte.

In dieser Studie wurde die zehnfache Menge der für diese Arbeit auf 24 Stunden hochgerechneten, konstant verabreichten Dosis als täglicher Bolus appliziert.

5.4 Pharmakologische Aspekte

Als natürlicher Rezeptor für Ang-(1-7) wurde im Jahre 2007 der Mas-Rezeptor identifiziert²¹⁰. Der bereits im Jahre 1994 ermittelte Mas-Antagonist A779 (D-Ala⁷-Ang-(1-7))³³² blockierte seine Wirkungen jedoch mitunter nur inkomplett. Zum Beispiel reduzierte es die hypotensive Wirkung von Ang-(1-7) bei einer durch Salzdiät ausgelösten Hypertension bei Ratten nur partiell³³³ und vermochte auch die Ang-(1-7)-bedingte Vasorelaxation von kaninen Hirnarterien nicht beeinträchtigen³³⁴.

Ein weiterer Mas-Antagonist, D-Pro⁷-Ang-(1-7)³³⁵, löste wiederum teilweise abweichende Effekte von A779 aus³³⁶. Dies alles deutet auf die Existenz weiterer Rezeptoren neben Mas hin, die allerdings bislang nicht näher charakterisiert sind.

Laufende weitere Forschungsarbeiten sollen hier zukünftig mehr Klarheit schaffen. Dafür stehen sowohl Mas-Knockout-Mäuse³³⁷ zur Verfügung, als auch transgene Ratten, die chronisch Ang-(1-7) überproduzieren³³⁸.

Der nicht-peptidische Mas-Agonist AVE 0991 kann Effekte des Ang-(1-7) reproduzieren, wie Entzündungshemmung³³⁹, Wirkungen auf Endothelien³⁴⁰, Antidiurese in der Niere³⁴¹ und Dilatation der Aorta³⁴². Beweisend für seine Selektivität am Mas-Rezeptor ist das Ausbleiben einer Wirkung in Mas-knockout Mäusen³⁴¹.

Trotz vielversprechender Studienergebnisse ist die Weiterentwicklung von AVE 0991 als orales Therapeutikum durch die Firma Hoechst/Aventis aus unbekanntem Gründen eingestellt worden³⁴³.

Weitere synthetische Mas-Agonisten sind CGEN-856S (vasorelaxierend, antihypertensiv³⁴⁴ und kardioprotektiv³⁴⁵) und NorLeu3-Ang-(1-7), das bereits in Form eines Gels zur Wundheilung bei diabetischem Fußgeschwür eingesetzt wird^{346,347}.

Aufgrund noch offener Fragen zur genauen Wirkweise von Ang-(1-7) und der immer noch inkompletten Identifizierung seiner Rezeptoren scheint eine Anwendung von Ang-(1-7) selbst die sinnvollere Variante, die auch in den vorliegenden Versuchen untersucht wurde.

Die Problematik der raschen Proteolyse von Ang-(1-7) konnte durch die Entwicklung spezieller Formulierungen mit verlängerter Halbwertszeit umgangen werden.

So stehen seit Kurzem oral anwendbare Ang-(1-7)-Präparate zur Verfügung. Eine orale Verabreichung kann wegen seiner einfachen Anwendung im Zusammenhang einer prophylaktischen Behandlung des ARDS interessant sein.

Beim HPβCD/Ang-(1-7) ist das Ang-(1-7) in einem Cyclodextrin verkapselt, und so vor enzymatischer Inaktivierung im Verdauungstrakt geschützt. Freies Ang-(1-7) wird fortwährend über den Darm ins Blut abgegeben³⁴⁸. Bisher wurden antihypertensive³⁴⁹ und antidiabetogene Eigenschaften³⁵⁰ nachgewiesen.

Ang-(1-7)-CyD ist ebenfalls durch ein Cyclodextrin geschützt und zeigt Mas-abhängige antithrombotische³⁵¹ und antifibrotische³⁵² Wirkungen.

In absehbarer Zukunft ist gar eine Synthese von Ang-(1-7) in den Chloroplasten pflanzlicher Zellen und deren Aufnahme als Mahlzeit denkbar^{353,354}. Mäuse mit entzündlichen Augenkrankheiten wurden derweise bereits erfolgreich therapiert³⁵⁵.

Für eine stationäre Behandlung wie im Falle des akuten Atemnotsyndroms ist jedoch die exakt kontrollierbare, sofort bioverfügbare, stetige intravenöse Verabreichung am praktikabelsten.

Interessant ist hier das zyklische Ang-(1-7) (cyclic ang-(1-7)), ein lanthionine-bridge Ang-(1-7)³⁵⁶, dessen vierte und siebte Aminosäure durch Thioether-Brücken gekoppelt sind. Seine Stabilität zeigt sich in einer Resistenz gegenüber einem Abbau durch ACE und einer 34-fach erhöhten Halbwertszeit³⁵⁷ bei Ratten.

Eine Dauerinfusion des zyklischen Ang-(1-7) über acht Wochen förderte den Heilungsprozess nach Myokardinfarkt bei Ratten³⁵⁷. Die pharmakologische Wirkung war signifikant höher als die von Ang-(1-7), so dass eine bis zu hundertfach niedrigere Dosierung für einen Effekt ausreichte. Das zyklische Ang-(1-7) ist ebenfalls für die subkutane Verabreichung geeignet und weist hier eine 98-prozentige Bioverfügbarkeit auf. Auch eine orale oder pulmonale Gabe ist möglich, hierbei ist die Substanz zu 28 Prozent bioverfügbar³⁵⁸.

6 Ausblick

Das therapeutische Potential von Angiotensin-(1-7) auf das akute Atemnotsyndrom wurde bereits mehrfach im tierexperimentellen Modell belegt.

Zur Untermauerung der Allgemeingültigkeit dieser Eigenschaften auch bei anderen für einen Lungenschaden ursächlichen Noxen neben einer Fettembolie konnten weitere etablierte Schadensmodelle des ARDS beitragen, wie der beatmungsassoziierte Lungenschaden oder der Säureaspirationsschaden.

Die bereits gewonnenen Erkenntnisse, in Zusammenhang mit dem Wissen um eine sichere und nebenwirkungsarme Verträglichkeit einer Therapie mit Ang-(1-7) beim Menschen, werden zum gegenwärtigen Zeitpunkt bereits im Rahmen klinischer Studien zur Thematik kanzeröser Erkrankungen und Diabetes mellitus umgesetzt. Dabei soll auch die kleinstmögliche noch wirksame Dosierung im Zusammenhang mit der jeweiligen Indikation evaluiert werden.

Daneben sollte der Testung einer möglichen lokalen, inhalativen Verabreichung intensiv nachgegangen werden, um das geringe Risiko von unerwünschten Wirkungen noch weiter zu reduzieren.

Ein weiterer Forschungsschwerpunkt liegt in einer effektiven Frühsterkennung des ARDS durch spezielle Marker im Blut von Patienten, sowie auch in der Etablierung eines einfachen Tests zur Identifizierung von genetisch prädisponierten und somit besonders gefährdeten Individuen.

Die benefiziellen Einflüsse auf verschiedene Mechanismen des Entzündungsgeschehens - in der vorliegenden Arbeit wurden eine Reduzierung der Neutrophilenimmigration und Verminderungen der Barrierefunktionen, der Entzündungsmediatoren und der Ödembildung nachgewiesen - legt die Möglichkeit weiterer Einsatzgebiete von Ang-(1-7) bei inflammatorischen Erkrankungen nahe. Auch an diesem Punkt bereits ansetzende Forschungsbemühungen geben Anlass zu optimistischen Erwartungen.

Ferner gilt es, noch offene Fragen über die genaue Wirkweise des Ang-(1-7) zu beantworten: Weiterer Forschungsbedarf besteht beispielweise für die Identifikation der die protektiven Effekte vermittelnden Effektorzellen und Signalwege.

Auch die Wirkungsweise über den Ang-(1-7)-assoziierten Mas-Rezeptor, beziehungsweise das Vorhandensein weiterer beteiligter Rezeptoren sind wichtige zu klärende Aspekte.

Alle diese Punkte sind weitere Schritte hin zu dem Ziel, nach erfolgreichen klinischen Studien einen raschen Einsatz von Ang-(1-7) im klinischen Alltag zu ermöglichen, um dem Therapienotstand im Zusammenhang mit dem akuten Atemnotsyndrom entgegenzutreten.

7 Zusammenfassung

Eine der bedeutendsten Herausforderungen der modernen Intensivmedizin ist die Etablierung effektiver therapeutischer Maßnahmen gegen das akute Atemnotsyndrom. Durch seine hohe Mortalität und die vielfältigen Risikofaktoren steht es im Fokus der Intensivmedizin. Es hat bereits eine Vielzahl von Behandlungsansätzen mit unterschiedlichen Substanzen gegeben, die sich zunächst im Labor vielversprechend darstellten, in der klinischen Anwendung jedoch keine Verminderung der Sterberate erzielen konnten.

Zahlreiche präklinischen Studien aus verschiedenen Arbeitsgruppen zur Wirksamkeit des Heptapeptids Angiotensin-(1-7) beim akuten Lungenschaden geben nun Grund zu berechtigter Hoffnung auf einen lang erwarteten Durchbruch bei der Suche nach einer therapeutisch wirksamen Substanz gegen das akute Atemnotsyndrom.

Das therapeutische Potential von Angiotensin-(1-7) bei anderen Indikationen wird bereits im Rahmen verschiedener klinischer Studien untersucht.

Einige dieser Studien haben mittlerweile den Sprung in die klinische Phase 3 geschafft, wie zum Thema der Verbesserung der Hämatopoese nach einer Chemotherapie^{330,331} und zu Wundheilung bei diabetischen Fußulzera^{346,347}. Weitere klinische Studien befinden sich kurz vor der Umsetzung, wie eine Anwendung gegen Lungenkrebs³⁵⁹.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nach dem idealen Zeitpunkt des Therapiebeginns mit Angiotensin-(1-7) bei einem akuten Atemnotsyndrom und der erforderlichen Dauer seiner Gabe nachgegangen. Dafür diente das Modell des ölsäureinduzierten Lungenschadens bei der Ratte, das die frühe Phase der Erkrankung simuliert.

Zur Evaluierung der Ausprägung des Lungenschadens wurden kontinuierlich hämodynamische Parameter aufgezeichnet (arterieller und zentralvenöser Blutdruck, Herzminutenvolumen, linksatrialer Druck und pulmonalvaskulärer Druck zur Ermittlung des pulmovaskulären Gefäßwiderstands). Zu festgelegten Zeitpunkten wurden arterielle Blutgase evaluiert (arterieller Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck). Nach Versuchsende wurden die Entzündungsparameter Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe sowie der Gehalt an Tumornekrosefaktor- α in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit bestimmt.

Da der akute Lungenschaden sich durch eine gestörte Barrierefunktion mit Austritt von proteinreicher Flüssigkeit in die Alveolen auszeichnet, wurde zudem der Gesamtproteingehalt der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit ermittelt, sowie das Feucht-Trockengewicht-Verhältnis der Lunge.

Im externen Labor wurde zusätzlich die Aktivität von ACE2 und ACE im Lungengewebe und deren Verhältnis ermittelt.

Die Untersuchungen wurden an Sprague-Dawley Ratten durchgeführt, die auf sechs Versuchsgruppen aufgeteilt wurden. Neben einer Kontrollgruppe (C) und einer nicht therapeutisch mit Angiotensin-(1-7) behandelten Schadensgruppe (OA) unterliefen vier Gruppen verschiedene Behandlungsschemata.

Neben einer dauerhaften Infusion mit Angiotensin-(1-7) über den gesamten Versuchszeitraum von 240 Minuten (Z2) wurde eine Vorbehandlung über sechzig Minuten durchgeführt (Z1), eine verkürzte Behandlung von nur sechzig Minuten nach Schadensinduktion (Z3) und eine später einsetzende Behandlung ab der neunzigsten Versuchsminute (Z4).

Dabei hat sich die dauerhafte, sofortige Behandlung als wirksamste Option erwiesen und den Lungenschaden deutlich verbessert, einzelne Parameter sogar wieder vollständig normalisiert. Das zeigte sich in einer Stabilisierung des Blutdrucks und der Aufrechterhaltung eines niedrigen pulmonalen Gefäßwiderstandes. Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und die Zerstörung der Blut-Luft-Schranke mit Ödembildung und Proteinübertritt in die Alveolen wurden komplett unterbunden. Die Menge des proinflammatorischen Markers Tumornekrosefaktor- α in den tiefen Atemwegen wurde ebenfalls signifikant verringert.

Auch bei den anderen Behandlungsgruppen waren Verbesserungen des Lungenschadens zu verzeichnen. Alle Behandlungsschemata konnten eine Neutrophilenimmigration in das Lungengewebe komplett verhindern und zeigten einen deutlichen Trend zur Verminderung von Tumornekrosefaktor- α .

Die Vorbehandlung noch vor der Induktion des Lungenschadens bewirkte eine deutliche Verbesserung, wenn auch nicht so ausgeprägt wie die Dauerbehandlung. Gegenüber der kurzen und der spät einsetzenden Behandlung war der pulmovaskuläre Gefäßwiderstand nicht erhöht und der Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks milder, die Ödembildung war reduziert. Bei den Versuchsgruppen der kurzen und spät einsetzenden Behandlung dagegen konnte keine Reduktion des Feucht-Trockengewicht-Verhältnisses mehr festgestellt werden.

Die Proteinextravasation wurde durch eine Vorbehandlung signifikant verringert. Bei der kurzen Behandlung kam es nur zu einer geringfügigen Verbesserung, bei der spät einsetzenden Behandlungsstrategie war keinerlei Besserung gegenüber der Schadensgruppe erkennbar.

Das Verhältnis der Aktivitäten von ACE und ACE2 war bei allen mit Angiotensin-(1-7) behandelten Gruppen zu Gunsten einer höheren ACE2-Aktivität verändert. ACE2 baut Angiotensin II zu körpereigenem Angiotensin-(1-7) um und erhöht so die Präsenz von Angiotensin-(1-7) über die externe Gabe hinaus.

Eine Vorbehandlung mit Angiotensin-(1-7) bei Risikopatienten erscheint demgemäß durchaus sinnvoll, da es die Ausmaße eines akuten Atemnotsyndroms deutlich zu reduzieren vermag. Die größten Effekte wurden jedoch bei sofortigem Behandlungsbeginn in der Initialphase eines akuten Atemnotsyndroms erzielt. Im Falle eines zu frühzeitigen Abbruchs der Therapie kommt es allerdings erneut zur Entwicklung der Entzündungsreaktion, wie durch die Ergebnisse der Kurztherapie über sechzig Minuten belegt werden konnte. Durch die frühe und kontinuierliche Gabe von Angiotensin-(1-7) wird die Schadenskaskade frühzeitig unterbrochen, ehe ein

Circulus vitiosus entsteht, der in eine das akute Atemnotsyndrom kennzeichnende überschießende Entzündungsreaktion mit Entwicklung eines Lungenödems mündet. Auch Lungenperfusion und Blutdruck werden bei kontinuierlicher Gabe stabilisiert.

Bei einem späteren Therapiebeginn ist nur ein geringer oder gar ausbleibender Erfolg zu erwarten.

Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse gäbe die Anberaumung klinischer Studien zum Einsatz von Angiotensin-(1-7) berechtigten Grund zur Hoffnung auf einen erfolgreichen Einsatz als erstes Therapeutikum gegen das in der Intensivmedizin gefürchtete akute Atemnotsyndrom, wobei die Applikation wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt frühzeitig und kontinuierlich erfolgen sollte.

8 Summary

Therapeutic time window for angiotensin-(1-7) in acute lung injury in rats

One of the biggest challenges of modern critical care medicine is the establishment of an effective pharmacological therapeutic intervention against the acute respiratory distress syndrome (ARDS). The high associated mortality and various risk factors keeps ARDS in the focus of intensive care medicine. Numerous approaches with various substances, which despite of promising preclinic outcomes in the laboratory, have failed to reduce mortality rates in patients in subsequent clinical trials.

Increasing knowledge about the heptapeptide angiotensin-(1-7) is raising hope on a long-awaited breakthrough in the search of a therapeutic potent substance against ARDS. Since its discovery in 1988, Ang-(1-7) turned out to be an important counter-effector of its precursor molecule angiotensin II. Meanwhile worldwide independent preclinic research allows insights into a multitude of positive effects of Ang-(1-7). Clinical studies on a beneficial effect of Ang-(1-7) in ovarian cancer and on wound healing of diabetic foot ulcers are already entering phase 3 clinical trials. Further clinical studies are currently being initiated, for example for the application of Ang-(1-7) in lung cancer.

The aim of the present study was to identify the ideal time window for a therapeutic approach of Ang-(1-7) against ARDS. For the induction of acute lung injury in rats, the model of oleic acid application was used, representing the early phase of the syndrome. Hemodynamic parameters were continuously monitored (arterial blood pressure, central venous pressure, cardiac output, left atrial pressure and pulmonary artery pressure allowing for calculation of pulmonary vascular resistance). At defined time points, arterial blood gases were measured, and at the end of the experiment, myeloperoxidase activity in the lung and tumor necrosis factor- α in the bronchoalveolar lavage were determined as inflammatory markers. As acute lung injury is characterized by a leak of protein rich fluid into the alveoli, total protein concentration in the bronchoalveolar lavage fluid and the wet-to-dry lung weight ratio of the lung tissue were measured. In an external laboratory, the content of ACE and ACE2 activity in lung tissue was quantified.

The results of four different settings were compared with a control group and a non-treated damage group. The first group received a continuous infusion of Ang-(1-7) over the whole time of the experiment, starting immediately after oleic acid infusion. A pre-treatment group received Ang-(1-7) over sixty minutes, a short-term treatment group until the ninetieth minute after oleic acid, and a late treatment group starting at the ninetieth minute of the experiment until its endpoint.

The continuous, immediate treatment has proven to be the most effective in that it markedly attenuated the development of ARDS. The blood pressure was stabilized and pulmonary resistance was normalized. Immigration of neutrophils and the disintegration of the alveolar barrier were completely prevented. The pro-inflammatory marker tumor necrosis factor- α in the deep airways was also significantly reduced.

The other treatment groups also reduced the severity of ARDS to varying degrees. In all groups the immigration of neutrophil granulocytes into the lung was prevented and the concentration

of tumor necrosis factor- α in the bronchoalveolar lavage fluid showed a trend towards a reduction.

Pretreatment in particular showed a marked improvement in most parameters, albeit not as distinct as the continuous treatment.

Unlike the short term and the late initiation of the treatment, pulmonary vascular resistance remained low and the decline of mean arterial blood pressure was more moderate, while edema formation and protein leakage was reduced.

In the short time and late beginning treatment groups no reduction of wet-to-dry lung weight ratio could be detected. The short treatment reduced protein leakage to a small degree, the late treatment however showed no difference compared to the damage group.

The ratio of ACE2 versus ACE activity was altered in all groups which received Ang-(1-7) towards a higher activity of ACE2 as compared to the control and the damage group. ACE2 cleaves Angiotensin II to Ang-(1-7) and thus, this change in the activity ratio can be expected to prolong and amplify the effects of exogenous Ang-(1-7) administration by stimulation its endogenous formation.

Based on the present data, a pretreatment of patients at risk for ARDS with Ang-(1-7) may be useful as it might reduce the severity of ARDS. Greater effects on the outcome of ARDS will, however, be achieved by an immediate initiation of Ang-(1-7) administration as a steady treatment, which in this work was performed by intravenous continuous infusion. In case the therapy is terminated too early, the inflammatory response can, however, recur. An immediate intervention reduces the inflammatory responses most effectively and stabilizes lung perfusion and blood pressure. With an early intervention, the damaging cascade is interrupted at a stage which prevents the emergence of a vicious cycle that would trigger the excessive inflammatory response that characterizes ARDS. With a late initiation of therapy, this beneficial effect is no longer warranted.

In summary, administration of Ang-(1-7) provides for a promising strategy for the treatment of ARDS, provided that treatment is initiated at an early phase of the syndrome. To a smaller extent, Ang-(1-7) may also be effective as a prophylactic treatment.

9 Literaturverzeichnis

- (1) Rubenfeld, G. D.; Caldwell, E.; Peabody, E.; Weaver, J.; Martin, D. P.; Neff, M.; Stern, E. J.; Hudson, L. D. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* **2005**, *353*, 1685-1693.
- (2) Arroliga, A. C.; Ghamra, Z. W.; Perez Trepichio, A.; Perez Trepichio, P.; Komara, J. J., Jr.; Smith, A.; Wiedemann, H. P. Incidence of ARDS in an adult population of northeast Ohio. *Chest* **2002**, *121*, 1972-1976.
- (3) Luhr, O. R.; Antonsen, K.; Karlsson, M.; Aardal, S.; Thorsteinsson, A.; Frostell, C. G.; Bonde, J. Incidence and mortality after acute respiratory failure and acute respiratory distress syndrome in Sweden, Denmark, and Iceland. The ARF Study Group. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**, *159*, 1849-1861.
- (4) Brun-Buisson, C.; Minelli, C.; Bertolini, G.; Brazzi, L.; Pimentel, J.; Lewandowski, K.; Bion, J.; Romand, J. A.; Villar, J.; Thorsteinsson, A.; Damas, P.; Armaganidis, A.; Lemaire, F.; Group, A. S. Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med* **2004**, *30*, 51-61.
- (5) Johnson, E. R.; Matthay, M. A. Acute lung injury: epidemiology, pathogenesis, and treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv* **2010**, *23*, 243-252.
- (6) Frutos-Vivar, F.; Ferguson, N. D.; Esteban, A. Epidemiology of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Semin Respir Crit Care Med* **2006**, *27*, 327-336.
- (7) Impellizzeri, D.; Bruschetta, G.; Esposito, E.; Cuzzocrea, S. Emerging drugs for acute lung injury. *Expert Opin Emerg Drugs* **2015**, *20*, 75-89.
- (8) Del Sorbo, L.; Slutsky, A. S. Acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Curr Opin Crit Care* **2011**, *17*, 1-6.
- (9) Liu, K. D.; Glidden, D. V.; Eisner, M. D.; Parsons, P. E.; Ware, L. B.; Wheeler, A.; Korpak, A.; Thompson, B. T.; Chertow, G. M.; Matthay, M. A.; National Heart, L.; Blood Institute, A. N. C. T. G. Predictive and pathogenetic value of plasma biomarkers for acute kidney injury in patients with acute lung injury. *Crit Care Med* **2007**, *35*, 2755-2761.
- (10) Montgomery, A. B.; Stager, M. A.; Carrico, C. J.; Hudson, L. D. Causes of mortality in patients with the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis* **1985**, *132*, 485-489.
- (11) Herridge, M. S.; Tansey, C. M.; Matté, A.; Tomlinson, G.; Diaz-Granados, N.; Cooper, A.; Guest, C. B.; Mazer, C. D.; Mehta, S.; Stewart, T. E.; Kudlow, P.; Cook, D.; Slutsky, A. S.; Cheung, A. M.; Canadian Critical Care Trials, G. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **2011**, *364*, 1293-1304.
- (12) Carlson, C. G.; Huang, D. T. The Adult Respiratory Distress Syndrome Cognitive Outcomes Study: long-term neuropsychological function in survivors of acute lung injury. *Crit Care* **2013**, *17*, 317.
- (13) Ashbaugh, D. G.; Bigelow, D. B.; Petty, T. L.; Levine, B. E. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* **1967**, *2*, 319-323.
- (14) Bernard, G. R.; Artigas, A.; Brigham, K. L.; Carlet, J.; Falke, K.; Hudson, L.; Lamy, M.; Legall, J. R.; Morris, A.; Spragg, R. The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* **1994**, *149*, 818-824.
- (15) Horovitz, J. H.; Carrico, C. J.; Shires, G. T. Pulmonary response to major injury. *Arch Surg* **1974**, *108*, 349-355.

-
- (16) Force, A. D. T.; Ranieri, V. M.; Rubenfeld, G. D.; Thompson, B. T.; Ferguson, N. D.; Caldwell, E.; Fan, E.; Camporota, L.; Slutsky, A. S. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA* **2012**, *307*, 2526-2533.
- (17) Dreyfuss, D.; Saumon, G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, *157*, 294-323.
- (18) Bersten, A. D.; Edibam, C.; Hunt, T.; Moran, J.; Australian; New Zealand Intensive Care Society Clinical Trials, G. Incidence and mortality of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome in three Australian States. *Am J Respir Crit Care Med* **2002**, *165*, 443-448.
- (19) Ware, L. B.; Matthay, M. A. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **2000**, *342*, 1334-1349.
- (20) Fein, A. M.; Lippmann, M.; Holtzman, H.; Eliraz, A.; Goldberg, S. K. The risk factors, incidence, and prognosis of ARDS following septicemia. *Chest* **1983**, *83*, 40-42.
- (21) Kosova, E.; Bergmark, B.; Piazza, G. Fat embolism syndrome. *Circulation* **2015**, *131*, 317-320.
- (22) Dancey, D. R.; Hayes, J.; Gomez, M.; Schouten, D.; Fish, J.; Peters, W.; Slutsky, A. S.; Stewart, T. E. ARDS in patients with thermal injury. *Intensive Care Med* **1999**, *25*, 1231-1236.
- (23) Pastor, C. M.; Matthay, M. A.; Frossard, J. L. Pancreatitis-associated acute lung injury: new insights. *Chest* **2003**, *124*, 2341-2351.
- (24) Popovsky, M. A.; Moore, S. B. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* **1985**, *25*, 573-577.
- (25) Shorr, A. F.; Abbott, K. C.; Agadoa, L. Y. Acute respiratory distress syndrome after kidney transplantation: epidemiology, risk factors, and outcomes. *Crit Care Med* **2003**, *31*, 1325-1330.
- (26) Hachimi, M. A.; Hatim, E. A.; Moudeden, M. K.; Elkartouti, A.; Errami, M.; Louzi, L.; Hanafi, S. M.; Mahmoudi, A. [The acute respiratory distress syndrome in malaria: is it always the prerogative of Plasmodium falciparum?]. *Rev Pneumol Clin* **2013**, *69*, 283-286.
- (27) Glavan, B. J.; Holden, T. D.; Goss, C. H.; Black, R. A.; Neff, M. J.; Nathens, A. B.; Martin, T. R.; Wurfel, M. M.; Investigators, A. R. Genetic variation in the FAS gene and associations with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **2011**, *183*, 356-363.
- (28) Paine, R., 3rd; Wilcoxon, S. E.; Morris, S. B.; Sartori, C.; Baleeiro, C. E.; Matthay, M. A.; Christensen, P. J. Transgenic overexpression of granulocyte macrophage-colony stimulating factor in the lung prevents hyperoxic lung injury. *Am J Pathol* **2003**, *163*, 2397-2406.
- (29) Matthay, M. A.; Zimmerman, G. A.; Esmon, C.; Bhattacharya, J.; Coller, B.; Doerschuk, C. M.; Floros, J.; Gimbrone, M. A., Jr.; Hoffman, E.; Hubmayr, R. D.; Leppert, M.; Matalon, S.; Munford, R.; Parsons, P.; Slutsky, A. S.; Tracey, K. J.; Ward, P.; Gail, D. B.; Harabin, A. L. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. *Am J Respir Crit Care Med* **2003**, *167*, 1027-1035.
- (30) Calfee, C. S.; Delucchi, K.; Parsons, P. E.; Thompson, B. T.; Ware, L. B.; Matthay, M. A.; Network, N. A. Subphenotypes in acute respiratory distress syndrome: latent class analysis of data from two randomised controlled trials. *Lancet Respir Med* **2014**, *2*, 611-620.
- (31) Komarova, Y.; Malik, A. B. Regulation of endothelial permeability via paracellular and transcellular transport pathways. *Annu Rev Physiol* **2010**, *72*, 463-493.
- (32) Bitterman, P. B. Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. *Am J Med* **1992**, *92*, 39S-43S.
- (33) Tomashefski, J. F., Jr. Pulmonary pathology of acute respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* **2000**, *21*, 435-466.

- (34) Bachofen, M.; Weibel, E. R. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* **1977**, *116*, 589-615.
- (35) Davidson, K. G.; Bersten, A. D.; Barr, H. A.; Dowling, K. D.; Nicholas, T. E.; Doyle, I. R. Lung function, permeability, and surfactant composition in oleic acid-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2000**, *279*, L1091-1102.
- (36) Pittet, J. F.; Mackersie, R. C.; Martin, T. R.; Matthay, M. A. Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *Am J Respir Crit Care Med* **1997**, *155*, 1187-1205.
- (37) Matthay, M. A.; Folkesson, H. G.; Clerici, C. Lung epithelial fluid transport and the resolution of pulmonary edema. *Physiol Rev* **2002**, *82*, 569-600.
- (38) Zemans, R. L.; Colgan, S. P.; Downey, G. P. Transepithelial migration of neutrophils: mechanisms and implications for acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2009**, *40*, 519-535.
- (39) Brower, R. G.; Ware, L. B.; Berthiaume, Y.; Matthay, M. A. Treatment of ARDS. *Chest* **2001**, *120*, 1347-1367.
- (40) Canessa, C. M.; Schild, L.; Buell, G.; Thorens, B.; Gautschi, I.; Horisberger, J. D.; Rossier, B. C. Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* **1994**, *367*, 463-467.
- (41) Greene, K. E.; Wright, J. R.; Steinberg, K. P.; Ruzinski, J. T.; Caldwell, E.; Wong, W. B.; Hull, W.; Whitsett, J. A.; Akino, T.; Kuroki, Y.; Nagae, H.; Hudson, L. D.; Martin, T. R. Serial changes in surfactant-associated proteins in lung and serum before and after onset of ARDS. *Am J Respir Crit Care Med* **1999**, *160*, 1843-1850.
- (42) Gunther, A.; Mosavi, P.; Heinemann, S.; Ruppert, C.; Muth, H.; Markart, P.; Grimminger, F.; Walmrath, D.; Temmesfeld-Wollbruck, B.; Seeger, W. Alveolar fibrin formation caused by enhanced procoagulant and depressed fibrinolytic capacities in severe pneumonia. Comparison with the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* **2000**, *161*, 454-462.
- (43) Fukuda, Y.; Ishizaki, M.; Masuda, Y.; Kimura, G.; Kawanami, O.; Masugi, Y. The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* **1987**, *126*, 171-182.
- (44) Howell, M. D.; Davis, A. M. Management of ARDS in Adults. *JAMA* **2018**, *319*, 711-712.
- (45) Boyle, A. J.; Mac Sweeney, R.; McAuley, D. F. Pharmacological treatments in ARDS; a state-of-the-art update. *BMC Med* **2013**, *11*, 166.
- (46) Huang, B.; Wang, D. X.; Deng, W. Protective effects of dexamethasone on early acute lung injury induced by oleic acid in rats. *Int J Clin Exp Med* **2014**, *7*, 4698-4709.
- (47) Steinberg, K. P.; Hudson, L. D.; Goodman, R. B.; Hough, C. L.; Lanken, P. N.; Hyzy, R.; Thompson, B. T.; Ancukiewicz, M.; National Heart, L.; Blood Institute Acute Respiratory Distress Syndrome Clinical Trials, N. Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **2006**, *354*, 1671-1684.
- (48) Thompson, B. T. Corticosteroids for ARDS. *Minerva Anestesiol* **2010**, *76*, 441-447.
- (49) Peter, J. V.; John, P.; Graham, P. L.; Moran, J. L.; George, I. A.; Bersten, A. Corticosteroids in the prevention and treatment of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in adults: meta-analysis. *BMJ* **2008**, *336*, 1006-1009.
- (50) Silva, P. L.; Garcia, C. S.; Maronas, P. A.; Cagido, V. R.; Negri, E. M.; Damaceno-Rodrigues, N. R.; Ventura, G. M.; Bozza, P. T.; Zin, W. A.; Capelozzi, V. L.; Pelosi, P.; Rocco, P. R. Early short-term versus prolonged low-dose methylprednisolone therapy in acute lung injury. *Eur Respir J* **2009**, *33*, 634-645.
- (51) Taylor, R. W.; Zimmerman, J. L.; Dellinger, R. P.; Straube, R. C.; Criner, G. J.; Davis, K., Jr.; Kelly, K. M.; Smith, T. C.; Small, R. J.; Inhaled Nitric Oxide in, A. S. G. Low-

dose inhaled nitric oxide in patients with acute lung injury: a randomized controlled trial. *JAMA* **2004**, *291*, 1603-1609.

(52) Afshari, A.; Brok, J.; Møller, A. M.; Wetterslev, J. Inhaled nitric oxide for acute respiratory distress syndrome (ARDS) and acute lung injury in children and adults. *Cochrane Database Syst Rev* **2010**, CD002787.

(53) Michard, F.; Wolff, M. A.; Herman, B.; Wysocki, M. Right ventricular response to high-dose almitrine infusion in patients with severe hypoxemia related to acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* **2001**, *29*, 32-36.

(54) Puntorieri, V.; Hiansen, J. Q.; McCaig, L. A.; Yao, L. J.; Veldhuizen, R. A.; Lewis, J. F. The effects of exogenous surfactant administration on ventilation-induced inflammation in mouse models of lung injury. *BMC Pulm Med* **2013**, *13*, 67.

(55) Anzueto, A.; Baughman, R. P.; Guntupalli, K. K.; Weg, J. G.; Wiedemann, H. P.; Raventós, A. A.; Lemaire, F.; Long, W.; Zaccardelli, D. S.; Pattishall, E. N. Aerosolized surfactant in adults with sepsis-induced acute respiratory distress syndrome. Exosurf Acute Respiratory Distress Syndrome Sepsis Study Group. *N Engl J Med* **1996**, *334*, 1417-1421.

(56) Afshari, A.; Brok, J.; Møller, A. M.; Wetterslev, J. Aerosolized prostacyclin for acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Cochrane Database Syst Rev* **2010**, CD007733.

(57) Gao Smith, F.; Perkins, G. D.; Gates, S.; Young, D.; McAuley, D. F.; Tunnicliffe, W.; Khan, Z.; Lamb, S. E.; investigators, B.-s. Effect of intravenous beta-2 agonist treatment on clinical outcomes in acute respiratory distress syndrome (BALTI-2): a multicentre, randomised controlled trial. *Lancet* **2012**, *379*, 229-235.

(58) Gates, S.; Perkins, G. D.; Lamb, S. E.; Kelly, C.; Thickett, D. R.; Young, J. D.; McAuley, D. F.; Snaith, C.; McCabe, C.; Hulme, C. T.; Gao Smith, F. Beta-Agonist Lung injury Trial-2 (BALTI-2): a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial and economic evaluation of intravenous infusion of salbutamol versus placebo in patients with acute respiratory distress syndrome. *Health Technol Assess* **2013**, *17*, v-vi, 1-87.

(59) Licker, M.; Tschopp, J. M.; Robert, J.; Frey, J. G.; Diaper, J.; Ellenberger, C. Aerosolized salbutamol accelerates the resolution of pulmonary edema after lung resection. *Chest* **2008**, *133*, 845-852.

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

(61) Williams, J. G.; Maier, R. V. Ketoconazole inhibits alveolar macrophage production of inflammatory mediators involved in acute lung injury (adult respiratory distress syndrome). *Surgery* **1992**, *112*, 270-277.

(62) Zeiher, B. G.; Artigas, A.; Vincent, J. L.; Dmitrienko, A.; Jackson, K.; Thompson, B. T.; Bernard, G.; Group, S. S. Neutrophil elastase inhibition in acute lung injury: results of the STRIVE study. *Crit Care Med* **2004**, *32*, 1695-1702.

(63) Iwata, K.; Doi, A.; Ohji, G.; Oka, H.; Oba, Y.; Takimoto, K.; Igarashi, W.; Gremillion, D. H.; Shimada, T. Effect of neutrophil elastase inhibitor (sivelestat sodium) in the treatment of acute lung injury (ALI) and acute respiratory distress syndrome (ARDS): a systematic review and meta-analysis. *Intern Med* **2010**, *49*, 2423-2432.

(64) The ARDS Clinical Trials Network. Randomized, placebo-controlled trial of lisofylline for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* **2002**, *30*, 1-6.

(65) Haupt, M. T.; Jastremski, M. S.; Clemmer, T. P.; Metz, C. A.; Goris, G. B. Effect of ibuprofen in patients with severe sepsis: a randomized, double-blind, multicenter study. The Ibuprofen Study Group. *Crit Care Med* **1991**, *19*, 1339-1347.

- (66) Huang, L. T.; Lin, C. H.; Chou, H. C.; Chen, C. M. Ibuprofen protects ventilator-induced lung injury by downregulating Rho-kinase activity in rats. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*, 749097.
- (67) Tuinman, P. R.; Müller, M. C.; Jongasma, G.; Hegeman, M. A.; Juffermans, N. P. High-dose acetylsalicylic acid is superior to low-dose as well as to clopidogrel in preventing lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Shock* **2013**, *40*, 334-338.
- (68) Kor, D. J.; Talmor, D. S.; Banner-Goodspeed, V. M.; Carter, R. E.; Hinds, R.; Park, P. K.; Gajic, O.; Gong, M. N.; Illness, U. S. C.; Injury Trials Group: Lung Injury Prevention with Aspirin Study, G. Lung Injury Prevention with Aspirin (LIPS-A): a protocol for a multicentre randomised clinical trial in medical patients at high risk of acute lung injury. *BMJ Open* **2012**, *2*.
- (69) Kor, D. J.; Erlich, J.; Gong, M. N.; Malinchoc, M.; Carter, R. E.; Gajic, O.; Talmor, D. S.; Illness, U. S. C.; Injury Trials Group: Lung Injury Prevention Study, I. Association of prehospitalization aspirin therapy and acute lung injury: results of a multicenter international observational study of at-risk patients. *Crit Care Med* **2011**, *39*, 2393-2400.
- (70) Martin, G. S.; Moss, M.; Wheeler, A. P.; Mealer, M.; Morris, J. A.; Bernard, G. R. A randomized, controlled trial of furosemide with or without albumin in hypoproteinemic patients with acute lung injury. *Crit Care Med* **2005**, *33*, 1681-1687.
- (71) Adhikari, N.; Burns, K. E.; Meade, M. O. Pharmacologic therapies for adults with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* **2004**, CD004477.
- (72) Ross, I. F. Letter: The Committee on Ethics commenting on the conduct and judgment of members. *J Periodontol* **1976**, *47*, 299.
- (73) Neto, A. S.; Pereira, V. G.; Espósito, D. C.; Damasceno, M. C.; Schultz, M. J. Neuromuscular blocking agents in patients with acute respiratory distress syndrome: a summary of the current evidence from three randomized controlled trials. *Ann Intensive Care* **2012**, *2*, 33.
- (74) Maron-Gutierrez, T.; Laffey, J. G.; Pelosi, P.; Rocco, P. R. Cell-based therapies for the acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* **2014**, *20*, 122-131.
- (75) Matthay, M. A.; Thompson, B. T.; Read, E. J.; McKenna, D. H., Jr.; Liu, K. D.; Calfee, C. S.; Lee, J. W. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells for severe acute lung injury. *Chest* **2010**, *138*, 965-972.
- (76) Moorehead, R. J.; Wong, J. Gangrene in esophageal substitutes after resection and bypass procedures for carcinoma of the esophagus. *Hepatogastroenterology* **1990**, *37*, 364-367.
- (77) Mac Sweeney, R.; McAuley, D. F. Mesenchymal stem cell therapy in acute lung injury: is it time for a clinical trial? *Thorax* **2012**, *67*, 475-476.
- (78) McAuley, D. F.; Curley, G. F.; Hamid, U. I.; Laffey, J. G.; Abbott, J.; McKenna, D. H.; Fang, X.; Matthay, M. A.; Lee, J. W. Clinical grade allogeneic human mesenchymal stem cells restore alveolar fluid clearance in human lungs rejected for transplantation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2014**, *306*, L809-815.
- (79) De Loecker, I.; Preiser, J. C. Statins in the critically ill. *Ann Intensive Care* **2012**, *2*, 19.
- (80) McAuley, D. F.; Laffey, J. G.; O'Kane, C. M.; Perkins, G. D.; Mullan, B.; Trinder, T. J.; Johnston, P.; Hopkins, P. A.; Johnston, A. J.; McDowell, C.; McNally, C.; Investigators, H.-.; Irish Critical Care Trials, G. Simvastatin in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **2014**, *371*, 1695-1703.
- (81) National Heart, L.; Blood Institute, A. C. T. N.; Truwit, J. D.; Bernard, G. R.; Steingrub, J.; Matthay, M. A.; Liu, K. D.; Albertson, T. E.; Brower, R. G.; Shanholtz, C.; Rock, P.; Douglas, I. S.; deBoisblanc, B. P.; Hough, C. L.; Hite, R. D.; Thompson, B. T. Rosuvastatin for sepsis-associated acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **2014**, *370*, 2191-2200.

- (82) Avasarala, S.; Zhang, F.; Liu, G.; Wang, R.; London, S. D.; London, L. Curcumin modulates the inflammatory response and inhibits subsequent fibrosis in a mouse model of viral-induced acute respiratory distress syndrome. *PLoS One* **2013**, *8*, e57285.
- (83) Fowler, A. A., 3rd; Syed, A. A.; Knowlson, S.; Sculthorpe, R.; Farthing, D.; DeWilde, C.; Farthing, C. A.; Larus, T. L.; Martin, E.; Brophy, D. F.; Gupta, S.; Medical Respiratory Intensive Care Unit, N.; Fisher, B. J.; Natarajan, R. Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis. *J Transl Med* **2014**, *12*, 32.
- (84) Parekh, D.; Dancer, R. C.; Lax, S.; Cooper, M. S.; Martineau, A. R.; Fraser, W. D.; Tucker, O.; Alderson, D.; Perkins, G. D.; Gao-Smith, F.; Thickett, D. R. Vitamin D to prevent acute lung injury following oesophagectomy (VINDALOO): study protocol for a randomised placebo controlled trial. *Trials* **2013**, *14*, 100.
- (85) Kiss, J.; Yegutkin, G. G.; Koskinen, K.; Savunen, T.; Jalkanen, S.; Salmi, M. IFN-beta protects from vascular leakage via up-regulation of CD73. *Eur J Immunol* **2007**, *37*, 3334-3338.
- (86) Bellingan, G.; Maksimow, M.; Howell, D. C.; Stotz, M.; Beale, R.; Beatty, M.; Walsh, T.; Binning, A.; Davidson, A.; Kuper, M.; Shah, S.; Cooper, J.; Waris, M.; Yegutkin, G. G.; Jalkanen, J.; Salmi, M.; Piippo, I.; Jalkanen, M.; Montgomery, H.; Jalkanen, S. The effect of intravenous interferon-beta-1a (FP-1201) on lung CD73 expression and on acute respiratory distress syndrome mortality: an open-label study. *Lancet Respir Med* **2014**, *2*, 98-107.
- (87) Fan, E.; Needham, D. M.; Stewart, T. E. Ventilatory management of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *JAMA* **2005**, *294*, 2889-2896.
- (88) Members of the Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* **2000**, *342*, 1301-1308.
- (89) Muscedere, J. G.; Mullen, J. B.; Gan, K.; Slutsky, A. S. Tidal ventilation at low airway pressures can augment lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **1994**, *149*, 1327-1334.
- (90) Santa Cruz, R.; Rojas, J. I.; Nervi, R.; Heredia, R.; Ciapponi, A. High versus low positive end-expiratory pressure (PEEP) levels for mechanically ventilated adult patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Cochrane Database Syst Rev* **2013**, CD009098.
- (91) Petty, T. L.; Ashbaugh, D. G. The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. *Chest* **1971**, *60*, 233-239.
- (92) Guérin, C.; Reignier, J.; Richard, J. C.; Beuret, P.; Gacouin, A.; Boulain, T.; Mercier, E.; Badet, M.; Mercat, A.; Baudin, O.; Clavel, M.; Chatellier, D.; Jaber, S.; Rosselli, S.; Mancebo, J.; Sirodot, M.; Hilbert, G.; Bengler, C.; Richecoeur, J.; Gainnier, M.; Bayle, F.; Bourdin, G.; Leray, V.; Girard, R.; Baboi, L.; Ayzac, L.; Group, P. S. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **2013**, *368*, 2159-2168.
- (93) Piehl, M. A.; Brown, R. S. Use of extreme position changes in acute respiratory failure. *Crit Care Med* **1976**, *4*, 13-14.
- (94) Hörmann, C.; Benzer, H.; Baum, M.; Wicke, K.; Putensen, C.; Putz, G.; Hartlieb, S. [The prone position in ARDS. A successful therapeutic strategy]. *Anaesthesist* **1994**, *43*, 454-462.
- (95) Pape, H. C.; Regel, G.; Borgmann, W.; Sturm, J. A.; Tscherne, H. The effect of kinetic positioning on lung function and pulmonary haemodynamics in posttraumatic ARDS: a clinical study. *Injury* **1994**, *25*, 51-57.
- (96) Kopp, R.; Henzler, D.; Dembinski, R.; Kuhlen, R. [Extracorporeal membrane oxygenation by acute respiratory distress syndrome]. *Anaesthesist* **2004**, *53*, 168-174.
- (97) Müller, T.; Bein, T.; Philipp, A.; Graf, B.; Schmid, C.; Riegger, G. Extracorporeal pulmonary support in severe pulmonary failure in adults: a treatment rediscovered. *Dtsch Arztebl Int* **2013**, *110*, 159-166.

- (98) Brodie, D.; Bacchetta, M. Extracorporeal membrane oxygenation for ARDS in adults. *N Engl J Med* **2011**, *365*, 1905-1914.
- (99) Par, M.; Badovinac, A.; Plancak, D. Oral hygiene is an important factor for prevention of ventilator-associated pneumonia. *Acta Clin Croat* **2014**, *53*, 72-78.
- (100) Matute-Bello, G.; Frevert, C. W.; Martin, T. R. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2008**, *295*, L379-399.
- (101) Tsuno, K.; Miura, K.; Takeya, M.; Kolobow, T.; Morioka, T. Histopathologic pulmonary changes from mechanical ventilation at high peak airway pressures. *Am Rev Respir Dis* **1991**, *143*, 1115-1120.
- (102) Broccard, A. F.; Hotchkiss, J. R.; Kuwayama, N.; Olson, D. A.; Jamal, S.; Wangenstein, D. O.; Marini, J. J. Consequences of vascular flow on lung injury induced by mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, *157*, 1935-1942.
- (103) Rossi, N.; Kolobow, T.; Aprigliano, M.; Tsuno, K.; Giacomini, M. Intratracheal pulmonary ventilation at low airway pressures in a ventilator-induced model of acute respiratory failure improves lung function and survival. *Chest* **1998**, *114*, 1147-1157.
- (104) Dos Santos, C. C.; Slutsky, A. S. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J Appl Physiol (1985)* **2000**, *89*, 1645-1655.
- (105) Grimbert, F. A.; Parker, J. C.; Taylor, A. E. Increased pulmonary vascular permeability following acid aspiration. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **1981**, *51*, 335-345.
- (106) Weiser, M. R.; Pechet, T. T.; Williams, J. P.; Ma, M.; Frenette, P. S.; Moore, F. D.; Kobzik, L.; Hines, R. O.; Wagner, D. D.; Carroll, M. C.; Hechtman, H. B. Experimental murine acid aspiration injury is mediated by neutrophils and the alternative complement pathway. *J Appl Physiol (1985)* **1997**, *83*, 1090-1095.
- (107) Kennedy, T. P.; Johnson, K. J.; Kunkel, R. G.; Ward, P. A.; Knight, P. R.; Finch, J. S. Acute acid aspiration lung injury in the rat: biphasic pathogenesis. *Anesth Analg* **1989**, *69*, 87-92.
- (108) Brigham, K. L.; Meyrick, B. Endotoxin and lung injury. *Am Rev Respir Dis* **1986**, *133*, 913-927.
- (109) Theodore, J.; Millen, J. E.; Murdaugh, H. V.; Robin, E. D. Prolonged postoperative apnea with pseudocholinesterase deficiency. *Am Rev Respir Dis* **1967**, *96*, 508-511.
- (110) Lachmann, B.; Robertson, B.; Vogel, J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand* **1980**, *24*, 231-236.
- (111) Lanusse, C. E.; Prichard, R. K. Methimazole increases the plasma concentrations of the albendazole metabolites of netobimin in sheep. *Biopharm Drug Dispos* **1992**, *13*, 95-103.
- (112) Akella, A.; Sharma, P.; Pandey, R.; Deshpande, S. B. Characterization of oleic acid-induced acute respiratory distress syndrome model in rat. *Indian J Exp Biol* **2014**, *52*, 712-719.
- (113) Ashbaugh, D. G.; Uzawa, T. Respiratory and hemodynamic changes after injection of free fatty acids. *J Surg Res* **1968**, *8*, 417-423.
- (114) Fujita, M.; Kuwano, K.; Kunitake, R.; Hagimoto, N.; Miyazaki, H.; Kaneko, Y.; Kawasaki, M.; Maeyama, T.; Hara, N. Endothelial cell apoptosis in lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. *Int Arch Allergy Immunol* **1998**, *117*, 202-208.
- (115) Esbenshade, A. M.; Newman, J. H.; Lams, P. M.; Jolles, H.; Brigham, K. L. Respiratory failure after endotoxin infusion in sheep: lung mechanics and lung fluid balance. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **1982**, *53*, 967-976.
- (116) Cookson, W. O.; Wiseman, M. S.; Shale, D. J. Angiotensin converting enzyme and endotoxin induced lung damage in the mouse. *Thorax* **1985**, *40*, 774-777.

- (117) Villar, J.; Ribeiro, S. P.; Mullen, J. B.; Kuliszewski, M.; Post, M.; Slutsky, A. S. Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. *Crit Care Med* **1994**, *22*, 914-921.
- (118) Matute-Bello, G.; Frevert, C. W.; Kajikawa, O.; Skerrett, S. J.; Goodman, R. B.; Park, D. R.; Martin, T. R. Septic shock and acute lung injury in rabbits with peritonitis: failure of the neutrophil response to localized infection. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**, *163*, 234-243.
- (119) Kroupa, J. [Considerations on early complications in fractures of the long bones; shock, fat embolism, and crush syndrome]. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech* **1953**, *20*, 218-222.
- (120) Sherr, S.; Montemurno, R.; Raffer, P. Lipids of recovered pulmonary fat emboli following trauma. *J Trauma* **1974**, *14*, 242-246.
- (121) Levy, D. The fat embolism syndrome. A review. *Clin Orthop Relat Res* **1990**, 281-286.
- (122) Hiss, J.; Kahana, T.; Kugel, C. Beaten to death: why do they die? *J Trauma* **1996**, *40*, 27-30.
- (123) Boezaart, A. P.; Clinton, C. W.; Braun, S.; Oettle, C.; Lee, N. P. Fulminant adult respiratory distress syndrome after suction lipectomy. A case report. *S Afr Med J* **1990**, *78*, 693-695.
- (124) McCarthy, M. C.; Cottam, G. L.; Turner, W. W., Jr. Essential fatty acid deficiency in critically ill surgical patients. *Am J Surg* **1981**, *142*, 747-751.
- (125) Márton, D. A.; Cavagna, A.; Grigera, T. S. Specific Heat Anomaly in a Supercooled Liquid with Amorphous Boundary Conditions. *Phys Rev Lett* **2015**, *114*, 225901.
- (126) Hofmann, S.; Huemer, G.; Salzer, M. Pathophysiology and management of the fat embolism syndrome. *Anaesthesia* **1998**, *53 Suppl 2*, 35-37.
- (127) Husebye, E. E.; Lyberg, T.; Røise, O. Bone marrow fat in the circulation: clinical entities and pathophysiological mechanisms. *Injury* **2006**, *37 Suppl 4*, S8-18.
- (128) Schuster, D. P. ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **1994**, *149*, 245-260.
- (129) Yamaguchi, K.; Mori, M.; Kawai, A.; Asano, K.; Takasugi, T.; Umeda, A.; Yokoyama, T. Attenuation of hypoxic pulmonary vasoconstriction in acute oleic acid lung injury--significance of vasodilator prostanoids. *Adv Exp Med Biol* **1992**, *316*, 299-309.
- (130) Beilman, G. Pathogenesis of oleic acid-induced lung injury in the rat: distribution of oleic acid during injury and early endothelial cell changes. *Lipids* **1995**, *30*, 817-823.
- (131) Motohiro, A.; Furukawa, T.; Yasumoto, K.; Inokuchi, K. Mechanisms involved in acute lung edema induced in dogs by oleic acid. *Eur Surg Res* **1986**, *18*, 50-57.
- (132) Julien, M.; Hoeffel, J. M.; Flick, M. R. Oleic acid lung injury in sheep. *J Appl Physiol (1985)* **1986**, *60*, 433-440.
- (133) Rosenthal, C.; Caronia, C.; Quinn, C.; Lugo, N.; Sagy, M. A comparison among animal models of acute lung injury. *Crit Care Med* **1998**, *26*, 912-916.
- (134) Quinlan, G. J.; Lamb, N. J.; Evans, T. W.; Gutteridge, J. M. Plasma fatty acid changes and increased lipid peroxidation in patients with adult respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* **1996**, *24*, 241-246.
- (135) Schmidt, R.; Meier, U.; Yabut-Perez, M.; Walmrath, D.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Günther, A. Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* **2001**, *163*, 95-100.
- (136) Arbibe, L.; Koumanov, K.; Vial, D.; Rougeot, C.; Faure, G.; Havet, N.; Longacre, S.; Vargaftig, B. B.; Béréziat, G.; Voelker, D. R.; Wolf, C.; Touqui, L. Generation of lyso-phospholipids from surfactant in acute lung injury is mediated by type-II phospholipase

A2 and inhibited by a direct surfactant protein A-phospholipase A2 protein interaction. *J Clin Invest* **1998**, *102*, 1152-1160.

(137) Bursten, S. L.; Federighi, D. A.; Parsons, P.; Harris, W. E.; Abraham, E.; Moore, E. E., Jr.; Moore, F. A.; Bianco, J. A.; Singer, J. W.; Repine, J. E. An increase in serum C18 unsaturated free fatty acids as a predictor of the development of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* **1996**, *24*, 1129-1136.

(138) Hall, J. E. Control of blood pressure by the renin-angiotensin-aldosterone system. *Clin Cardiol* **1991**, *14*, IV6-21; discussion IV51-25.

(139) Paul, M.; Poyan Mehr, A.; Kreutz, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* **2006**, *86*, 747-803.

(140) Corvol, P.; Michaud, A.; Soubrier, F.; Williams, T. A. Recent advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *J Hypertens Suppl* **1995**, *13*, S3-10.

(141) Donoghue, M.; Hsieh, F.; Baronas, E.; Godbout, K.; Gosselin, M.; Stagliano, N.; Donovan, M.; Woolf, B.; Robison, K.; Jeyaseelan, R.; Breitbart, R. E.; Acton, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* **2000**, *87*, E1-9.

(142) Ryan, J. W.; Ryan, U. S.; Schultz, D. R.; Whitaker, C.; Chung, A. Subcellular localization of pulmonary antiotensin-converting enzyme (kininase II). *Biochem J* **1975**, *146*, 497-499.

(143) Erdős, E. G. Angiotensin I converting enzyme and the changes in our concepts through the years. Lewis K. Dahl memorial lecture. *Hypertension* **1990**, *16*, 363-370.

(144) Tipnis, S. R.; Hooper, N. M.; Hyde, R.; Karran, E.; Christie, G.; Turner, A. J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 33238-33243.

(145) Vickers, C.; Hales, P.; Kaushik, V.; Dick, L.; Gavin, J.; Tang, J.; Godbout, K.; Parsons, T.; Baronas, E.; Hsieh, F.; Acton, S.; Patane, M.; Nichols, A.; Tummino, P. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 14838-14843.

(146) Warner, F. J.; Lew, R. A.; Smith, A. I.; Lambert, D. W.; Hooper, N. M.; Turner, A. J. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), but not ACE, is preferentially localized to the apical surface of polarized kidney cells. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 39353-39362.

(147) Allred, A. J.; Diz, D. I.; Ferrario, C. M.; Chappell, M. C. Pathways for angiotensin-(1--7) metabolism in pulmonary and renal tissues. *Am J Physiol Renal Physiol* **2000**, *279*, F841-850.

(148) Ferreira, A. J.; Shenoy, V.; Qi, Y.; Fraga-Silva, R. A.; Santos, R. A.; Katovich, M. J.; Raizada, M. K. Angiotensin-converting enzyme 2 activation protects against hypertension-induced cardiac fibrosis involving extracellular signal-regulated kinases. *Exp Physiol* **2011**, *96*, 287-294.

(149) Huentelman, M. J.; Grobe, J. L.; Vazquez, J.; Stewart, J. M.; Mecca, A. P.; Katovich, M. J.; Ferrario, C. M.; Raizada, M. K. Protection from angiotensin II-induced cardiac hypertrophy and fibrosis by systemic lentiviral delivery of ACE2 in rats. *Exp Physiol* **2005**, *90*, 783-790.

(150) Imai, Y.; Kuba, K.; Rao, S.; Huan, Y.; Guo, F.; Guan, B.; Yang, P.; Sarao, R.; Wada, T.; Leong-Poi, H.; Crackower, M. A.; Fukamizu, A.; Hui, C. C.; Hein, L.; Uhlig, S.; Slutsky, A. S.; Jiang, C.; Penninger, J. M. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* **2005**, *436*, 112-116.

(151) Page, I. H. On the Nature of the Pressor Action of Renin. *J Exp Med* **1939**, *70*, 521-542.

(152) Braun-Menendez, E.; Fasciolo, J. C.; Leloir, L. F.; Munoz, J. M. The substance causing renal hypertension. *J Physiol* **1940**, *98*, 283-298.

- (153) Peach, M. J. Renin-angiotensin system: biochemistry and mechanisms of action. *Physiol Rev* **1977**, *57*, 313-370.
- (154) Wang, R.; Alam, G.; Zagariya, A.; Gidea, C.; Pinillos, H.; Lalude, O.; Choudhary, G.; Oezatalay, D.; Uhal, B. D. Apoptosis of lung epithelial cells in response to TNF-alpha requires angiotensin II generation de novo. *J Cell Physiol* **2000**, *185*, 253-259.
- (155) Williams, B.; Baker, A. Q.; Gallacher, B.; Lodwick, D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells. *Hypertension* **1995**, *25*, 913-917.
- (156) Sakuta, T.; Morita, Y.; Satoh, M.; Fox, D. A.; Kashihara, N. Involvement of the renin-angiotensin system in the development of vascular damage in a rat model of arthritis: effect of angiotensin receptor blockers. *Arthritis Rheum* **2010**, *62*, 1319-1328.
- (157) Mateo, T.; Abu Nabah, Y. N.; Abu Taha, M.; Mata, M.; Cerdá-Nicolás, M.; Proudfoot, A. E.; Stahl, R. A.; Issekutz, A. C.; Cortijo, J.; Morcillo, E. J.; Jose, P. J.; Sanz, M. J. Angiotensin II-induced mononuclear leukocyte interactions with arteriolar and venular endothelium are mediated by the release of different CC chemokines. *J Immunol* **2006**, *176*, 5577-5586.
- (158) Nabah, Y. N.; Mateo, T.; Estellés, R.; Mata, M.; Zagorski, J.; Sarau, H.; Cortijo, J.; Morcillo, E. J.; Jose, P. J.; Sanz, M. J. Angiotensin II induces neutrophil accumulation in vivo through generation and release of CXC chemokines. *Circulation* **2004**, *110*, 3581-3586.
- (159) Hoch, N. E.; Guzik, T. J.; Chen, W.; Deans, T.; Maalouf, S. A.; Gratze, P.; Weyand, C.; Harrison, D. G. Regulation of T-cell function by endogenously produced angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **2009**, *296*, R208-216.
- (160) Alvarez, A.; Cerdá-Nicolás, M.; Naim Abu Nabah, Y.; Mata, M.; Issekutz, A. C.; Panes, J.; Lobb, R. R.; Sanz, M. J. Direct evidence of leukocyte adhesion in arterioles by angiotensin II. *Blood* **2004**, *104*, 402-408.
- (161) Piqueras, L.; Kubes, P.; Alvarez, A.; O'Connor, E.; Issekutz, A. C.; Esplugues, J. V.; Sanz, M. J. Angiotensin II induces leukocyte-endothelial cell interactions in vivo via AT(1) and AT(2) receptor-mediated P-selectin upregulation. *Circulation* **2000**, *102*, 2118-2123.
- (162) Uhal, B. D.; Li, X.; Piasecki, C. C.; Molina-Molina, M. Angiotensin signalling in pulmonary fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol* **2012**, *44*, 465-468.
- (163) Huckle, W. R.; Earp, H. S. Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. *Prog Growth Factor Res* **1994**, *5*, 177-194.
- (164) Sun, Y.; Zhang, J. Q.; Zhang, J.; Ramires, F. J. Angiotensin II, transforming growth factor-beta1 and repair in the infarcted heart. *J Mol Cell Cardiol* **1998**, *30*, 1559-1569.
- (165) Li, X.; Rayford, H.; Uhal, B. D. Essential roles for angiotensin receptor AT1a in bleomycin-induced apoptosis and lung fibrosis in mice. *Am J Pathol* **2003**, *163*, 2523-2530.
- (166) Gembardt, F.; Sterner-Kock, A.; Imboden, H.; Spalteholz, M.; Reibitz, F.; Schultheiss, H. P.; Siems, W. E.; Walther, T. Organ-specific distribution of ACE2 mRNA and correlating peptidase activity in rodents. *Peptides* **2005**, *26*, 1270-1277.
- (167) Suzuki, F.; Ludwig, G.; Hellmann, W.; Paul, M.; Lindpaintner, K.; Murakami, K.; Ganten, D. Renin gene expression in rat tissues: a new quantitative assay method for rat renin mRNA using synthetic cRNA. *Clin Exp Hypertens A* **1988**, *10*, 345-359.
- (168) Cushman, D. W.; Cheung, H. S. Concentrations of angiotensin-converting enzyme in tissues of the rat. *Biochim Biophys Acta* **1971**, *250*, 261-265.
- (169) Lindpaintner, K.; Ganten, D. Molecular biology, endocrinology, and pharmacology of the cardiac renin-angiotensin system. *Therapie* **1990**, *45*, 483-488.
- (170) Fabris, B.; Jackson, B.; Kohzuki, M.; Perich, R.; Johnston, C. I. Increased cardiac angiotensin-converting enzyme in rats with chronic heart failure. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **1990**, *17*, 309-314.

- (171) Campbell, D. J. Circulating and tissue angiotensin systems. *J Clin Invest* **1987**, *79*, 1-6.
- (172) Valencia, J. C.; Pacheco-Rodriguez, G.; Carmona, A. K.; Xavier, J.; Bruneval, P.; Riemenschneider, W. K.; Ikeda, Y.; Yu, Z. X.; Ferrans, V. J.; Moss, J. Tissue-specific renin-angiotensin system in pulmonary lymphangioliomyomatosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2006**, *35*, 40-47.
- (173) Dzau, V. J. Vascular renin-angiotensin: a possible autocrine or paracrine system in control of vascular function. *J Cardiovasc Pharmacol* **1984**, *6 Suppl 2*, S377-382.
- (174) Dzau, V. J. Vascular wall renin-angiotensin pathway in control of the circulation. A hypothesis. *Am J Med* **1984**, *77*, 31-36.
- (175) Stock, P.; Liefeldt, L.; Paul, M.; Ganten, D. Local renin-angiotensin systems in cardiovascular tissues: localization and functional role. *Cardiology* **1995**, *86 Suppl 1*, 2-8.
- (176) Dzau, V. J.; Re, R. N. Evidence for the existence of renin in the heart. *Circulation* **1987**, *75*, 1134-1136.
- (177) Ganten, D.; Hermann, K.; Unger, T.; Lang, R. E. The tissue renin-angiotensin systems: focus on brain angiotensin, adrenal gland and arterial wall. *Clin Exp Hypertens A* **1983**, *5*, 1099-1118.
- (178) Deliu, E.; Brailoiu, G. C.; Eguchi, S.; Hoffman, N. E.; Rabinowitz, J. E.; Tilley, D. G.; Madesh, M.; Koch, W. J.; Brailoiu, E. Direct evidence of intracrine angiotensin II signaling in neurons. *Am J Physiol Cell Physiol* **2014**, *306*, C736-744.
- (179) Carey, R. M.; Levens, N. R.; Peach, M. J. Studies of the functional role of the intrarenal renin-angiotensin system. *Prog Biochem Pharmacol* **1980**, *17*, 6-13.
- (180) Mendelsohn, F. A. Angiotensin II is concentrated or locally produced in rat adrenal gland. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* **1982**, *7*, 3-7.
- (181) Peters, J. Local renin-angiotensin systems in the adrenal gland. *Peptides* **2012**, *34*, 427-432.
- (182) Herr, D.; Bekes, I.; Wulff, C. Local Renin-Angiotensin system in the reproductive system. *Front Endocrinol (Lausanne)* **2013**, *4*, 150.
- (183) Okuyama, A.; Nonomura, N.; Koh, E.; Kondoh, N.; Takeyama, M.; Nakamura, M.; Namiki, M.; Fujioka, H.; Matsumoto, K.; Matsuda, M. Induction of renin-angiotensin system in human testis in vivo. *Arch Androl* **1988**, *21*, 29-35.
- (184) Chappell, M. C.; Millsted, A.; Diz, D. I.; Brosnihan, K. B.; Ferrario, C. M. Evidence for an intrinsic angiotensin system in the canine pancreas. *J Hypertens* **1991**, *9*, 751-759.
- (185) Bindom, S. M.; Hans, C. P.; Xia, H.; Boulares, A. H.; Lazartigues, E. Angiotensin I-converting enzyme type 2 (ACE2) gene therapy improves glycemic control in diabetic mice. *Diabetes* **2010**, *59*, 2540-2548.
- (186) Schling, P.; Mallow, H.; Trindl, A.; Löffler, G. Evidence for a local renin angiotensin system in primary cultured human preadipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* **1999**, *23*, 336-341.
- (187) Levens, N. R. Local control of jejunal absorption by the renin-angiotensin system. *J Cardiovasc Pharmacol* **1986**, *8 Suppl 10*, S17-22.
- (188) Santos, C. F.; Akashi, A. E.; Dionísio, T. J.; Sipert, C. R.; Didier, D. N.; Greene, A. S.; Oliveira, S. H.; Pereira, H. J.; Becari, C.; Oliveira, E. B.; Salgado, M. C. Characterization of a local renin-angiotensin system in rat gingival tissue. *J Periodontol* **2009**, *80*, 130-139.
- (189) Santos, C. F.; Morandini, A. C.; Dionísio, T. J.; Faria, F. A.; Lima, M. C.; Figueiredo, C. M.; Colombini-Ishikiriyama, B. L.; Sipert, C. R.; Maciel, R. P.; Akashi, A. P.; Souza, G. P.; Garlet, G. P.; Rodini, C. O.; Amaral, S. L.; Becari, C.; Salgado, M. C.; Oliveira, E. B.; Matus, I.; Didier, D. N.; Greene, A. S. Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. *PLoS One* **2015**, *10*, e0134601.

- (190) Re, R.; Bryan, S. E. Functional intracellular renin-angiotensin systems may exist in multiple tissues. *Clin Exp Hypertens A* **1984**, *6*, 1739-1742.
- (191) Re, R. N.; Cook, J. L. The intracrine hypothesis: an update. *Regul Pept* **2006**, *133*, 1-9.
- (192) Singh, V. P.; Baker, K. M.; Kumar, R. Activation of the intracellular renin-angiotensin system in cardiac fibroblasts by high glucose: role in extracellular matrix production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2008**, *294*, H1675-1684.
- (193) Gavras, H.; Lever, A. F.; Brown, J. J.; Macadam, R. F.; Robertson, J. I. Acute renal failure, tubular necrosis, and myocardial infarction induced in the rabbit by intravenous angiotensin II. *Lancet* **1971**, *2*, 19-22.
- (194) Strawn, W. B.; Dean, R. H.; Ferrario, C. M. Novel mechanisms linking angiotensin II and early atherogenesis. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **2000**, *1*, 11-17.
- (195) Karalliedde, J.; Viberti, G. Evidence for renoprotection by blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension and diabetes. *J Hum Hypertens* **2006**, *20*, 239-253.
- (196) Remuzzi, G.; Perico, N.; Macia, M.; Ruggenti, P. The role of renin-angiotensin-aldosterone system in the progression of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl* **2005**, S57-65.
- (197) Funatsu, H.; Yamashita, H.; Nakanishi, Y.; Hori, S. Angiotensin II and vascular endothelial growth factor in the vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol* **2002**, *86*, 311-315.
- (198) Funatsu, H.; Yamashita, H. Pathogenesis of diabetic retinopathy and the renin-angiotensin system. *Ophthalmic Physiol Opt* **2003**, *23*, 495-501.
- (199) Marchesi, C.; Paradis, P.; Schiffrin, E. L. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. *Trends Pharmacol Sci* **2008**, *29*, 367-374.
- (200) Chang, Y.; Wei, W. Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* **2015**, *179*, 137-145.
- (201) Ferrario, C. M.; Brosnihan, K. B.; Diz, D. I.; Jaiswal, N.; Khosla, M. C.; Milsted, A.; Tallant, E. A. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. *Hypertension* **1991**, *18*, III126-133.
- (202) Rice, G. I.; Thomas, D. A.; Grant, P. J.; Turner, A. J.; Hooper, N. M. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J* **2004**, *383*, 45-51.
- (203) Chappell, M. C.; Gomez, M. N.; Pirro, N. T.; Ferrario, C. M. Release of angiotensin-(1-7) from the rat hindlimb: influence of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Hypertension* **2000**, *35*, 348-352.
- (204) Yamamoto, K.; Chappell, M. C.; Brosnihan, K. B.; Ferrario, C. M. In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **1992**, *19*, 692-696.
- (205) Grobe, N.; Weir, N. M.; Leiva, O.; Ong, F. S.; Bernstein, K. E.; Schmaier, A. H.; Morris, M.; Elased, K. M. Identification of prolyl carboxypeptidase as an alternative enzyme for processing of renal angiotensin II using mass spectrometry. *Am J Physiol Cell Physiol* **2013**, *304*, C945-953.
- (206) Welches, W. R.; Brosnihan, K. B.; Ferrario, C. M. A comparison of the properties and enzymatic activities of three angiotensin processing enzymes: angiotensin converting enzyme, prolyl endopeptidase and neutral endopeptidase 24.11. *Life Sci* **1993**, *52*, 1461-1480.
- (207) Pereira, M. G.; Souza, L. L.; Becari, C.; Duarte, D. A.; Camacho, F. R.; Oliveira, J. A.; Gomes, M. D.; Oliveira, E. B.; Salgado, M. C.; Garcia-Cairasco, N.; Costa-Neto, C. M. Angiotensin II-independent angiotensin-(1-7) formation in rat hippocampus: involvement of thimet oligopeptidase. *Hypertension* **2013**, *62*, 879-885.

- (208) Kokkonen, J. O.; Saarinen, J.; Kovanen, P. T. Regulation of local angiotensin II formation in the human heart in the presence of interstitial fluid. Inhibition of chymase by protease inhibitors of interstitial fluid and of angiotensin-converting enzyme by Ang-(1-9) formed by heart carboxypeptidase A-like activity. *Circulation* **1997**, *95*, 1455-1463.
- (209) Chappell, M. C.; Pirro, N. T.; Sykes, A.; Ferrario, C. M. Metabolism of angiotensin-(1-7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension* **1998**, *31*, 362-367.
- (210) Santos, R. A.; Simoes e Silva, A. C.; Maric, C.; Silva, D. M.; Machado, R. P.; de Buhr, I.; Heringer-Walther, S.; Pinheiro, S. V.; Lopes, M. T.; Bader, M.; Mendes, E. P.; Lemos, V. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Schultheiss, H. P.; Speth, R.; Walther, T. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2003**, *100*, 8258-8263.
- (211) Ohshima, K.; Mogi, M.; Nakaoka, H.; Iwanami, J.; Min, L. J.; Kanno, H.; Tsukuda, K.; Chisaka, T.; Bai, H. Y.; Wang, X. L.; Ogimoto, A.; Higaki, J.; Horiuchi, M. Possible role of angiotensin-converting enzyme 2 and activation of angiotensin II type 2 receptor by angiotensin-(1-7) in improvement of vascular remodeling by angiotensin II type 1 receptor blockade. *Hypertension* **2014**, *63*, e53-59.
- (212) Walters, P. E.; Gaspari, T. A.; Widdop, R. E. Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension* **2005**, *45*, 960-966.
- (213) Villela, D.; Leonhardt, J.; Patel, N.; Joseph, J.; Kirsch, S.; Hallberg, A.; Unger, T.; Bader, M.; Santos, R. A.; Sumners, C.; Steckelings, U. M. Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison. *Clin Sci (Lond)* **2015**, *128*, 227-234.
- (214) Botelho-Santos, G. A.; Bader, M.; Alenina, N.; Santos, R. A. Altered regional blood flow distribution in Mas-deficient mice. *Ther Adv Cardiovasc Dis* **2012**, *6*, 201-211.
- (215) Ueda, S.; Masumori-Maemoto, S.; Wada, A.; Ishii, M.; Brosnihan, K. B.; Umemura, S. Angiotensin(1-7) potentiates bradykinin-induced vasodilatation in man. *J Hypertens* **2001**, *19*, 2001-2009.
- (216) Brosnihan, K. B.; Li, P.; Tallant, E. A.; Ferrario, C. M. Angiotensin-(1-7): a novel vasodilator of the coronary circulation. *Biol Res* **1998**, *31*, 227-234.
- (217) Brosnihan, K. B.; Li, P.; Ferrario, C. M. Angiotensin-(1-7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension* **1996**, *27*, 523-528.
- (218) Lukasewycz, O. A.; Duffey, P. S.; Murphy, W. H. Immune mechanisms in leukemia: protective capacity of the major lymphoid cell compartments. *J Immunol* **1976**, *116*, 976-981.
- (219) Hernández Prada, J. A.; Ferreira, A. J.; Katovich, M. J.; Shenoy, V.; Qi, Y.; Santos, R. A.; Castellano, R. K.; Lampkins, A. J.; Gubala, V.; Ostrov, D. A.; Raizada, M. K. Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. *Hypertension* **2008**, *51*, 1312-1317.
- (220) Iyer, S. N.; Ferrario, C. M.; Chappell, M. C. Angiotensin-(1-7) contributes to the antihypertensive effects of blockade of the renin-angiotensin system. *Hypertension* **1998**, *31*, 356-361.
- (221) Chen, L.; Xiao, J.; Li, Y.; Ma, H. Ang-(1-7) might prevent the development of monocrotaline induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **2011**, *15*, 1-7.
- (222) Shenoy, V.; Ferreira, A. J.; Qi, Y.; Fraga-Silva, R. A.; Díez-Freire, C.; Dooies, A.; Jun, J. Y.; Sriramula, S.; Mariappan, N.; Pourang, D.; Venugopal, C. S.; Francis, J.; Reudelhuber, T.; Santos, R. A.; Patel, J. M.; Raizada, M. K.; Katovich, M. J. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* **2010**, *182*, 1065-1072.
- (223) Souza, L. L.; Costa-Neto, C. M. Angiotensin-(1-7) decreases LPS-induced inflammatory response in macrophages. *J Cell Physiol* **2012**, *227*, 2117-2122.

- (224) da Silveira, K. D.; Coelho, F. M.; Vieira, A. T.; Sachs, D.; Barroso, L. C.; Costa, V. V.; Bretas, T. L.; Bader, M.; de Sousa, L. P.; da Silva, T. A.; dos Santos, R. A.; Simões e Silva, A. C.; Teixeira, M. M. Anti-inflammatory effects of the activation of the angiotensin-(1-7) receptor, MAS, in experimental models of arthritis. *J Immunol* **2010**, *185*, 5569-5576.
- (225) Meng, Y.; Yu, C. H.; Li, W.; Li, T.; Luo, W.; Huang, S.; Wu, P. S.; Cai, S. X.; Li, X. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis protects against lung fibrosis by inhibiting the MAPK/NF-kappaB pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2014**, *50*, 723-736.
- (226) Chen, Q.; Yang, Y.; Huang, Y.; Pan, C.; Liu, L.; Qiu, H. Angiotensin-(1-7) attenuates lung fibrosis by way of Mas receptor in acute lung injury. *J Surg Res* **2013**, *185*, 740-747.
- (227) Wang, K.; Hu, X.; Du, C.; Tu, S.; Zhang, F.; Xie, X. Angiotensin-(1-7) suppresses the number and function of the circulating fibrocytes by upregulating endothelial nitric oxide synthase expression. *Mol Cell Biochem* **2012**, *365*, 19-27.
- (228) Rodgers, K. E.; Roda, N.; Felix, J. E.; Espinoza, T.; Maldonado, S.; diZerega, G. Histological evaluation of the effects of angiotensin peptides on wound repair in diabetic mice. *Exp Dermatol* **2003**, *12*, 784-790.
- (229) Tesanovic, S.; Vinh, A.; Gaspari, T. A.; Casley, D.; Widdop, R. E. Vasoprotective and atheroprotective effects of angiotensin (1-7) in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2010**, *30*, 1606-1613.
- (230) Chen, J. L.; Zhang, D. L.; Sun, Y.; Zhao, Y. X.; Zhao, K. X.; Pu, D.; Xiao, Q. Angiotensin-(1-7) administration attenuates Alzheimer's disease-like neuropathology in rats with streptozotocin-induced diabetes via Mas receptor activation. *Neuroscience* **2017**, *346*, 267-277.
- (231) Kim, C. S.; Kim, I. J.; Bae, E. H.; Ma, S. K.; Lee, J.; Kim, S. W. Angiotensin-(1-7) Attenuates Kidney Injury Due to Obstructive Nephropathy in Rats. *PLoS One* **2015**, *10*, e0142664.
- (232) Pena Silva, R. A.; Kung, D. K.; Mitchell, I. J.; Alenina, N.; Bader, M.; Santos, R. A.; Faraci, F. M.; Heistad, D. D.; Hasan, D. M. Angiotensin 1-7 reduces mortality and rupture of intracranial aneurysms in mice. *Hypertension* **2014**, *64*, 362-368.
- (233) Klein, N.; Gemhardt, F.; Supé, S.; Kaestle, S. M.; Nickles, H.; Erfinanda, L.; Lei, X.; Yin, J.; Wang, L.; Mertens, M.; Szaszi, K.; Walther, T.; Kuebler, W. M. Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury. *Crit Care Med* **2013**, *41*, e334-343.
- (234) Buelmann, M.; Kong, X.; Mertens, M.; Yin, N.; Yin, J.; Liu, Z.; Koster, A.; Kuppe, H.; Kuebler, W. M. Inhaled milrinone attenuates experimental acute lung injury. *Intensive Care Med* **2009**, *35*, 171-178.
- (235) Kuebler, W. M.; Abels, C.; Schuerer, L.; Goetz, A. E. Measurement of neutrophil content in brain and lung tissue by a modified myeloperoxidase assay. *Int J Microcirc Clin Exp* **1996**, *16*, 89-97.
- (236) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-254.
- (237) Maul, B.; Siems, W. E.; Hoehe, M. R.; Grecksch, G.; Bader, M.; Walther, T. Alcohol consumption is controlled by angiotensin II. *FASEB J* **2001**, *15*, 1640-1642.
- (238) Curtis, M. J.; Bond, R. A.; Spina, D.; Ahluwalia, A.; Alexander, S. P.; Giembycz, M. A.; Gilchrist, A.; Hoyer, D.; Insel, P. A.; Izzo, A. A.; Lawrence, A. J.; MacEwan, D. J.; Moon, L. D.; Wonnacott, S.; Weston, A. H.; McGrath, J. C. Experimental design and analysis and their reporting: new guidance for publication in BJP. *Br J Pharmacol* **2015**, *172*, 3461-3471.
- (239) Sauerstoffsättigung.
<http://flexikon.doccheck.com/de/Sauerstoffs%C3%A4ttigung> (Stand 26.03.2017).

- (240) Blutgasanalyse. <http://flexikon.doccheck.com/de/Blutgasanalyse> (Stand 30.03.2017).
- (241) Dickey, B. F.; Thrall, R. S.; McCormick, J. R.; Ward, P. A. Oleic-acid-induced lung injury in the rat. Failure of indomethacin treatment or complement depletion to ablate lung injury. *Am J Pathol* **1981**, *103*, 376-383.
- (242) Wang, H. M.; Bodenstern, M.; Markstaller, K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *Eur Surg Res* **2008**, *40*, 305-316.
- (243) Albrecht, M.; Henke, J.; Tacke, S.; Markert, M.; Guth, B. Influence of repeated anaesthesia on physiological parameters in male Wistar rats: a telemetric study about isoflurane, ketamine-xylazine and a combination of medetomidine, midazolam and fentanyl. *BMC Vet Res* **2014**, *10*, 310.
- (244) Pinhu, L.; Whitehead, T.; Evans, T.; Griffiths, M. Ventilator-associated lung injury. *Lancet* **2003**, *361*, 332-340.
- (245) Güldner, A.; Braune, A.; Ball, L.; Silva, P. L.; Samary, C.; Insorsi, A.; Huhle, R.; Rentzsch, I.; Becker, C.; Oehme, L.; Andreeff, M.; Vidal Melo, M. F.; Winkler, T.; Pelosi, P.; Rocco, P. R.; Kotzerke, J.; Gama de Abreu, M. Comparative Effects of Volutrauma and Atelectrauma on Lung Inflammation in Experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Crit Care Med* **2016**, *44*, e854-865.
- (246) Determann, R. M.; Royakkers, A.; Wolthuis, E. K.; Vlaar, A. P.; Choi, G.; Paulus, F.; Hofstra, J. J.; de Graaff, M. J.; Korevaar, J. C.; Schultz, M. J. Ventilation with lower tidal volumes as compared with conventional tidal volumes for patients without acute lung injury: a preventive randomized controlled trial. *Crit Care* **2010**, *14*, R1.
- (247) Uhlig, S. Ventilation-induced lung injury and mechanotransduction: stretching it too far? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2002**, *282*, L892-896.
- (248) PEEP. <http://flexikon.doccheck.com/de/PEEP> (Stand 26.09.2016).
- (249) Dräger Medical GmbH; Deden, K. Beatmungsmodi in der Intensivmedizin. <https://www.draeger.com/Library/Content/nomenklatur-bk-9066354-de.pdf> (Stand 26.09.2016).
- (250) Kuiper, J. W.; Versteilen, A. M.; Niessen, H. W.; Vaschetto, R. R.; Sipkema, P.; Heijnen, C. J.; Groeneveld, A. B.; Plötz, F. B. Production of endothelin-1 and reduced blood flow in the rat kidney during lung-injurious mechanical ventilation. *Anesth Analg* **2008**, *107*, 1276-1283.
- (251) Wösten-van Asperen, R. M.; Lutter, R.; Specht, P. A.; van Woensel, J. B.; van der Loos, C. M.; Florquin, S.; Lachmann, B.; Bos, A. P. Ventilator-induced inflammatory response in lipopolysaccharide-exposed rat lung is mediated by angiotensin-converting enzyme. *Am J Pathol* **2010**, *176*, 2219-2227.
- (252) Krieger, B. P.; Loomis, W. H.; Spragg, R. G. Granulocytes and hyperoxia act synergistically in causing acute lung injury. *Exp Lung Res* **1984**, *7*, 77-83.
- (253) Hussain, N.; Wu, F.; Zhu, L.; Thrall, R. S.; Kresch, M. J. Neutrophil apoptosis during the development and resolution of oleic acid-induced acute lung injury in the rat. *Am J Respir Cell Mol Biol* **1998**, *19*, 867-874.
- (254) Arbeitsanleitung IDK® MPO ELISA. http://www.immundiagnostik.com/fileadmin/pdf/MPO_Serum%20Plasma_2h_25_K6631B.pdf (Stand 30.03.2017).
- (255) Reinhold, P.; Costabel, U.; Hamacher, J.; Theegarten, D.; Rosenbruch, M. [Broncho-alveolar lavage in humans and animals -- comparative aspects]. *Pneumologie* **2005**, *59*, 485-501.
- (256) Lu, W.; Kang, J.; Hu, K.; Tang, S.; Zhou, X.; Yu, S.; Li, Y.; Xu, L. Angiotensin-(1-7) inhibits inflammation and oxidative stress to relieve lung injury induced by chronic intermittent hypoxia in rats. *Braz J Med Biol Res* **2016**, *49*, e5431.

- (257) Zambelli, V.; Bellani, G.; Borsa, R.; Pozzi, F.; Grassi, A.; Scanziani, M.; Castiglioni, V.; Masson, S.; Decio, A.; Laffey, J. G.; Latini, R.; Pesenti, A. Angiotensin-(1-7) improves oxygenation, while reducing cellular infiltrate and fibrosis in experimental Acute Respiratory Distress Syndrome. *Intensive Care Med Exp* **2015**, *3*, 44.
- (258) Devitt, H. H.; Burka, J. F.; Jones, R.; Amy, R. W.; King, E. G. Hemodynamic and pathologic effects of prostacyclin on oleic acid-induced pulmonary injury. *Surgery* **1988**, *103*, 213-220.
- (259) Schiavone, M. T.; Santos, R. A.; Brosnihan, K. B.; Khosla, M. C.; Ferrario, C. M. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1988**, *85*, 4095-4098.
- (260) Ferrario, C. M.; Santos, R. A.; Brosnihan, K. B.; Block, C. H.; Schiavone, M. T.; Khosla, M. C.; Greene, L. J. A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. *Clin Exp Hypertens A* **1988**, *10 Suppl 1*, 107-121.
- (261) Ferrario, C. M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. *Hypertension* **2006**, *47*, 515-521.
- (262) Ren, Y.; Garvin, J. L.; Carretero, O. A. Vasodilator action of angiotensin-(1-7) on isolated rabbit afferent arterioles. *Hypertension* **2002**, *39*, 799-802.
- (263) Santos, R. A. Angiotensin-(1-7). *Hypertension* **2014**, *63*, 1138-1147.
- (264) Mordwinkin, N. M.; Russell, J. R.; Burke, A. S.; diZerega, G. S.; Louie, S. G.; Rodgers, K. E. Toxicological and toxicokinetic analysis of angiotensin (1-7) in two species. *J Pharm Sci* **2012**, *101*, 373-380.
- (265) Souza, Á. P.; Sobrinho, D. B.; Almeida, J. F.; Alves, G. M.; Macedo, L. M.; Porto, J. E.; Vêncio, E. F.; Colugnati, D. B.; Santos, R. A.; Ferreira, A. J.; Mendes, E. P.; Castro, C. H. Angiotensin II type 1 receptor blockade restores angiotensin-(1-7)-induced coronary vasodilation in hypertrophic rat hearts. *Clin Sci (Lond)* **2013**, *125*, 449-459.
- (266) Sampaio, W. O.; Nascimento, A. A.; Santos, R. A. Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2003**, *284*, H1985-1994.
- (267) Zapol, W. M.; Jones, R. Vascular components of ARDS. Clinical pulmonary hemodynamics and morphology. *Am Rev Respir Dis* **1987**, *136*, 471-474.
- (268) Zapol, W. M.; Snider, M. T. Pulmonary hypertension in severe acute respiratory failure. *N Engl J Med* **1977**, *296*, 476-480.
- (269) Beiderlinden, M.; Kuehl, H.; Boes, T.; Peters, J. Prevalence of pulmonary hypertension associated with severe acute respiratory distress syndrome: predictive value of computed tomography. *Intensive Care Med* **2006**, *32*, 852-857.
- (270) Villar, J.; Blazquez, M. A.; Lubillo, S.; Quintana, J.; Manzano, J. L. Pulmonary hypertension in acute respiratory failure. *Crit Care Med* **1989**, *17*, 523-526.
- (271) Bull, T. M.; Clark, B.; McFann, K.; Moss, M.; National Institutes of Health/National Heart, L.; Blood Institute, A. N. Pulmonary vascular dysfunction is associated with poor outcomes in patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **2010**, *182*, 1123-1128.
- (272) Squara, P.; Dhainaut, J. F.; Artigas, A.; Carlet, J. Hemodynamic profile in severe ARDS: results of the European Collaborative ARDS Study. *Intensive Care Med* **1998**, *24*, 1018-1028.
- (273) Osman, D.; Monnet, X.; Castelain, V.; Anguel, N.; Warszawski, J.; Teboul, J. L.; Richard, C.; French Pulmonary Artery Catheter Study, G. Incidence and prognostic value of right ventricular failure in acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med* **2009**, *35*, 69-76.
- (274) Levi, M.; ten Cate, H.; van der Poll, T. Endothelium: interface between coagulation and inflammation. *Crit Care Med* **2002**, *30*, S220-224.

- (275) Tomashefski, J. F., Jr.; Davies, P.; Boggis, C.; Greene, R.; Zapol, W. M.; Reid, L. M. The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome. *Am J Pathol* **1983**, *112*, 112-126.
- (276) Benzing, A.; Mols, G.; Brieschal, T.; Geiger, K. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in nonventilated lung areas contributes to differences in hemodynamic and gas exchange responses to inhalation of nitric oxide. *Anesthesiology* **1997**, *86*, 1254-1261.
- (277) Brimiouille, S.; LeJeune, P.; Naeije, R. Effects of hypoxic pulmonary vasoconstriction on pulmonary gas exchange. *J Appl Physiol (1985)* **1996**, *81*, 1535-1543.
- (278) Myers, P. R.; Parker, J. L.; Tanner, M. A.; Adams, H. R. Effects of cytokines tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta on endotoxin-mediated inhibition of endothelium-derived relaxing factor bioactivity and nitric oxide production in vascular endothelium. *Shock* **1994**, *1*, 73-78.
- (279) Rossi, P.; Persson, B.; Boels, P. J.; Arner, A.; Weitzberg, E.; Oldner, A. Endotoxemic pulmonary hypertension is largely mediated by endothelin-induced venous constriction. *Intensive Care Med* **2008**, *34*, 873-880.
- (280) Kiely, D. G.; Cargill, R. I.; Wheeldon, N. M.; Coutie, W. J.; Lipworth, B. J. Haemodynamic and endocrine effects of type 1 angiotensin II receptor blockade in patients with hypoxaemic cor pulmonale. *Cardiovasc Res* **1997**, *33*, 201-208.
- (281) Price, L. C.; McAuley, D. F.; Marino, P. S.; Finney, S. J.; Griffiths, M. J.; Wort, S. J. Pathophysiology of pulmonary hypertension in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2012**, *302*, L803-815.
- (282) Supé, S.; Kohse, F.; Gembardt, F.; Kuebler, W. M.; Walther, T. Therapeutic time window for angiotensin-(1-7) in acute lung injury. *Br J Pharmacol* **2016**, *173*, 1618-1628.
- (283) Gust, R.; Kozłowski, J.; Stephenson, A. H.; Schuster, D. P. Synergistic hemodynamic effects of low-dose endotoxin and acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* **1998**, *157*, 1919-1926.
- (284) Brimiouille, S.; Julien, V.; Gust, R.; Kozłowski, J. K.; Naeije, R.; Schuster, D. P. Importance of hypoxic vasoconstriction in maintaining oxygenation during acute lung injury. *Crit Care Med* **2002**, *30*, 874-880.
- (285) Ulrich, K.; Stern, M.; Goddard, M. E.; Williams, J.; Zhu, J.; Dewar, A.; Painter, H. A.; Jeffery, P. K.; Gill, D. R.; Hyde, S. C.; Geddes, D. M.; Takata, M.; Alton, E. W. Keratinocyte growth factor therapy in murine oleic acid-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2005**, *288*, L1179-1192.
- (286) Derks, C. M.; Jacobovitz-Derks, D. Embolic pneumopathy induced by oleic acid. A systematic morphologic study. *Am J Pathol* **1977**, *87*, 143-158.
- (287) Sartori, C.; Allemann, Y.; Scherrer, U. Pathogenesis of pulmonary edema: learning from high-altitude pulmonary edema. *Respir Physiol Neurobiol* **2007**, *159*, 338-349.
- (288) Chen, H. I.; Hsieh, N. K.; Kao, S. J.; Su, C. F. Protective effects of propofol on acute lung injury induced by oleic acid in conscious rats. *Crit Care Med* **2008**, *36*, 1214-1221.
- (289) Cassiano Silveira, A. P.; Vento, D. A.; Albuquerque, A. A.; Celotto, A. C.; Tefé-Silva, C.; Ramos, S. G.; Rubens de Nadai, T.; Rodrigues, A. J.; Poli-Neto, O. B.; Evora, P. R. Effects of methylene blue in acute lung injury induced by oleic acid in rats. *Ann Transl Med* **2016**, *4*, 8.
- (290) Matute-Bello, G.; Downey, G.; Moore, B. B.; Groshong, S. D.; Matthay, M. A.; Slutsky, A. S.; Kuebler, W. M.; Acute Lung Injury in Animals Study, G. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol* **2011**, *44*, 725-738.
- (291) Whited, L.; Graham, D. D.: Abnormal Respirations. In *StatPearls: Treasure Island (FL)*, 2018.
- (292) Faith, M.; Sukumaran, A.; Pulimood, A. B.; Jacob, M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? *Clin Chim Acta* **2008**, *396*, 23-25.

- (293) Mühling, J.; Fuchs, M.; Campos, M.; Gonter, J.; Sablotzki, A.; Engel, J.; Welters, I. D.; Wolff, M.; Matejec, R.; Dehne, M. G.; Menges, T.; Krüll, M.; Hempelmann, G. Effects of ornithine on neutrophil (PMN) free amino acid and alpha-keto acid profiles and immune functions in vitro. *Amino Acids* **2004**, *27*, 313-319.
- (294) Basher, F.; Fan, H.; Zingarelli, B.; Borg, K. T.; Luttrell, L. M.; Tempel, G. E.; Halushka, P. V.; Cook, J. A. beta-Arrestin 2: a Negative Regulator of Inflammatory Responses in Polymorphonuclear Leukocytes. *Int J Clin Exp Med* **2008**, *1*, 32-41.
- (295) Muller, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest* **2002**, *82*, 521-533.
- (296) Marchesi, V. T. The site of leucocyte emigration during inflammation. *Q J Exp Physiol Cogn Med Sci* **1961**, *46*, 115-118.
- (297) Ognibene, F. P.; Martin, S. E.; Parker, M. M.; Schlesinger, T.; Roach, P.; Burch, C.; Shelhamer, J. H.; Parrillo, J. E. Adult respiratory distress syndrome in patients with severe neutropenia. *N Engl J Med* **1986**, *315*, 547-551.
- (298) Reutershan, J.; Morris, M. A.; Burcin, T. L.; Smith, D. F.; Chang, D.; Saprito, M. S.; Ley, K. Critical role of endothelial CXCR2 in LPS-induced neutrophil migration into the lung. *J Clin Invest* **2006**, *116*, 695-702.
- (299) Ito, K.; Mizutani, A.; Kira, S.; Mori, M.; Iwasaka, H.; Noguchi, T. Effect of Ulinastatin, a human urinary trypsin inhibitor, on the oleic acid-induced acute lung injury in rats via the inhibition of activated leukocytes. *Injury* **2005**, *36*, 387-394.
- (300) Syrbu, S.; Thrall, R. S.; Wisniecki, P.; Lifchez, S.; Smilowitz, H. M. Increased immunoreactive rat lung ICAM-1 in oleic acid-induced lung injury. *Exp Lung Res* **1995**, *21*, 599-616.
- (301) Gonçalves-de-Albuquerque, C. F.; Silva, A. R.; Burth, P.; de Moraes, I. M.; Oliveira, F. M.; Younes-Ibrahim, M.; dos Santos Mda, C.; D'Ávila, H.; Bozza, P. T.; Faria Neto, H. C.; Faria, M. V. Oleic acid induces lung injury in mice through activation of the ERK pathway. *Mediators Inflamm* **2012**, *2012*, 956509.
- (302) Vadász, I.; Morty, R. E.; Kohstall, M. G.; Olschewski, A.; Grimminger, F.; Seeger, W.; Ghofrani, H. A. Oleic acid inhibits alveolar fluid reabsorption: a role in acute respiratory distress syndrome? *Am J Respir Crit Care Med* **2005**, *171*, 469-479.
- (303) Nie, H. G.; Chen, L.; Han, D. Y.; Li, J.; Song, W. F.; Wei, S. P.; Fang, X. H.; Gu, X.; Matalon, S.; Ji, H. L. Regulation of epithelial sodium channels by cGMP/PKGII. *J Physiol* **2009**, *587*, 2663-2676.
- (304) Sartori, C.; Matthay, M. A.; Scherrer, U. Transepithelial sodium and water transport in the lung. Major player and novel therapeutic target in pulmonary edema. *Adv Exp Med Biol* **2001**, *502*, 315-338.
- (305) Ehrhart, I. C.; Hofman, W. F. Oleic acid dose-related edema in isolated canine lung perfused at constant pressure. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol* **1981**, *50*, 1115-1120.
- (306) Klein, N.; Gemhardt, F.; Supe, S.; Kaestle, S. M.; Nickles, H.; Erfinanda, L.; Lei, X.; Yin, J.; Wang, L.; Mertens, M.; Szaszi, K.; Walther, T.; Kuebler, W. M. Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury. *Crit Care Med* **2013**, *41*, e334-343.
- (307) Zhu, Y. B.; Zhang, Y. B.; Liu, D. H.; Li, X. F.; Liu, A. J.; Fan, X. M.; Qiao, C. H.; Ling, F.; Liu, Y. L. Atrial natriuretic peptide attenuates inflammatory responses on oleic acid-induced acute lung injury model in rats. *Chin Med J (Engl)* **2013**, *126*, 747-750.
- (308) Abd-Allah, S. H.; Shalaby, S. M.; Abd-Elbary, E.; Saleh, A. A.; El-Magd, M. A. Human peripheral blood CD34+ cells attenuate oleic acid-induced acute lung injury in rats. *Cytotherapy* **2015**, *17*, 443-453.
- (309) Liu, C.; Zhang, H.; Cheng, P. Y.; Zhou, F. C. [The influence of pre-B-cell colony enhancing factor on adhesive molecule in pulmonary cells in rats with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* **2013**, *25*, 159-163.

- (310) Parsons, P. E.; Matthay, M. A.; Ware, L. B.; Eisner, M. D.; National Heart, L. B. I. A. R. D. S. C. T. N. Elevated plasma levels of soluble TNF receptors are associated with morbidity and mortality in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **2005**, *288*, L426-431.
- (311) Idell, S.; Kueppers, F.; Lippmann, M.; Rosen, H.; Niederman, M.; Fein, A. Angiotensin converting enzyme in bronchoalveolar lavage in ARDS. *Chest* **1987**, *91*, 52-56.
- (312) Wösten-van Asperen, R. M.; Lutter, R.; Specht, P. A.; Moll, G. N.; van Woensel, J. B.; van der Loos, C. M.; van Goor, H.; Kamilic, J.; Florquin, S.; Bos, A. P. Acute respiratory distress syndrome leads to reduced ratio of ACE/ACE2 activities and is prevented by angiotensin-(1-7) or an angiotensin II receptor antagonist. *J Pathol* **2011**, *225*, 618-627.
- (313) Nukiwa, T.; Matsuoka, R.; Takagi, H.; Ishii, Y.; Arai, T.; Kira, S. Responses of serum and lung angiotensin-converting enzyme activities in the early phase of pulmonary damage induced by oleic acid in dogs. *Am Rev Respir Dis* **1982**, *126*, 1080-1086.
- (314) Hanafy, S.; Tavasoli, M.; Jamali, F. Inflammation alters angiotensin converting enzymes (ACE and ACE-2) balance in rat heart. *Inflammation* **2011**, *34*, 609-613.
- (315) Tikellis, C.; Johnston, C. I.; Forbes, J. M.; Burns, W. C.; Burrell, L. M.; Risvanis, J.; Cooper, M. E. Characterization of renal angiotensin-converting enzyme 2 in diabetic nephropathy. *Hypertension* **2003**, *41*, 392-397.
- (316) Liu, R.; Qi, H.; Wang, J.; Wang, Y.; Cui, L.; Wen, Y.; Yin, C. Angiotensin-converting enzyme (ACE and ACE2) imbalance correlates with the severity of cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Exp Physiol* **2014**, *99*, 651-663.
- (317) Li, Y.; Cao, Y.; Zeng, Z.; Liang, M.; Xue, Y.; Xi, C.; Zhou, M.; Jiang, W. Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/Mas axis prevents lipopolysaccharide-induced apoptosis of pulmonary microvascular endothelial cells by inhibiting JNK/NF-kappaB pathways. *Sci Rep* **2015**, *5*, 8209.
- (318) Chen, L. N.; Yang, X. H.; Nissen, D. H.; Chen, Y. Y.; Wang, L. J.; Wang, J. H.; Gao, J. L.; Zhang, L. Y. Dysregulated renin-angiotensin system contributes to acute lung injury caused by hind-limb ischemia-reperfusion in mice. *Shock* **2013**, *40*, 420-429.
- (319) Sukumaran, V.; Veeraveedu, P. T.; Gurusamy, N.; Yamaguchi, K.; Lakshmanan, A. P.; Ma, M.; Suzuki, K.; Kodama, M.; Watanabe, K. Cardioprotective effects of telmisartan against heart failure in rats induced by experimental autoimmune myocarditis through the modulation of angiotensin-converting enzyme-2/angiotensin 1-7/mas receptor axis. *Int J Biol Sci* **2011**, *7*, 1077-1092.
- (320) Wösten-van Asperen, R. M.; Lutter, R.; Haitsma, J. J.; Merkus, M. P.; van Woensel, J. B.; van der Loos, C. M.; Florquin, S.; Lachmann, B.; Bos, A. P. ACE mediates ventilator-induced lung injury in rats via angiotensin II but not bradykinin. *Eur Respir J* **2008**, *31*, 363-371.
- (321) Deddish, P. A.; Marcic, B.; Jackman, H. L.; Wang, H. Z.; Skidgel, R. A.; Erdös, E. G. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. *Hypertension* **1998**, *31*, 912-917.
- (322) Jessup, J. A.; Gallagher, P. E.; Averill, D. B.; Brosnihan, K. B.; Tallant, E. A.; Chappell, M. C.; Ferrario, C. M. Effect of angiotensin II blockade on a new congenic model of hypertension derived from transgenic Ren-2 rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2006**, *291*, H2166-2172.
- (323) Arastéh, K.: *Duale Reihe Innere Medizin*; Thieme: Stuttgart, 2012; Vol. 3.; pp. 364.
- (324) Zhang, H.; Neuhöfer, P.; Song, L.; Rabe, B.; Lesina, M.; Kurkowski, M. U.; Treiber, M.; Wartmann, T.; Regnér, S.; Thorlacius, H.; Saur, D.; Weirich, G.; Yoshimura, A.; Halangk, W.; Mizgerd, J. P.; Schmid, R. M.; Rose-John, S.; Algül, H. IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality. *J Clin Invest* **2013**, *123*, 1019-1031.

- (325) Brower, R. G.; Lancken, P. N.; MacIntyre, N.; Matthay, M. A.; Morris, A.; Ancukiewicz, M.; Schoenfeld, D.; Thompson, B. T.; National Heart, L.; Blood Institute, A. C. T. N. Higher versus lower positive end-expiratory pressures in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* **2004**, *351*, 327-336.
- (326) Wang, J.; Liu, R.; Qi, H.; Wang, Y.; Cui, L.; Wen, Y.; Li, H.; Yin, C. The ACE2-angiotensin-(1-7)-Mas axis protects against pancreatic cell damage in cell culture. *Pancreas* **2015**, *44*, 266-272.
- (327) Khajah, M. A.; Fateel, M. M.; Ananthalakshmi, K. V.; Luqmani, Y. A. Anti-Inflammatory Action of Angiotensin 1-7 in Experimental Colitis. *PLoS One* **2016**, *11*, e0150861.
- (328) Rogers, K.; DiZerega, G. Use of Angiotensin- II (1-7) in cell transplantation and as an agent for preventing/treating norovirus infection WO/2012/021578
- (329) Ellefson, D. D.; diZerega, G. S.; Espinoza, T.; Roda, N.; Maldonado, S.; Rodgers, K. E. Synergistic effects of co-administration of angiotensin 1-7 and Neupogen on hematopoietic recovery in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* **2004**, *53*, 15-24.
- (330) Rodgers, K. E.; Oliver, J.; diZerega, G. S. Phase I/II dose escalation study of angiotensin 1-7 [A(1-7)] administered before and after chemotherapy in patients with newly diagnosed breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **2006**, *57*, 559-568.
- (331) Pham, H.; Schwartz, B. M.; Delmore, J. E.; Reed, E.; Cruickshank, S.; Drummond, L.; Rodgers, K. E.; Peterson, K. J.; diZerega, G. S. Pharmacodynamic stimulation of thrombogenesis by angiotensin (1-7) in recurrent ovarian cancer patients receiving gemcitabine and platinum-based chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol* **2013**, *71*, 965-972.
- (332) Ambühl, P.; Felix, D.; Khosla, M. C. [7-D-ALA]-angiotensin-(1-7): selective antagonism of angiotensin-(1-7) in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res Bull* **1994**, *35*, 289-291.
- (333) Bayorh, M. A.; Eatman, D.; Walton, M.; Socci, R. R.; Thierry-Palmer, M.; Emmett, N. 1A-779 attenuates angiotensin-(1-7) depressor response in salt-induced hypertensive rats. *Peptides* **2002**, *23*, 57-64.
- (334) Feterik, K.; Smith, L.; Katusic, Z. S. Angiotensin-(1-7) causes endothelium-dependent relaxation in canine middle cerebral artery. *Brain Res* **2000**, *873*, 75-82.
- (335) Santos, R. A.; Haibara, A. S.; Campagnole-Santos, M. J.; Simões e Silva, A. C.; Paula, R. D.; Pinheiro, S. V.; Leite, M. F.; Lemos, V. S.; Silva, D. M.; Guerra, M. T.; Khosla, M. C. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). *Hypertension* **2003**, *41*, 737-743.
- (336) Silva, D. M.; Vianna, H. R.; Cortes, S. F.; Campagnole-Santos, M. J.; Santos, R. A.; Lemos, V. S. Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides* **2007**, *28*, 702-707.
- (337) Walther, T.; Balschun, D.; Voigt, J. P.; Fink, H.; Zuschratter, W.; Birchmeier, C.; Ganten, D.; Bader, M. Sustained long term potentiation and anxiety in mice lacking the Mas protooncogene. *J Biol Chem* **1998**, *273*, 11867-11873.
- (338) Santos, R. A.; Ferreira, A. J.; Nadu, A. P.; Braga, A. N.; de Almeida, A. P.; Campagnole-Santos, M. J.; Baltatu, O.; Iliescu, R.; Reudelhuber, T. L.; Bader, M. Expression of an angiotensin-(1-7)-producing fusion protein produces cardioprotective effects in rats. *Physiol Genomics* **2004**, *17*, 292-299.
- (339) Jawien, J.; Toton-Zuranska, J.; Kus, K.; Pawlowska, M.; Olszanecki, R.; Korbut, R. The effect of AVE 0991, nebivolol and doxycycline on inflammatory mediators in an apoE-knockout mouse model of atherosclerosis. *Med Sci Monit* **2012**, *18*, BR389-393.
- (340) Wiemer, G.; Dobrucki, L. W.; Louka, F. R.; Malinski, T.; Heitsch, H. AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension* **2002**, *40*, 847-852.

- (341) Pinheiro, S. V.; Simões e Silva, A. C.; Sampaio, W. O.; de Paula, R. D.; Mendes, E. P.; Bontempo, E. D.; Pesquero, J. B.; Walther, T.; Alenina, N.; Bader, M.; Bleich, M.; Santos, R. A. Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension* **2004**, *44*, 490-496.
- (342) Lemos, V. S.; Silva, D. M.; Walther, T.; Alenina, N.; Bader, M.; Santos, R. A. The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol* **2005**, *46*, 274-279.
- (343) Bader, M.; Santos, R. A.; Unger, T.; Steckelings, U. M. New therapeutic pathways in the RAS. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* **2012**, *13*, 505-508.
- (344) Savergnini, S. Q.; Beiman, M.; Lautner, R. Q.; de Paula-Carvalho, V.; Allahdadi, K.; Pessoa, D. C.; Costa-Fraga, F. P.; Fraga-Silva, R. A.; Cojocar, G.; Cohen, Y.; Bader, M.; de Almeida, A. P.; Rotman, G.; Santos, R. A. Vascular relaxation, antihypertensive effect, and cardioprotection of a novel peptide agonist of the MAS receptor. *Hypertension* **2010**, *56*, 112-120.
- (345) Savergnini, S. Q.; Ianzer, D.; Carvalho, M. B.; Ferreira, A. J.; Silva, G. A.; Marques, F. D.; Peluso, A. A.; Beiman, M.; Cojocar, G.; Cohen, Y.; Almeida, A. P.; Rotman, G.; Santos, R. A. The novel Mas agonist, CGEN-856S, attenuates isoproterenol-induced cardiac remodeling and myocardial infarction injury in rats. *PLoS One* **2013**, *8*, e57757.
- (346) Rodgers, K. E.; Bolton, L. L.; Verco, S.; diZerega, G. S. NorLeu3-Angiotensin (1-7) [DSC127] as a Therapy for the Healing of Diabetic Foot Ulcers. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **2015**, *4*, 339-345.
- (347) Balingit, P. P.; Armstrong, D. G.; Reyzelman, A. M.; Bolton, L.; Verco, S. J.; Rodgers, K. E.; Nigh, K. A.; diZerega, G. S. NorLeu3-A(1-7) stimulation of diabetic foot ulcer healing: results of a randomized, parallel-group, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial. *Wound Repair Regen* **2012**, *20*, 482-490.
- (348) Lula, I.; Denadai, A. L.; Resende, J. M.; de Sousa, F. B.; de Lima, G. F.; Pilo-Veloso, D.; Heine, T.; Duarte, H. A.; Santos, R. A.; Sinisterra, R. D. Study of angiotensin-(1-7) vasoactive peptide and its beta-cyclodextrin inclusion complexes: complete sequence-specific NMR assignments and structural studies. *Peptides* **2007**, *28*, 2199-2210.
- (349) Bertagnolli, M.; Casali, K. R.; De Sousa, F. B.; Rigatto, K.; Becker, L.; Santos, S. H.; Dias, L. D.; Pinto, G.; Dartora, D. R.; Schaan, B. D.; Milan, R. D.; Irigoyen, M. C.; Santos, R. A. An orally active angiotensin-(1-7) inclusion compound and exercise training produce similar cardiovascular effects in spontaneously hypertensive rats. *Peptides* **2014**, *51*, 65-73.
- (350) Santos, S. H.; Giani, J. F.; Burghi, V.; Miquet, J. G.; Qadri, F.; Braga, J. F.; Todiras, M.; Kotnik, K.; Alenina, N.; Dominici, F. P.; Santos, R. A.; Bader, M. Oral administration of angiotensin-(1-7) ameliorates type 2 diabetes in rats. *J Mol Med (Berl)* **2014**, *92*, 255-265.
- (351) Fraga-Silva, R. A.; Costa-Fraga, F. P.; De Sousa, F. B.; Alenina, N.; Bader, M.; Sinisterra, R. D.; Santos, R. A. An orally active formulation of angiotensin-(1-7) produces an antithrombotic effect. *Clinics (Sao Paulo)* **2011**, *66*, 837-841.
- (352) Fraga-Silva, R. A.; Costa-Fraga, F. P.; Savergnini, S. Q.; De Sousa, F. B.; Montecucco, F.; da Silva, D.; Sinisterra, R. D.; Mach, F.; Stergiopoulos, N.; da Silva, R. F.; Santos, R. A. An oral formulation of angiotensin-(1-7) reverses corpus cavernosum damages induced by hypercholesterolemia. *J Sex Med* **2013**, *10*, 2430-2442.
- (353) Shenoy, V.; Kwon, K. C.; Rathinasabapathy, A.; Lin, S.; Jin, G.; Song, C.; Shil, P.; Nair, A.; Qi, Y.; Li, Q.; Francis, J.; Katovich, M. J.; Daniell, H.; Raizada, M. K. Oral delivery of Angiotensin-converting enzyme 2 and Angiotensin-(1-7) bioencapsulated in plant cells attenuates pulmonary hypertension. *Hypertension* **2014**, *64*, 1248-1259.

(354) Grobe, J. L.; Sigmund, C. D. Another reason to eat your greens: cardiopulmonary protection by dietary delivery of angiotensin-converting enzyme-2 and angiotensin-(1-7) made in plants. *Hypertension* **2014**, *64*, 1182-1183.

(355) Shil, P. K.; Kwon, K. C.; Zhu, P.; Verma, A.; Daniell, H.; Li, Q. Oral delivery of ACE2/Ang-(1-7) bioencapsulated in plant cells protects against experimental uveitis and autoimmune uveoretinitis. *Mol Ther* **2014**, *22*, 2069-2082.

(356) Kluskens, L. D.; Nelemans, S. A.; Rink, R.; de Vries, L.; Meter-Arkema, A.; Wang, Y.; Walther, T.; Kuipers, A.; Moll, G. N.; Haas, M. Angiotensin-(1-7) with thioether bridge: an angiotensin-converting enzyme-resistant, potent angiotensin-(1-7) analog. *J Pharmacol Exp Ther* **2009**, *328*, 849-854.

(357) Durik, M.; van Veghel, R.; Kuipers, A.; Rink, R.; Haas Jimoh Akanbi, M.; Moll, G.; Danser, A. H.; Roks, A. J. The effect of the thioether-bridged, stabilized Angiotensin-(1-7) analogue cyclic ang-(1-7) on cardiac remodeling and endothelial function in rats with myocardial infarction. *Int J Hypertens* **2012**, *2012*, 536426.

(358) de Vries, L.; Reitzema-Klein, C. E.; Meter-Arkema, A.; van Dam, A.; Rink, R.; Moll, G. N.; Akanbi, M. H. Oral and pulmonary delivery of thioether-bridged angiotensin-(1-7). *Peptides* **2010**, *31*, 893-898.

(359) Nebenwirkung: Lungenkrebs schrumpft. <http://www.medical-tribune.de/home/news/artikeldetail/nebenwirkung-lungenkrebs-schrumpft.html> (Stand 03.10.2016).

10 Publikationsliste

Originalarbeiten:

Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury.

Klein N., Gemhardt F., **Supé S.**, Kaestle S.M., Nickles H., Erfinanda L., Lei X., Yin J., Wang L., Mertens M., Szaszi K., Walther T., Kuebler W.M. (2013).

Crit Care Med. 2013 Nov;41(11):e334-43. doi: 10.1097/CCM.0b013e31828a6688.

Therapeutic time window for angiotensin-(1-7) in acute lung injury.

Supé S., Kohse F, Gemhardt F., Kuebler W.M., Walther T.

Br J Pharmacol. 2016 May;173(10):1618-28. doi: 10.1111/bph.13462. Epub 2016 Mar 21.

11 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt und motiviert haben.

Allen voran gebührt mein Dank Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kübler für die freundliche Überlassung des hochinteressanten Themas am Institut für Physiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin. Jede Phase dieser Arbeit wurde von ihm intensiv und professionell begleitet. Darüber hinaus fand er stets die passenden Worte der Motivation und Ermutigung und unterstützte mich auch in schweren Phasen. Herzlichen Dank dafür.

Außerordentlich bedanken möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Heidrun Fink für die Übernahme der Betreuung dieser externen Doktorarbeit. Ihre Geduld und auch ihre Wegweisenden Worte haben maßgeblich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Dr. Axel R. Pries, derzeitiger Leiter des Instituts für Physiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin für die Aufnahme am Institut und Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) für die finanzielle Unterstützung dieses Projekts.

Meiner Doktorandenvorgängerin Dr. med. vet. Nadine Klein für die detaillierte Einarbeitung in die praktische Arbeit sowie Dr. Julia Hoffmann für die freundliche Aufnahme ins Team.

Des Weiteren gilt meiner großer Dank Dr. med. vet. Rudi Samapati für Nachhilfe in Mikrochirurgie, lenken meines Blickes auf das Wichtige und nicht zuletzt seelische Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt auch Frau Renate Noske-Reimers für die sachkundige und erfahrene Anleitung zu den Messungen und Auswertungen der Proteinmessungen und der Mikroskopie in stets freundlicher Atmosphäre.

Björn Hoffmann als unermüdlicher und zuverlässiger Retter in technischer Not.

Prof. Dr. med. Helmut Habazettl und Dr. med. Andreas Zakrzewicz für den ein oder anderen unmittelbaren und außerordentlich hilfreichen Tipp zwischendurch.

Mein herzlicher Dank geht auch an Dr. Beata Kirchner, die sich zwischen Job und Familie Zeit für eine mehrfache Durchsicht dieser Abhandlung genommen sowie mir Kraft und Ansporn zur Vollendung meiner Dissertation gegeben hat.

Meiner Familie für die Ermöglichung meines Studiums, offene Ohren, moralische Unterstützung und reichlich Ermutigung.

12 Finanzierungsquellen

Diese Arbeit wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (KU 1218/7-2) gefördert.
Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

13 Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 14.06.2018

Stefanie Supé