

Aus dem

CharitéCentrum 7 für Anästhesiologie und Intensivmedizin

Klinik für Anästhesiologie mit Schwerpunkt operative Intensivmedizin

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Claudia D. Spies

Habilitationsschrift

Das akute Lungenversagen des Erwachsenen (ARDS) - klinische Risikobewertung und experimentelle Intervention

zur Erlangung der Lehrbefähigung

für das Fach Anästhesiologie und Intensivmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Mario Menk

Eingereicht: Mai 2018

Dekan: Prof. Dr. med. Axel R. Pries

1.Gutachter/in: Prof. Dr. med. Vera von Dossow

2.Gutachter/in: Prof. Dr. med. Benedikt Pannen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
1. Einleitung	4
1.1 Das akute Lungenversagen des Erwachsenen (ARDS)	4
1.1.1 Definition, Prävalenz und klinische Relevanz	4
1.1.2 Pathophysiologie	4
1.1.3 Therapie und Prognose	5
1.2 Instrumente zur Bewertung von Risiko und Prognose bei ARDS	5
1.2.1 Heterogenität und klinischer Verlauf	5
1.2.2 ARDS Risikofaktoren und Scoring Systeme	6
1.2.3 Oxygenierung und abgeleitete Indices	6
1.2.4 Biomarker	7
1.3 Das akute Lungenversagen im Modell	8
1.3.1 Experimentelle Ansätze	8
1.3.2 Pulmonale Inflammation als therapeutisches Target	8
1.3.3 Renin-Angiotensin-System und akutes Lungenversagen	9
1.4 Fragestellungen und Ziele der Arbeit	10
2. Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten	13
2.1 Charakterisierung des intensivmedizinischen Verlaufs schwer kranker Patienten mit akutem Lungenversagen: Vergleich zwischen viral und bakteriell bedingtem ARDS	13
2.2 Prädiktoren von Mortalität und Morbidität bei kritisch kranken Patienten mit schwerem ARDS	22
2.3 Erythroblasten als prädiktiver Marker von Mortalität und Morbidität bei kritisch kranken Patienten mit ARDS	32
2.4 Charakterisierung der pulmonalen Inflammation in einem experimentellen Modell des schweren, akuten Lungenversagens	45
2.5 Experimentelle Untersuchungen zu anti-inflammatorischen Wirkungen des AT2 Rezeptors <i>in vitro</i>	58
2.6 Selektiver Agonismus am AT2 Rezeptor im experimentellen ARDS	69
3. Diskussion	80
3.1 Unterschiedliche ARDS Ursachen führen zu unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen	81

3.2 Risikobewertung auf der Intensivstation	82
3.3 Erythroblasten als neuer Biomarker zur Risikoabschätzung im ARDS	83
3.4 von der klinischen Risikoabschätzung zum ARDS Modell	84
3.5 AT2-Rezeptor vermittelte Hemmung der Inflammation	85
3.6 AT2-Rezeptor und akutes Lungenversagen	86
4. Zusammenfassung und Ausblick	88
5. Literaturverzeichnis	90
6. Danksagung	96
7. Eidesstattliche Erklärung	97

Abkürzungsverzeichnis

ARDS	" <i>adult respiratory distress syndrome</i> ", akutes Lungenversagen des Erwachsenen
AT1R	Angiotensin(II)-Typ 1 Rezeptor
AT2R	Angiotensin(II)-Typ 2 Rezeptor
C21	Compound 21, selektiver, nicht-peptidischer AT2R-Agonist
ECMO	" <i>extracorporeal membrane oxygenation</i> ", extrakorporale Membranoxygenierung
FiO ₂	inspiratorische Sauerstofffraktion
IL	Interleukin
NO	Stickstoffmonoxid
OI	Oxygenierungsindex (berechnet als $FiO_2/PaO_2 \cdot P_{mean}$)
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PEEP	" <i>positive end-expiratory pressure</i> ", positiver end-expiratorischer Druck
P _{mean}	" <i>mean airway pressure</i> ", mittlerer Atemwegsdruck
RAS	Renin-Angiotensin System
TNF	" <i>tumor necrosis factor</i> ", Tumornekrosefaktor

1. Einleitung

1.1 Das akute Lungenversagen des Erwachsenen (ARDS)

1.1.1 Definition, Prävalenz und klinische Relevanz

Das "Acute Respiratory Distress Syndrome" (ARDS) ist das akute Lungenversagen des Erwachsenen. Bei diesem intensivmedizinischen Krankheitsbild handelt es sich um ein rasch progredient verlaufendes Syndrom, das auf dem Boden zahlreicher verschiedener Ursachen zu einer schwerwiegenden, pulmonalen Gasaustauschstörung führt. Klinisches Leitsymptom ist die schwere, teils lebensbedrohliche, arterielle Hypoxämie. Nach der aktuellen Berlin - Definition werden in Abhängigkeit vom Ausmaß der Oxygenierungsstörung drei verschiedene Schweregrade des ARDS (mild, moderat, schwer) unterschieden (1). Die respiratorische Insuffizienz entwickelt sich innerhalb einer Woche nach einer Schädigung und ist gekennzeichnet durch beidseitige Infiltrate im Röntgen-Thorax, die nicht auf einer kardialen Ursache beruhen.

Seit der ersten Beschreibung des Syndroms 1967 durch Ashbaugh (2), hat sich das Verständnis der Pathophysiologie des ARDS und seiner Inzidenz deutlich gewandelt. Internationale Auswertungen haben gezeigt, dass bei bis zu 23% aller Beatmungspatienten auf Intensivstationen ein ARDS diagnostiziert werden kann, wenn aktuelle Definitionen angewendet werden (3). Eine Inzidenz von 5-34/100.000 Einwohnern pro Jahr wurde für Europa berichtet (4). Das ARDS hat damit eine weit höhere Prävalenz als früher angenommen. Der Stellenwert dieses intensivmedizinischen Krankheitsbildes für das Gesundheitssystem ist somit beträchtlich (5).

1.1.2 Pathophysiologie

Die Pathophysiologie des ARDS ist komplex, teilweise noch immer unvollständig verstanden und lässt sich nur schwer in einem geradlinigen Ablauf zusammenfassen. Die Störung der alveolar-kapillären Membranintegrität durch direkte oder indirekte Mechanismen ist jedoch der wesentliche Pathomechanismus bei der Entstehung eines ARDS. Als häufige und typische Ursache für ein ARDS wird die Pneumonie, die Sepsis, die Aspiration von Magensäure oder ein thorakales Trauma angesehen. Die Freisetzung spezifischer, pro-inflammatorischer Zytokine, die massive Einwanderung von neutrophilen Granulozyten und die Aktivierung von Proteasen und Chemokinen führen rasch zu einer generalisierten, pulmonalen Inflammationsreaktion (6,7). In der Folge dieser Mechanismen kommt es zum alveolären und interstitiellen Permeabilitätsödem, zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecke

für Sauerstoff und Kohlendioxid, zu einer Abnahme der zur Verfügung stehenden Gasaustauschfläche und schließlich zu einer Zunahme des intrapulmonalen Rechts-Links-Shuntvolumens. Es entwickelt sich die für das akute Lungenversagen typische Klinik mit sauerstoffrefraktärer, arterieller Hypoxämie und Hyperkapnie, die den Patienten akut vital bedrohen kann (8).

1.1.3 Therapie und Prognose

Trotz großer Fortschritte bei der Erforschung der zugrundeliegenden Pathophysiologie, existieren derzeit keine spezifischen Therapieansätze für das ARDS. So beschränkt sich die Therapie größtenteils auf eine symptomatische Behandlung und die Vermeidung einer sekundären, iatrogenen Schädigung der Lunge. Die Basis erfolgreicher Therapiekonzepte ist die Beseitigung des auslösenden Agens, eine protektive, lungenschonende Beatmung mit adäquatem positiven end-expiratorischen Druck (PEEP) und kleinen Tidalvolumina, sowie die Anwendung spezieller Lagerungsmanöver wie Bauchlagerung (9-13). Die inhalative Applikation von Stickstoffmonoxid (NO) und der Einsatz extrakorporaler Lungenersatzverfahren ergänzen die Therapie (14,15). Trotz dieser multimodalen Behandlungskonzepte ist das ARDS auch heute noch mit einer hohen Mortalität von bis zu 60% behaftet (3).

1.2 Instrumente zur Bewertung von Risiko und Prognose bei ARDS

1.2.1 Heterogenität und klinischer Verlauf

Seit der ersten Beschreibung des Syndroms hat sich die Prognose von Patienten mit akutem Lungenversagen zunächst deutlich verbessert. Insbesondere eine lungenprotektive Beatmungsstrategie mit einer Begrenzung der applizierten Spitzendrücke und Druckdifferenzen haben zu einer Reduktion der Krankenhausmortalität beitragen können (9,16). Allerdings blieb trotz einer Weiterentwicklung der modernen Behandlungsmöglichkeiten die Mortalität des ARDS in den letzten 10 Jahren weitgehend unverändert. Sie ist auch heute noch relativ hoch und insgesamt nur schwierig zu bestimmen. Die LUNG SAFE Studie zeigte für 2014 - je nach initialem Schweregrad des ARDS - Mortalitätsraten zwischen 35 und 46 % (3). Diese breite Streuung, die in klinischen Studien zum ARDS regelhaft entsteht und deren Vergleichbarkeit erschwert, liegt zum einen an den immer wieder geänderten Definitionen des Krankheitsbildes, die teils inhomogene Gruppen

von Patienten zusammenfassen. Sie liegt zum anderen jedoch auch an der breiten Heterogenität von ARDS-Patienten, deren Grunderkrankung entscheidenden Einfluss auf den klinischen Verlauf des Lungenversagens und die Mortalität hat (1,17). Da es sich beim ARDS um ein allgemeines Syndrom und nicht um eine eigene Entität handelt, kann auch die auslösende Ursache, die letztlich zum Lungenversagen führt, Einfluss auf den Verlauf und die Prognose der betroffenen Patienten nehmen. Dies führt unter Umständen zu Schwierigkeiten bei der Einschätzung des Mortalitätsrisikos des einzelnen Patienten. Große klinische Studien, die verschiedene Phänotypen des ARDS miteinander vergleichen und auch die auslösende Ursache für das ARDS miteinbeziehen, existieren derzeit nicht.

1.2.2 ARDS Risikofaktoren und Scoring Systeme

Die individuellen Faktoren, die Einfluss auf das Mortalitätsrisiko von ARDS-Patienten haben, sind in zahlreichen klinischen Studien untersucht worden (3,18). Dabei haben sich vorbestehende Grunderkrankungen der Patienten und gleichzeitig vorhandene, zusätzliche Organversagen als wichtige prädiktive Faktoren bezüglich der Mortalität herausgestellt. Weitere relevante Risikofaktoren sind das Alter der Patienten, eine bestehende Immuninkompetenz und ein schwererer Krankheitszustand bei Aufnahme auf die Intensivstation, wie eine große europäische Multicenterstudie gezeigt hat (19). Die Krankheitsschwere wird durch verschiedene intensivmedizinische Scoring Systeme wie den *Acute Physiology and Chronic Health Evaluation Score* (APACHE) oder den *Simplified Acute Organ Failure Assessment Score* (SOFA) abgebildet. Der APACHE Score ist ebenfalls für ARDS-Patienten evaluiert worden und kann relativ valide das Mortalitätsrisiko vorhersagen (20). Ein validierter intensivmedizinischer Score, der spezifisch für ARDS-Patienten das Mortalitätsrisiko beschreibt, ist bislang nicht entwickelt worden.

1.2.3 Oxygenierung und abgeleitete Indices

Es erscheint zunächst intuitiv, dass der Oxygenierungsgrad des arteriellen Blutes den Verlauf eines ARDS und das Mortalitätsrisiko vorhersagen ließe. Zahlreiche klinische Studien haben jedoch in der Vergangenheit gezeigt, dass die $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Ratio zu Beginn eines akuten Lungenversagens kaum zuverlässige Rückschlüsse auf den weiteren klinischen Verlauf eines ARDS zulässt. Dieser Index ist zwar allgemein gebräuchlich und weit verbreitet, ist aber ohne zusätzliche Angaben zur Invasivität der eingesetzten Beatmungsdrücke (zum Beispiel PEEP oder mittlerer Atemwegsdruck) nicht geeignet, den Schweregrad eines ARDS genauer zu

beschreiben. Eine multizentrische Studie kommt zu dem Schluss, dass bei einem PEEP-Level unter 10 cm H₂O eine trennscharfe Unterscheidung des Schweregrades des ARDS anhand der Oxygenierungsleistung der Lunge kaum möglich ist (21). Dennoch findet sich die PaO₂/FiO₂-Ratio als einer der wichtigsten Parameter zur Einteilung in klinische Schweregrade des ARDS in der derzeit gültigen Berlin-Definition wieder (1). Dieser Umstand erschwert in klinischen Studien die Prognoseabschätzung anhand einer kategorialen Einteilung von Patienten mit akutem Lungenversagen anhand derzeit gültiger Klassifikationen.

Der Oxygenierungsindex (OI) hingegen ist definiert als die reziproke PaO₂/FiO₂-Ratio multipliziert mit dem mittleren Atemwegsdruck ($OI = MAP \times FiO_2 \times 100 / PaO_2$; MAP=mean airway pressure). Dieser Index wurde ursprünglich für die Einschätzung des Gasaustausches pädiatrischer Patienten entwickelt (22). Nur wenige klinische Studien haben bislang den OI auf seine prognostische Wertigkeit im ARDS untersucht. In einer Studie mit 149 ARDS-Patienten war der OI der PaO₂/FiO₂-Ratio deutlich überlegen und stellte sich als unabhängiger Risikofaktor für die Mortalität im ARDS heraus (23). Weiterhin konnte in einer Studie mit pädiatrischen ARDS-Patienten gezeigt werden, dass eine Verbesserung des OI in den ersten 24 Stunden ein besseres Überleben der Patienten vorhersagte (24). Eine retrospektive Analyse von Daten von mehr als 500 erwachsenen ARDS-Patienten kam zu einem ähnlichen Ergebnis (25). Außer in der oben aufgeführten Studie, ist der OI für erwachsene ARDS-Patienten bislang nur wenig evaluiert worden. Seine Rolle in der Bewertung von Risiko und Prognose bei ARDS-Patienten ist deshalb noch nicht abschließend geklärt.

1.2.4 Biomarker

Neben der klinischen Bewertung des Gasaustausches, der Einteilung der Patienten nach verschiedenen ARDS-Definitionen oder nach intensivmedizinischen Scoring Systemen, sind in der Vergangenheit auch zahlreiche verschiedene Biomarker zur Beurteilung des Mortalitätsrisikos bei ARDS-Patienten herangezogen worden. Besonders vielversprechend sind endotheliale Marker wie der *Vascular endothelial growth factor* (VEGF) oder Inflammationsmediatoren wie Interleukin 2 und 15 (26). Diese Marker zeigten sich in Studien jeweils als unabhängige Risikofaktoren für ein erhöhtes Mortalitätsrisiko beim ARDS und sind geeignet, valide Aussagen zur Prognose dieser Patienten zu liefern. Andere verfügbare Biomarker wie zum Beispiel die Zahl an Erythroblasten im peripheren Blut, die bei septischen Intensivpatienten mit hoher prognostischer Wertigkeit das Mortalitätsrisiko vorhersagen kann, sind bislang für das ARDS nicht evaluiert worden (27). Die Rolle dieser Vorläuferzellen von Erythrozyten und anderer Biomarker als Instrument bei der Bewertung von Risiko und Prognose im ARDS ist noch unklar.

1.3 Das akute Lungenversagen im Modell

1.3.1 Experimentelle Ansätze

Trotz intensiver Forschungsbemühungen und zahlreicher, groß angelegter klinischer Studien, gibt es bislang nur wenige spezifische Therapiekonzepte für das ARDS. Spezielle pharmakologische Ansätze, die auf die zugrundeliegenden pathophysiologischen Mechanismen abzielen, stehen derzeit nicht zur Verfügung. Vor diesem Hintergrund befassen sich zahlreiche experimentelle Modelle mit dem akuten Lungenversagen (28). Sie zielen darauf ab, die Beeinträchtigung des Gasaustausches, die spezielle Pathophysiologie in der Lunge und vor allem die pulmonale Inflammation nachzubilden, die wesentlich die Entwicklung und das Voranschreiten eines akuten Lungenversagens bestimmt. Klassische ARDS Tiermodelle wie das Ölsäuremodell oder die artifizielle Aspiration von Salzsäure, schädigen primär die alveolären Membranen der Lunge und rufen sekundär ein dem akuten Lungenversagen ähnliches, klinisches und histologisches Bild hervor (29-31). Ein weiteres Modell für das akute Lungenversagen ist das von Lachmann und Kollegen vorgestellte Modell der wiederholten, pulmonalen Lavage (32). In diesem Modell führt die Depletion von alveolärem Surfactant und eine nachfolgende Beatmung mit hohen Beatmungsdrücken zur Ausbildung ausgedehnter Atelektasen, zu einem Abfall der pulmonalen Compliance und einer raschen Verschlechterung des Gasaustausches (33). Das Modell ruft reproduzierbar ein dem ARDS vergleichbares histologisches Schädigungsbild in der Lunge hervor. Im Gegensatz zu anderen Modellen des akuten Lungenversagens findet hier jedoch keine zusätzliche Applikation pro-inflammatorischer Substanzen statt. Obwohl das Lavagemodell weite Verbreitung in der ARDS Forschung gefunden hat, ist bislang nur wenig darüber bekannt, inwieweit das Modell in der Lage ist, auch die pulmonale Inflammation nachzubilden, die ein wesentlicher Pathomechanismus des akuten Lungenversagens ist.

1.3.2 Pulmonale Inflammation als therapeutisches Target

Spezifische, pharmakologische Therapieansätze, die auf eine Hemmung der pulmonalen Inflammation beim ARDS abzielen und den pulmonalen Gasaustausch oder das Überleben von betroffenen Patienten verbessern, existieren derzeit nicht. Verschiedene tierexperimentelle Studien zeigen jedoch, dass das Konzept einer gezielten Immunmodulation durch Hemmung pro-inflammatorischer Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) oder IL-6 den Verlauf eines ARDS positiv beeinflussen kann. So konnte inhaliertes IL-10, ein anti-inflammatorisch wirksames Zytokin, den Lungenschaden und

die Mortalität in einem Modell des akuten Lungenversagens der Ratte deutlich reduzieren (34). Ebenso konnten immunmodulatorisch wirksame A2B-Adenosin-Rezeptoragonisten sowohl die pulmonale Inflammation, als auch das Permeabilitätsödem in einem ARDS Modell signifikant vermindern (35). Bisher hat sich das Konzept einer gezielten anti-inflammatorisch wirksamen Therapie bei ARDS-Patienten jedoch nicht generell durchsetzen können. Die zunächst sinnvoll erscheinende Glukokortikoidtherapie lieferte in Studien widersprüchliche Ergebnisse. Eine Metaanalyse von Meduri und Kollegen zeigte hingegen, dass ein früher Einsatz von Glukokortikoiden die Letalität im ARDS senken kann (36). Weitere Studien sind erforderlich, um zur Anwendung von Glukokortikoiden eine evidenzbasierte Empfehlung aussprechen zu können. Andere anti-inflammatorisch wirksame Substanzen finden derzeit keine Anwendung in der Therapie des ARDS.

1.3.3 Renin-Angiotensin-System und akutes Lungenversagen

Das Renin-Angiotensin-System (RAS) ist an der Entstehung und am Voranschreiten eines akuten Lungenversagens beteiligt. Zusätzlich zur Steuerung des Blutdruckes, spielt das RAS bei der Regulation von Inflammationsmediatoren eine wesentliche Rolle (37). Das Peptidhormon Angiotensin II bewirkt über den AT₂-Rezeptor antiproliferative, pro-apoptotische und anti-inflammatorische Effekte (38,39). So hemmt der AT₂ Rezeptor im Experiment die Expression pro-inflammatorischer Zytokine, das Wachstum von Fibrozyten und induziert Signalwege der Apoptose (40-42). Die Mehrzahl der verfügbaren Daten deutet dabei auf eine endogene Schutz- und Regenerationsfunktion dieses Rezeptorsubtyps hin. AT₂-Rezeptoren gelten als funktionelle Gegenspieler von AT₁-Rezeptoren, denen nachteilige Effekte zugerechnet werden (37). So stimulieren AT₁-Rezeptoren die Inflammation durch Steigerung der lokalen Synthese pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-6, TNF- α und IL-1 und induzieren gleichzeitig das Wachstum von Fibrozyten (43-45). Die anti-inflammatorischen und anti-proliferativen Wirkungen von AT₂-Rezeptoren wirken dem entgegen und tragen wesentlich zur zellulären Differenzierung und damit zur zellulären Regeneration im Rahmen von Gewebereparatur und Heilung nach einem inflammatorischen Schaden bei (38,39).

Im Tierexperiment können pharmakologische Interventionen an Angiotensin II-Rezeptoren günstige Effekte auf den Verlauf eines Lungenversagens haben. So konnte eine pharmakologische Blockade des AT₁-Rezeptors die pulmonale Inflammation reduzieren, den Gasaustausch verbessern und das Überleben der Versuchstiere während eines Sepsis-induzierten ARDS an der Maus positiv beeinflussen (46). In einem anderen Modell konnte die Überexpression von "*Angiotensin-Converting-Enzyme-2*" (ACE2), einem negativen Regulator von Angiotensin II, ebenfalls die Lungenfunktion und das Überleben der Versuchstiere

signifikant verbessern (47,48). Zugrunde lag jeweils eine signifikante Reduktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 oder IL-6. Im Gegensatz dazu führte eine pharmakologische Blockade des AT2-Rezeptors zu einer deutlich erhöhten Mortalität von Versuchstieren mit Lungenversagen (46). Eine komplette AT2-Rezeptor-Defizienz ("AT2-Rezeptor-*knock-out*") war in einem murinen ARDS Modell mit einem stark verschlechterten pulmonalen Gasaustausch, einer signifikanten Zunahme des Permeabilitätsödems und stark erhöhter Mortalität assoziiert (48).

Zusammenfassend zeigt sich, dass über AT2-Rezeptor-vermittelte Signalwege ein akutes Lungenversagen abgemildert, die pulmonale Inflammation reduziert und gegebenenfalls das Überleben verbessert werden kann. Die Wirkungen des AT2-Rezeptors könnten protektiv und vorteilhaft während eines experimentellen, akuten Lungenversagens sein. Es liegt deshalb der Schluss nahe, dass die direkte, pharmakologische Stimulation des AT2-Rezeptors durch eine Reduktion der lokalen, pulmonalen Inflammationsmediatoren ein erfolgreiches, therapeutisches Prinzip zur Behandlung des akuten Lungenversagens sein könnte. Mit Compound 21 (C21) steht ein neuartiger, hochselektiver, nicht-peptidischer AT2-Rezeptoragonist zur Verfügung, der bereits in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien anti-inflammatorisches Wirkpotential gezeigt hat (49-54). Die Wirkungen einer direkten Stimulation des AT2-Rezeptors beim experimentellen Lungenversagen sind bislang allerdings nicht genau charakterisiert worden.

1.4 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Das ARDS ist ein komplexes und heterogenes Syndrom, für das keine spezifischen, pharmakologischen Therapiekonzepte bestehen und das auch heute noch hohe Mortalitätsraten aufweist. Diese Habilitationsschrift nähert sich dem akuten Lungenversagen sowohl von klinischer, als auch von grundlagenwissenschaftlicher, experimenteller Seite.

Der erste Teil der Arbeit befasst sich mit der Evaluation des klinischen Verlaufs verschiedener Phänotypen des ARDS und schwerpunktmäßig mit der Bewertung und Einschätzung des Mortalitätsrisikos von Patienten mit akutem Lungenversagen. Hierzu werden retrospektive, klinische Arbeiten zusammengefasst, die anhand großer Patientenkollektive unterschiedliche Verlaufsformen des ARDS gegenüberstellen und verschiedene Parameter des Gasaustauschs und die Zahl der Erythroblasten im peripheren Blut als neuen Biomarker hinsichtlich ihrer prognostischen Wertigkeit bei der Einschätzung des Mortalitätsrisikos von Patienten mit ARDS evaluieren. Im Einzelnen werden in den aufgeführten Arbeiten folgende Fragestellungen betrachtet:

1) Wie unterscheidet sich der klinische Verlauf zwischen viral und bakteriell induziertem ARDS? Welche Implikationen ergeben sich hieraus für die Einschätzung von Risiko und Prognose für ARDS-Patienten?

2) Welche klinischen Marker und Parameter sind am besten geeignet, das Risiko und die Prognose von ARDS-Patienten mit hoher Genauigkeit zu beschreiben? Welchen Stellenwert haben derzeit gültige Klassifikationssysteme des ARDS bei der Vorhersage von Morbidität und Mortalität?

3) Welche Wertigkeit haben Erythroblasten bei der Prädiktion der Mortalität von ARDS-Patienten?

Im zweiten Teil der Arbeit sind grundlagenwissenschaftliche Arbeiten zusammengefasst, die sich mit der Evaluation einer therapeutischen, pharmakologischen Intervention im experimentellen Lungenversagen befassen. Hierzu wird zunächst die pulmonale Inflammation in einem Modell des akuten Lungenversagens charakterisiert. In weiteren Arbeiten wird das anti-inflammatorische Wirkpotential des AT2-Rezeptors analysiert, dessen Signaltransduktion an der Hemmung von Inflammationskaskaden beteiligt ist. Im letzten Teil der Arbeit wird in einer experimentellen Studie der Frage nachgegangen, ob die aus eigenen Voruntersuchungen bekannten, anti-inflammatorischen Wirkungen einer direkten AT2-Rezeptorstimulation auch auf eine Anwendung in einem experimentellen Modell des akuten Lungenversagens übertragbar sind. Insbesondere werden folgende Fragen bearbeitet:

1) Inwieweit ist das Modell der wiederholten pulmonalen Lavage geeignet, eine pulmonale Inflammationsreaktion auszulösen?

2) Lassen sich in einem *in vitro*-Inflammationsmodell anti-inflammatorische Eigenschaften von C21 nachweisen? Werden diese über den AT2-Rezeptor vermittelt?

3) Besitzt C21 im zuvor charakterisierten Modell des akuten Lungenversagens anti-inflammatorisches Wirkpotential? Kann durch eine AT2-Rezeptor-vermittelte Hemmung der pulmonalen Inflammation eine Abmilderung des Lungenversagens und gegebenenfalls eine Verbesserung des pulmonalen Gasaustausches erreicht werden?

Insgesamt verfolgt die Arbeit damit zwei wesentliche Ziele: Zum einen sollen aus klinischer Sicht aktuelle Möglichkeiten zur Bewertung von Risiko und Prognose von ARDS-Patienten betrachtet und evaluiert werden. Zum anderen soll aus grundlagenwissenschaftlicher Sicht ein pharmakologischer Behandlungsansatz überprüft werden, der möglicherweise therapeutisches Potential beim akuten Lungenversagen besitzt.

2. Zusammenfassung der Ergebnisse eigener Arbeiten

2.1 Charakterisierung des intensivmedizinischen Verlaufs schwer kranker Patienten mit akutem Lungenversagen: Vergleich zwischen viral und bakteriell bedingtem ARDS

Töpfer L*, Menk M*, Weber-Carstens S, Spies C, Wernecke KD, Uhrig A, Lojewski C, Jörres A, Deja M. **Influenza A (H1N1) vs non-H1N1 ARDS: analysis of clinical course.**

J Crit Care. 2014 Jun;29(3):340-6.

PMID: 24508203

[https://doi: 10.1016/j.jcrc.2013.12.013.](https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.12.013)

**geteilte Erstautorenschaft*

Der intensivstationäre Verlauf von schwer kranken Patienten mit akutem Lungenversagen kann sich je nach der Ursache, die dem ARDS zugrunde liegt, deutlich unterscheiden. Während der H1N1-Pandemie 2009/10 ("neue Influenza" oder "Schweinegrippe") wurden in unserem ARDS/ECMO Zentrum größtenteils junge Patienten mit schwerer Influenza-Pneumonie behandelt. In der folgenden Kohortenstudie untersuchten wir retrospektiv diese Patienten mit dem Ziel, den klinischen Verlauf eines viral-bedingten Lungenversagens von dem eines ARDS auf dem Boden einer bakteriellen Pneumonie abzugrenzen. Insgesamt wurden 21 ARDS-Patienten mit H1N1-Pneumonie und 41 ARDS-Patienten mit bakterieller Pneumonie identifiziert und in die Studie eingeschlossen. Patienten-spezifische Charakteristika, intensivmedizinische Verlaufsscores und Parameter der Beatmung und des pulmonalen Gasaustausches wurden dabei im Verlauf der ersten 10 Tage auf der Intensivstation analysiert. Darüber hinaus wurde die Modalität des extrakorporalen Gasaustausches und die Mortalität auf der Intensivstation zwischen den beiden Gruppen verglichen. Mit Hilfe einer logistischen Regressionsanalyse wurde nach unabhängigen Risikofaktoren für die Notwendigkeit eines extrakorporalen Gasaustauschverfahrens in den jeweiligen Gruppen gesucht.

ARDS-Patienten mit H1N1-Pneumonie waren in unserer Studie deutlich jünger und weniger schwer vorerkrankt, als ARDS-Patienten mit einer zugrundeliegenden bakteriellen Pneumonie. Im Ergebnis zeigte sich außerdem, dass der pulmonale Gasaustausch in der Gruppe der ARDS-Patienten mit H1N1-Pneumonie deutlich stärker eingeschränkt war, als in der Vergleichsgruppe. Dies galt für den gesamten Verlauf der ersten 10 Tage auf der Intensivstation. Extrakorporale Gasaustauschverfahren (wie ECMO) waren bei H1N1-Pneumonie signifikant häufiger notwendig, als in der Vergleichsgruppe mit bakteriell bedingtem ARDS. Die Dauer der maschinellen Beatmung und die Zeit bis zur vollständigen Entwöhnung vom Respirator war bei Patienten mit H1N1-Pneumonie signifikant verlängert.

Trotz einer verlängerten Aufenthaltsdauer auf der Intensivstation zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede in der Mortalität zwischen den beiden Vergleichsgruppen.

Zusammenfassend charakterisiert die Studie am Beispiel der H1N1-Pneumonien unterschiedliche Verlaufsformen des schweren akuten Lungenversagens des Erwachsenen. Der klinische Verlauf eines viral bedingten akuten Lungenversagens war dabei erheblich langwieriger und schwerer, als der klinische Verlauf bakteriell ausgelöster ARDS Formen. Die Prognose dieser in einem spezialisierten Zentrum versorgten Patienten *quoad vitam* war jedoch nicht eingeschränkt.

(Text teilweise aus dem Abstrakt der oben genannten Publikation übernommen; Übersetzung durch den Autor)

Platzhalter

Töpfer L, Menk M, Weber-Carstens S, Spies C, Wernecke KD, Uhrig A, Lojewski C, Jörres A, Deja M. Influenza A (H1N1) vs non-H1N1 ARDS: analysis of clinical course.

J Crit Care. 2014 Jun;29(3):340-6. PMID:

24508203

<https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2013.12.013>

2.2 Prädiktoren von Mortalität und Morbidität bei kritisch kranken Patienten mit schwerem ARDS

Balzer F, Menk M, Ziegler J, Pille C, Wernecke KD, Spies C, Schmidt M, Weber-Carstens S, Deja M. **Predictors of survival in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): an observational study.**

BMC Anesthesiol. 2016 Nov 8;16(1):108.

PMID: 27821065

[https://doi: 10.1186/s12871-016-0272-4](https://doi.org/10.1186/s12871-016-0272-4)

Gegenwärtig existieren keine gültigen Klassifikationssysteme für das akute Lungenversagen, die eine optimale Vorhersage von Mortalität und Morbidität von schwer kranken Patienten auf der Intensivstation erlauben. In einer retrospektiven Analyse untersuchten wir deshalb 442 Patienten mit akutem Lungenversagen, die wir im Rahmen des Versorgungsauftrages als ARDS/ECMO Zentrum für die weitere Behandlung aus anderen Kliniken übernommen hatten, hinsichtlich der prognostischen Aussagekraft verschiedener klinischer Parameter. Ziel der Untersuchungen war es, die prädiktive Wertigkeit der ARDS-Definition nach der "American-European-Consensus-Conference" (AECC-Definition) und nach der sogenannten "Berlin-Definition" hinsichtlich der Vorhersagbarkeit von Morbidität und Mortalität zu evaluieren. Wichtige Parameter des pulmonalen Gasaustausches der Patienten in der Anfangsphase des ARDS und während der ersten 7 Tage des intensivstationären Verlaufs wurden ebenfalls auf ihre prädiktive Wertigkeit bezüglich der Morbidität und Mortalität überprüft und miteinander verglichen.

Eine multivariate Cox Regressionsanalyse zeigte, dass der Oxygenierungsindex (OI; berechnet als $FiO_2/PaO_2 \cdot P_{mean}$) hinsichtlich der Mortalitätsprädiktion die höchste Genauigkeit für unser Patientenkollektiv aufwies. Ein OI von 15 oder größer war dabei mit einer signifikant verlängerten Dauer der maschinellen Beatmung, einer längeren Verweildauer auf der Intensivstation und im Krankenhaus, sowie mit einer deutlich erhöhten Mortalitätsrate auf der Intensivstation assoziiert. Der dritte Tag des intensivstationären Aufenthaltes stellte sich bei unserer Untersuchung als optimaler Bewertungszeitpunkt heraus und ergab den besten Kompromiss zwischen einer möglichst frühzeitigen und gleichzeitig möglichst genauen Prädiktion der Mortalität. Interessanterweise ließ in unserer Untersuchung weder die Kategorisierung der Patienten nach der "AECC-Definition", noch deren Einteilung nach der derzeit gültigen "Berlin-Definition" nach verschiedenen Schweregraden des ARDS zufriedenstellende und valide Aussagen über die jeweilige Mortalitätswahrscheinlichkeit zu. Als weiteres Ergebnis konnte unsere Untersuchung zeigen, dass Patienten, die auf unserer Intensivstation verstarben, signifikant länger in den zuweisenden Kliniken vorbehandelt und

maschinell beatmet worden waren als Patienten, die das schwere Lungenversagen überlebten.

Insgesamt zeigte diese Untersuchung, dass weniger die Kategorisierung der Patienten nach gängigen ARDS-Definitionen, als vielmehr die Bewertung der pulmonalen Funktionalität valide Aussagen über die Prognose von ARDS-Patienten zulässt. Der OI erscheint hierbei als ein gut geeigneter funktioneller Parameter zur Einschätzung des Mortalitätsrisikos.

(Text teilweise aus dem Abstrakt der oben genannten Publikation übernommen; Übersetzung durch den Autor)

Platzhalter

Balzer F, Menk M, Ziegler J, Pille C, Wernecke KD, Spies C, Schmidt M, Weber-Carstens S, Deja M. Predictors of survival in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): an observational study.

BMC Anesthesiol. 2016 Nov 8;16(1):108.

27821065

<https://doi.org/10.1186/s12871-016-0272-4>

2.3 Erythroblasten als prädiktiver Marker von Mortalität und Morbidität bei kritisch kranken Patienten mit ARDS

Menk M, Giebelhäuser L, Vorderwuelbecke G, Gassner M, Graw Jan A., Weiss B, Zimmermann M, Wernecke KD, Weber-Carstens S. Nucleated red blood cells as predictors of mortality in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): an observational study.

Ann Intensive Care. 2018; 8(1):42

PMID: 29589209

doi: 10.1186/s13613-018-0387-5

Die Prädiktion von Morbidität und Mortalität bei Patienten mit akutem Lungenversagen ist mitunter schwierig, da für diese Fragestellung nur wenige validierte Instrumente zur Verfügung stehen. Wie eigene Vorarbeiten gezeigt haben, liefern klassische Definitionen und kategoriale Einteilungen nach ARDS-Schweregraden nur unscharfe Aussagen.

Erythroblasten sind unreife Vorläuferzellen der erythropoietischen Stammzellreihe und normalerweise nicht im peripheren Blut gesunder Menschen vorhanden. Unter pathologischen Bedingungen treten diese Zellen jedoch aus dem Knochenmark ins periphere Blut über und werden dort nachweisbar. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass das Auftreten dieser Zellen im Blut von kritisch kranken Patienten auf der Intensivstation mit einer erhöhten Mortalitätsrate assoziiert ist. Die folgende Studie hatte zum Ziel, den prädiktiven Wert von Erythroblasten im Blut von Patienten mit schwerem Lungenversagen zu evaluieren. Hierzu wurden retrospektiv Daten von 404 ARDS-Patienten ausgewertet, die zwischen 2007 und 2014 in unserem ARDS/ECMO Zentrum behandelt worden waren. Die Werte für die Erythroblasten aus den routinemäßig angefertigten täglichen Blutbildern der Patienten wurden für diese Studie jeweils für den gesamten intensivstationären Aufenthalt analysiert und statistisch ausgewertet. Mit Hilfe einer multiplen logistischen Regressionsanalyse und einer Cox Regression wurden unabhängige Risikofaktoren hinsichtlich der Mortalität der ARDS-Patienten identifiziert. Ein spezifischer Grenzwert der Erythroblasten, der eine möglichst genaue Prädiktion der Mortalität erlaubt, wurde mit Hilfe der Methode nach Youden ermittelt. Kaplan-Meier Kurven wurden erstellt, um Unterschiede in den Überlebenswahrscheinlichkeiten der Patienten zu visualisieren. Mit Hilfe weiterer logistischer Regressionsanalysen wurde nach unabhängigen Risikofaktoren für das Auftreten von Erythroblasten im Blut der ARDS-Patienten gesucht.

Im Ergebnis zeigte die Studie, dass das Vorkommen von Erythroblasten im peripheren Blut ein unabhängiger Risikofaktor für das Versterben von Patienten mit ARDS ist. Waren Erythroblasten im Blut nachweisbar, so verdoppelte sich das Mortalitätsrisiko.

Erreichte die Erythroblastenzahl einen Grenzwert von 220/nl, so verdreifachte sich das Risiko der Patienten, im ARDS zu versterben. Darüber hinaus waren ARDS-Patienten, bei denen Erythroblasten während des intensivstationären Aufenthaltes nachweisbar waren, signifikant länger auf der Intensivstation, länger invasiv beatmet und häufiger mit extrakorporalen Lungenersatzverfahren wie ECMO versorgt worden, als Patienten, bei denen zu keinem Zeitpunkt Erythroblasten im peripheren Blut nachweisbar waren. Auch das Vorhandensein von Erythroblasten im Blut bereits bei der Aufnahme auf die Intensivstation stellte sich als ein unabhängiger Mortalitätsprädiktor für diese Patienten heraus.

Insgesamt zeigte unsere Untersuchung deutlich, dass Erythroblasten im ARDS eine hohe prädiktive Wertigkeit hinsichtlich der Mortalität dieser Patienten aufweisen. Das Vorhandensein dieser Zellen im Blut ist überdies hinaus ein Marker für die Schwere der Erkrankung. Weitere, prospektiv-randomisierte Studien müssen den Stellenwert dieses Parameters in der Versorgung von kritisch kranken Patienten mit akutem Lungenversagen genauer definieren und überprüfen, ob der Parameter tatsächlich geeignet ist, als Biomarker für das ARDS zu fungieren.

(Text teilweise aus dem Abstrakt der oben genannten Publikation übernommen; Übersetzung durch den Autor)

Platzhalter

Menk M, Giebelhäuser L, Vorderwuelbecke G, Gassner M, Graw Jan A., Weiss B, Zimmermann M, Wernecke KD, Weber-Carstens S. **Nucleated red blood cells as predictors of mortality in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): an observational study.**

Ann Intensive Care. 2018; 8(1):42 PMID:

29589209

<https://doi.org/10.1186/s13613-018-0387-5>

2.4 Charakterisierung der pulmonalen Inflammation in einem experimentellen Modell des schweren, akuten Lungenversagens

*Menk M, Graw JA, Steinkraus H, Haefen C, Siffringer M, Spies CD, Lachmann B, Schwaiberg D. **Characterization of inflammation in a rat model of acute lung injury after repeated pulmonary lavage.***

Exp Lung Res. 2015;41(8):466-76.

PMID: 26381719

[https://doi: 10.3109/01902148.2015.1075079](https://doi.org/10.3109/01902148.2015.1075079)

Eine generalisierte, pulmonale Inflammationsreaktion ist ein wesentlicher Pathomechanismus bei der Entstehung des akuten Lungenversagens. Verschiedene (tier-) experimentelle Modelle stehen derzeit zur Verfügung, die nicht nur die Beeinträchtigung des pulmonalen Gasaustausches, sondern auch die zugrundeliegende Inflammationsreaktion abbilden. Ein weiteres Modell des akuten Lungenversagens ist das von Lachmann und Kollegen vorgestellte pulmonale Lavagemodell: Bei diesem Modell führt eine wiederholte Auswaschung von alveolärem Surfactant und eine sich anschließende, aggressive maschinelle Beatmung zur Ausbildung von ausgedehnten Atelektasen in der Lunge und in der Folge zu einer raschen Verschlechterung der pulmonalen Gasaustauschkapazität. Die durch das Lavagemodell hervorgerufene pulmonale Inflammation ist bislang nur wenig charakterisiert worden. Es war unklar, inwieweit das Modell in der Lage ist, neben der Beeinträchtigung des Gasaustausches, auch die Inflammation als wesentlichen Bestandteil eines akuten Lungenversagens abzubilden. Ziel der experimentellen Untersuchungen im Rahmen der folgenden Studie war es deshalb, das Ausmaß der pulmonalen Inflammation darzustellen, die durch die Anwendung des Lavagemodells hervorgerufen wird. Verwendet wurden hierfür männliche Ratten, die in eine Behandlungsgruppe und eine Kontrollgruppe randomisiert wurden. Während die Tiere der Kontrollgruppe lediglich in Narkose invasiv beatmet wurden, erhielten die Tiere der Behandlungsgruppe zusätzlich repetitive, pulmonale Lavagen mit Kochsalzlösung vor der maschinellen Beatmung. Arterielle Blutgasanalysen wurden während des experimentellen Lungenversagens halbstündlich bis zum Erreichen des Endpunktes nach 240 Minuten angefertigt. Der Proteingehalt und die oberflächenaktiven Eigenschaften der gewonnenen bronchoalveolären Lavageflüssigkeit wurden analysiert. Die transkriptionelle und translationale Regulation von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL-1, TNF- α , IL-6, IL-10 wurde als Marker für die ausgelöste Inflammationsreaktion in der Lunge und im Plasma der Versuchstiere untersucht. Ebenso wurden verschiedene Marker für zellulären Stress analysiert und die inflammations-induzierte Aktivierung nachgeschalteter Signaltransduktionskaskaden gemessen.

Im Ergebnis zeigte die Studie zunächst wie erwartet, dass das Lavagemodell die pulmonale Compliance signifikant reduzierte und den Gasaustausch im Sinne einer ausgeprägten arteriellen Hypoxämie, Hyperkapnie und respiratorischen Azidose rasch verschlechterte. Die gewonnene bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit wies als Ausdruck einer Zerstörung der alveolären Membranen der Versuchstiere einen signifikant erhöhten Proteingehalt auf. Ebenso konnten die oberflächenaktiven Eigenschaften des aus dem alveolären Kompartiment ausgewaschenen Surfactant nachgewiesen werden. Die mRNA- und Proteinexpression typischer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, TNF- α oder IL-6 war bei den Versuchstieren der Behandlungsgruppe signifikant erhöht. Marker für zellulären Stress waren bei den Tieren der Behandlungsgruppe ebenfalls in ihrer Expression stark erhöht.

Zusammengefasst zeigten unsere Untersuchungen, dass das Lavagemodell nicht nur die ARDS-typische Beeinträchtigung des pulmonalen Gasaustausches hervorruft, sondern auch in der Lage ist, die pulmonale Inflamationsreaktion abzubilden. Das Modell erscheint somit als geeignet, therapeutische Strategien zu überprüfen, die auf die pulmonale Inflammation beim akuten Lungenversagen abzielen.

(Text teilweise aus dem Abstrakt der oben genannten Publikation übernommen; Übersetzung durch den Autor)

Platzhalter

Menk M, Graw JA, Steinkraus H, Haefen C, Sifringer M, Spies CD, Lachmann B, Schwaiberger D. Characterization of inflammation in a rat model of acute lung injury after repeated pulmonary lavage.

Exp Lung Res. 2015;41(8):466-76. PMID:

26381719

<https://doi.org/10.3109/01902148.2015.1075079>

2.5 Experimentelle Untersuchungen zu anti-inflammatorischen Wirkungen des AT2 Rezeptors *in vitro*

Menk M*, Graw JA*, von Haefen C, Sifringer M, Schwaiberger D, Unger T, Steckelings U, Spies CD. **Stimulation of the Angiotensin II AT2 Receptor is Anti-inflammatory in Human Lipopolysaccharide-Activated Monocytic Cells**

Inflammation. 2015 Aug;38(4):1690-9.

PMID: 25758542

[https://doi: 10.1007/s10753-015-0146-9](https://doi.org/10.1007/s10753-015-0146-9)

*geteilte Erstautorenschaft

Neben der Erhaltung der Flüssigkeits- und Elektrolythomöostase ist das Renin-Angiotensin-System entscheidend an der Regulation von Inflammationskaskaden beteiligt. Über den AT1-Rezeptor vermittelt Angiotensin (II) pro-inflammatorische und pro-proliferative Effekte. Demgegenüber wird der AT2-Rezeptor als funktioneller Antagonist betrachtet, der den gewebeschädigenden Effekten des AT1-Rezeptors entgegenwirkt und gewebeschützende, anti-inflammatorische Effekte vermittelt. AT2-Rezeptoren werden unter anderem auf der Oberfläche von immunkompetenten Zellen wie Monozyten und Makrophagen exprimiert. Über die regulatorischen Effekte, die über die Stimulation dieser Rezeptoren auf Monozyten und Makrophagen vermittelt werden, ist bislang nur wenig bekannt. Im Rahmen dieser experimentellen Studie wurde deshalb der Frage nachgegangen, ob eine direkte, pharmakologische Stimulation von AT2-Rezeptoren auf Monozyten anti-inflammatorische Wirkung hat. Hierzu wurden humane, monozytenartige THP-1 und U937 Zellen in einem *in vitro* Ansatz mit Lipopolysacchariden (LPS) behandelt und in verschiedenen Behandlungsgruppen zusätzlich der AT2-Rezeptor pharmakologisch mit Hilfe des spezifischen AT2-Rezeptor-Agonisten Compound 21 (C21) stimuliert. Die Expression typischer pro- und anti-inflammatorischer Zytokine wie IL-1, TNF- α , IL-6 und IL-10 wurde auf mRNA und Proteinebene zu verschiedenen Zeitpunkten nach LPS-Stimulation analysiert. Im Ergebnis zeigte die Studie, dass die selektive Stimulation des AT2-Rezeptors in beiden untersuchten Zelllinien sowohl zeit- als auch dosisabhängig zu einer signifikanten Hemmung der durch LPS ausgelösten Inflammationsreaktion führte. Die nachgewiesenen Effekte waren dabei spezifisch durch den AT2-Rezeptor vermittelt. Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass über den AT2-Rezeptor auf humanen monozytenartigen Zellen anti-inflammatorische Effekte hervorgerufen werden.

(Text teilweise aus dem Abstrakt der oben genannten Publikation übernommen; Übersetzung durch den Autor)

Platzhalter

*Menk M, Graw JA, von Haefen C, Sifringer M, Schwaiberger D, Unger T, Steckelings U, Spies CD. **Stimulation of the Angiotensin II AT2 Receptor is Anti-inflammatory in Human***

Lipopolysaccharide-Activated Monocytic Cells

Inflammation. 2015 Aug;38(4):1690-9. PMID:

25758542

<https://doi.org/10.1007/s10753-015-0146-9>

2.6 Selektiver Agonismus am AT2 Rezeptor im experimentellen ARDS

Menk M, Graw JA, von Haefen C, Steinkraus H, Lachmann B, Spies CD, Schwaiberg D. **Angiotensin II type 2 receptor agonist Compound 21 attenuates pulmonary inflammation in a model of acute lung injury**

J Inflamm Res. 2018;11, 169-178

doi: <https://doi.org/10.2147/JIR.S160573>

Obwohl die Rolle des AT2-Rezeptors beim akuten Lungenversagen bislang nicht vollständig verstanden ist, deuten Voruntersuchungen auf gewebeprotective und anti-inflammatorische Eigenschaften dieses Rezeptorsubtyps hin. In dieser experimentellen Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die aus eigenen Voruntersuchungen bekannten und am Beispiel von humanen, monozytenartigen Zelllinien charakterisierten, anti-inflammatorischen Eigenschaften einer direkten AT2-Rezeptorstimulation auch auf eine Anwendung in einem experimentellen Modell des akuten Lungenversagens übertragbar sind. Hierzu wurde das in Kapitel 2.4 dargestellte Lavagemodell des akuten Lungenversagens verwendet, das in eigenen Voruntersuchungen hinsichtlich der pulmonalen Inflammationsreaktion bereits ausführlich charakterisiert wurde. In einem erweiterten, experimentellen Ansatz wurde den Tieren der Behandlungsgruppe zusätzlich zur pulmonalen Lavage und mechanischen Beatmung, der direkte, selektive AT2-Rezeptoragonist Compound 21 (C21) appliziert. Neben Parametern des pulmonalen Gasaustausches wurden typische pro- und anti-inflammatorische Zytokine als Marker für das Ausmaß der pulmonalen Inflammation analysiert. In der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit wurden der Proteingehalt und die oberflächenaktiven Eigenschaften bestimmt. Als Surrogatparameter für die Ausprägung des Lungenödems wurde das Verhältnis zwischen Feucht- und Trockengewicht der Lungen ("*wet/dry weight-ratio*") berechnet.

Im Ergebnis zeigten die experimentellen Untersuchungen, dass die direkte Stimulation des AT2-Rezeptors mittels C21 zu einer signifikanten Reduktion der pulmonalen Inflammation führte. So wurde beispielsweise die Expression von TNF- α in der Lunge sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene signifikant durch C21 reduziert. Allerdings wurde in diesem Modell weder die Ausprägung des pulmonalen Ödems, noch der Gasaustausch durch die selektive AT2-Rezeptorstimulation signifikant beeinflusst. Bislang bleibt unklar, ob die anti-inflammatorischen Eigenschaften des AT2-Rezeptors beim experimentellen akuten Lungenversagen gewebeprotective Effekte auslösen. Weitere experimentelle Studien, die auch andere Modelle des akuten Lungenversagens einschließen, sind derzeit in Planung.

Platzhalter

Menk M, Graw JA, von Haefen C, Steinkraus H, Lachmann B, Spies CD, Schwaiberg D. Angiotensin II type 2 receptor agonist Compound 21 attenuates pulmonary inflammation in a model of acute lung injury J Inflamm Res. 2018;11, 169-178
<https://doi.org/10.2147/JIR.S160573>

3. Diskussion

Das schwere, akute Lungenversagen des Erwachsenen ist auch heute noch eine Herausforderung für die Intensivmedizin. Trotz intensiver Forschungsbemühungen und beachtlicher Fortschritte bei den modernen Behandlungsstrategien sind wir von einem umfassenden Verständnis dieses Krankheitsbildes und einer optimalen Therapie noch weit entfernt.

Diese Habilitationsschrift beleuchtet das Krankheitsbild sowohl von klinischer, als auch von grundlagenwissenschaftlicher, experimenteller Seite. Die in Kapitel 2 vorgestellten Arbeiten befassten sich zum einen schwerpunktmäßig mit der Bewertung des Mortalitätsrisikos von Patienten mit akutem Lungenversagen, zum anderen wurde experimentell eine pharmakologische Therapieoption evaluiert, die auf die pulmonale Inflammation als wesentlichen Mechanismus der Pathophysiologie im ARDS abzielt. Die Kernaussagen der Studien und Untersuchungen lassen sich übergeordnet wie folgt zusammenfassen:

- 1) Die auslösende Ursache, die letztlich zum ARDS führt, hat entscheidenden Einfluss auf den zu erwartenden klinischen Verlauf und die Prognose des Patienten.
- 2) Die Bewertung der pulmonalen Funktionalität unter Einbeziehung der Beatmungsinvasivität kann valide Aussagen über die Prognose von ARDS-Patienten liefern. Der Oxygenierungsindex OI, der den mittleren Atemwegsdruck berücksichtigt, erscheint hierbei als ein gut geeigneter, funktioneller Parameter zur Einschätzung des Mortalitätsrisikos von ARDS-Patienten. Die kategoriale Einteilung von Patienten nach derzeit gültigen ARDS-Definitionen und Krankheitsschweregraden lässt nur eine unscharfe Abschätzung des Mortalitätsrisikos zu.
- 3) Bei der Einschätzung des Mortalitätsrisikos von ARDS-Patienten weist die Zahl der im peripheren Blut nachweisbaren Erythroblasten eine hohe prognostische Wertigkeit auf. Das Vorhandensein von Erythroblasten ist darüber hinaus mit der Schwere des ARDS und dessen klinischen Verlauf assoziiert. Erythroblasten sind unter Umständen geeignet, als (neuer) Biomarker im ARDS zu fungieren.
- 4) Das experimentelle ARDS Modell bestehend aus einer pulmonalen Lavage und anschließender maschineller Beatmung bildet nicht nur die schwere Gasaustauschstörung des akuten Lungenversagens ab, sondern induziert auch reproduzierbar eine pulmonale Inflammation.

5) Der Angiotensin II AT2-Rezeptor Agonist Compound 21 (C21) hat sowohl *in vitro* als auch *in vivo* anti-inflammatorisches Wirkpotential. Die Anwendung der Substanz im Modell des akuten Lungenversagens mildert zwar die pulmonale Inflammation signifikant ab, führt aber unter den gegebenen Bedingungen nicht zu einer nachweisbaren Verbesserung des pulmonalen Ödems und des Gasaustausches.

3.1 Unterschiedliche ARDS Ursachen führen zu unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen

Die arterielle Hypoxämie aufgrund eines intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts ist das klinische Leitsymptom des akuten Lungenversagens. Allerdings lässt die bloße Bewertung der Gasaustauschkapazität der Lunge keine validen Aussagen über den zu erwartenden klinischen Verlauf zu. Dies liegt zum einen daran, dass bei der derzeit gültigen ARDS-Definition wichtige Determinanten des Sauerstofftransfers bei invasiv beatmeten Patienten wie zum Beispiel die verwendeten Beatmungsdrücke nur wenig Beachtung finden. Dies kann dazu führen, dass die Schwere der Gasaustauschstörung bei Patienten unter Umständen falsch eingeschätzt wird, weil aus anderen Einstellungen des Beatmungsgerätes formal andere Oxygenierungsindices resultieren können. Zum anderen führen offenbar unterschiedliche ARDS Ursachen zu unterschiedlichen klinischen Verlaufsformen. Die Ergebnisse der durchgeführten retrospektiven Analyse zum klinischen Verlauf viral und bakteriell induzierter Formen des akuten Lungenversagens untermauern diese Sichtweise. Obwohl die angewendeten klinischen Scoringsysteme bei der Aufnahme auf die Intensivstation eine vergleichbare Krankheitsschwere zwischen den beiden ARDS-Gruppen zeigte, unterschied sich der klinische Verlauf deutlich. So waren Patienten mit ARDS durch eine Virus Pneumonie nicht nur signifikant länger auf der Intensivstation, sondern auch länger invasiv beatmet und häufiger mit extrakorporalen Lungenersatzverfahren versorgt worden, als Patienten mit ARDS auf dem Boden einer bakteriellen Pneumonie (55). Dennoch unterschied sich die Sterblichkeit auf der Intensivstation zwischen den beiden Gruppen nicht. Die Ergebnisse unserer Studie stehen im Einklang mit anderen Untersuchungen, die im Rahmen der H1N1-Pandemie durchgeführt wurden und die auf die klinischen Unterschiede zwischen viral bedingten ARDS Formen und anderen zugrundeliegenden ARDS-Ursachen abheben (56-60).

Bislang gibt es kaum große, randomisierte Studien zum ARDS, die die auslösende Ursache mit einbeziehen und verschiedene Phänotypen des Syndroms einander gegenüberstellen. Klinische Studien zu Inzidenz und Mortalitätsrisiko im ARDS liefern bisher nur ungenaue und teils widersprüchliche Angaben. Eine systematische Berücksichtigung der

Begleiterkrankungen und der Faktoren, die letztlich zum Lungenversagen führen, könnte in künftigen Studien dazu beitragen, genauere und vergleichbarere Aussagen zum klinischen Verlauf und zur Mortalität im ARDS zu liefern.

3.2 Risikobewertung auf der Intensivstation

Zwar ist es möglich, anhand bestimmter Risikokonstellationen und einzelner Bewertungssysteme recht genaue Mortalitätsraten für eine größere Gruppe von ARDS-Patienten zu ermitteln. Für den einzelnen Patienten auf der Intensivstation ist dies mitunter schwierig. Im intensivmedizinischen Alltag ist jedoch die Abschätzung des Risikos und der Prognose eines Patienten von großer Bedeutung für die Allokation von Ressourcen, die rationale Planung der Therapie und nicht zuletzt die adäquate Kommunikation mit dem Patienten und dessen Angehörigen. So kommt der klinischen Bewertung von Risiko und Prognose von Patienten mit akutem Lungenversagen in der modernen Intensivmedizin eine bedeutende Rolle zu (61).

Wie bereits ausgeführt, kann der arterielle Sauerstoffpartialdruck allein nur ungenaue Aussagen zur Risikobewertung von ARDS-Patienten auf der Intensivstation liefern. In klinischen Studien erweist sich ebenso die $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Ratio zu Beginn des akuten Lungenversagens als nicht geeignet, valide Vorhersagen zur Mortalität der Patienten zu treffen (7,26,62,63). Alternative Möglichkeiten der Beschreibung des Schweregrades der Gasaustauschstörung bei ARDS-Patienten erfordern die Einbeziehung von Beatmungsparametern. Der Oxygenierungsindex OI, in dessen Berechnung der mittlere Atemwegsdruck eingeht, zeigte sich in der hier vorgestellten Studie als prädiktiver Faktor, der mit hoher prognostischer Genauigkeit die Sterblichkeit auf der Intensivstation vorhersagen ließ (64). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit vorrangegangenen klinischen Studien, die den OI in diesem Zusammenhang näher untersucht haben (23,25). Als neuen Teilaspekt zeigte die hier vorgestellte eigene Untersuchung, dass die Vorhersagekraft des OI zur Risikoeinschätzung von ARDS-Patienten zeitabhängig ist. So stellte der dritte Tag des intensivstationären Aufenthaltes der Patienten in unserer Studie den besten Kompromiss zwischen einer möglichst frühzeitigen Prognose und einer möglichst großen Vorhersagegenauigkeit dar. Letztlich war der OI der Einteilung der Patienten nach derzeit gültigen ARDS Klassifikationssystemen in der prognostischen Wertigkeit weit überlegen. Nach aktuellem Stand der Forschung erscheint der OI deshalb als gut geeigneter, bettseitig zu erhebender Faktor in der Risikobewertung des akuten Lungenversagens.

3.3 Erythroblasten als neuer Biomarker zur Risikoabschätzung im ARDS

Neben den bisher verfügbaren Instrumenten zur Risikobewertung bei Patienten mit akutem Lungenversagen stehen verschiedene Biomarker derzeit im Mittelpunkt der Forschung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das Potential von Erythroblasten zur Risikoeinschätzung und Mortalitätsprädiktion von Patienten mit ARDS evaluiert. Diese unreifen Vorläuferzellen der erythropoietischen Stammzellreihe sind nur unter pathologischen Bedingungen im peripheren Blut von Patienten nachweisbar (65). Vorangegangene Studien konnten zeigen, dass Erythroblasten bei schwer septischen Intensivpatienten als Marker für ein verschlechtertes Gesamtüberleben herangezogen werden können (66-69). Unsere Untersuchungen zeigten, dass Erythroblasten speziell für die Prädiktion der Mortalität im ARDS eine hohe prognostische Wertigkeit aufweisen (70). Das Vorhandensein dieser Zellen im Blut von ARDS-Patienten stellt einen unabhängigen Risikofaktor für deren Mortalität dar. Die Mechanismen, die letztlich zur Freisetzung dieser Zellen aus dem Knochenmark führen, sind bislang nicht genau verstanden. Allerdings scheinen eine arterielle Hypoxämie und eine systemische Inflammationsreaktion mit hohen Plasmaspiegeln von pro-inflammatorischen Zytokinen prädisponierende Faktoren hierfür zu sein (71,72). Interessanterweise konnte unsere Arbeit zeigen, dass allein das Vorhandensein einer schweren Gasaustauschstörung signifikant mit dem Auftreten von Erythroblasten im peripheren Blut assoziiert ist. Die im akuten Lungenversagen regelhaft auftretende arterielle Hypoxämie scheint somit ein Triggerfaktor für die Freisetzung von Erythroblasten aus dem Knochenmark zu sein. Patienten, die während des intensivstationären Aufenthaltes Erythroblasten im Blut aufwiesen, waren darüber hinaus signifikant länger beatmet und häufiger mit extrakorporalen Gasaustauschverfahren versorgt worden, als Patienten, bei denen zu keiner Zeit Erythroblasten im Blut nachweisbar waren (70). Die Zahl an Erythroblasten war in unserer Studie insgesamt mit der Schwere des ARDS und dem klinischen Verlauf der Erkrankung auf der Intensivstation assoziiert. Es liegt deshalb der Schluss nahe, dass die Zahl der Erythroblasten im Blut als direkter Marker für die Abschätzung der Krankheitsschwere im ARDS herangezogen werden kann. In einer Studie von Purtle und Kollegen konnte kürzlich gezeigt werden, dass Erythroblasten auch nach der Entlassung von der Intensivstation mit hoher prognostischer Genauigkeit das Mortalitätsrisiko der Patienten vorhersagen konnten (73). Ob diese Vorhersagekraft auch für ARDS-Patienten gilt, ist bislang nicht untersucht worden. Gegenwärtig steht kein prognostisches Instrument für ARDS-Patienten zur Verfügung, das die Zahl an Erythroblasten miteinbezieht. Die hier vorgestellten Ergebnisse lassen jedoch die Vermutung zu, dass Erythroblasten als (neuer) Biomarker für das ARDS valide Vorhersagen zur Prognose der Patienten liefern können. Denkbar wäre zum Beispiel, dass dieser Marker in einen ARDS-spezifischen Vorhersagescore zur Abschätzung des Kurzzeitriskos auf der Intensivstation eingeht. Weitere prospektive,

randomisierte Studien müssen die prognostische Wertigkeit dieses Markers genauer evaluieren.

Die Instrumente zur Abschätzung von Risiko und Prognose für Patienten mit ARDS werden ständig weiterentwickelt. Die hier zusammengetragenen Ergebnisse zeigen, dass die funktionelle Bewertung des pulmonalen Gasaustausches unter Berücksichtigung der Beatmungsinvasivität genauere Aussagen zur Prognose im ARDS liefern kann als aktuell gültige Klassifikationssysteme. Die Einbeziehung neuer Biomarker könnte in Zukunft noch treffendere Aussagen zu Risiko und Prognose von Patienten mit schwerem akuten Lungenversagen liefern.

3.4 von der klinischen Risikoabschätzung zum ARDS Modell

Die Einschätzung des Mortalitätsrisikos von Patienten mit akutem Lungenversagen nach klinischen Gesichtspunkten ist ohne Zweifel ein wichtiger Teilaspekt in der Versorgung von ARDS-Patienten auf der Intensivstation. Jede Verbesserung der hierfür zur Verfügung stehenden Instrumente stellt einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn in der ARDS-Forschung dar. Allerdings bleibt diese Herangehensweise auf der deskriptiven Ebene. Fortschritte in der Therapie können hierdurch nicht generiert werden.

Die im zweiten Teil dieser Habilitationsschrift zusammengestellten Arbeiten befassen sich mit der Charakterisierung einer experimentellen Intervention in einem ARDS Modell. In der Vergangenheit sind verschiedene dieser Modelle entwickelt worden, die das klinische Bild des akuten Lungenversagens im Experiment nachahmen. Im Mittelpunkt steht jeweils die Herbeiführung einer arteriellen Hypoxämie, wie sie für das ARDS typisch ist. Im Ölsäuremodell oder im Säure-Instillationsmodell kommt es jeweils zur Ausbildung eines alveolären Membranschadens, zum Übertritt proteinreicher Flüssigkeit in die Alveole und schließlich zur Beeinträchtigung des pulmonalen Gasaustausches (29). Das histologische Schädigungsbild mit der Bildung hyaliner Membranen und einer relevanten Zerstörung von Alveolarzellen entspricht in großen Teilen dem des ARDS beim Menschen. Auch die pulmonale Inflammation, die ein wesentlicher Pathomechanismus des akuten Lungenversagens ist, wird durch diese Modelle in einem gewissen Rahmen abgebildet (28). Das von Lachmann und Kollegen entwickelte Lavagemodell führt ebenfalls eine akute Schädigung der alveolo-kapillären Einheit herbei. Durch Auswaschung von Surfactant kommt es zu einem raschen Abfall der pulmonalen Compliance, zur Ausbildung von Atelektasen und somit zu einer Erhöhung des intrapulmonalen Rechts-Links-Shunts, der -wie beim ARDS- schließlich eine sauerstoffrefraktäre, arterielle Hypoxämie erzeugt. Die pulmonale Inflammation im ARDS ist

im wesentlichen gekennzeichnet durch die Expression typischer pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 oder IL-6 (74). Die massive Freisetzung von TNF- α in der Initialphase des Lungenversagens wird in der Literatur als wichtiger pathophysiologischer Faktor angesehen (74,75). TNF- α führt zu einer Lockerung der Zell-Zell-Kontakte in der Alveole und damit zu einer weiteren Zunahme der Membranpermeabilität, zu einer massiven Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in die Alveole und das Interstitium und kann außerdem inflammationsabhängige Effekte wie die Apoptose von Alveolarzellen induzieren (74,76). All diese Mechanismen tragen letztlich zum Voranschreiten eines akuten Lungenversagens bei. Die Daten der hier vorgestellten eigenen Untersuchungen zum Lavagemodell konnten zeigen, dass durch das experimentelle Vorgehen eine relevante, pulmonale Inflammation hervorgerufen werden kann. Wesentlicher Träger dieser Inflammationsreaktion in diesem Modell ist TNF- α (77). Wir konnten ebenfalls nachweisen, dass typische nachgeschaltete Signalkaskaden der Inflammation im Lavagemodell aktiviert werden. Hierzu zählt zum Beispiel die Aktivierung der Hemoxygenase-1 (HO-1) oder bestimmter zellulärer Schutzproteine wie der ribosomalen s6-Kinase (p90RSK), die üblicherweise als zelluläre Antwort nach DNA-Schaden, Inflammation oder zellulärem Stress induziert werden (78). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien, die ähnliche Expressionsmuster nach inflammatorischer Schädigung der Lunge nachweisen konnten (79). In der Zusammenschau der Daten erscheint das Lavagemodell als geeignet, experimentelle Interventionsstrategien im Lungenversagen zu überprüfen, die auf die pulmonale Inflammation abzielen.

3.5 AT2-Rezeptor vermittelte Hemmung der Inflammation

Der Angiotensin II Typ 2-Rezeptor ist an der Regulation von Inflammationskaskaden beteiligt. In eigenen Vorarbeiten wurden die anti-inflammatorischen Effekte dieses Rezeptorsubtyps näher charakterisiert (40). Wir konnten zeigen, dass C21, ein selektiver Agonist am AT2-Rezeptor, in einem *in vitro* Inflammationsmodell zu einer signifikanten Hemmung der transkriptionellen und translationalen Expression typischer pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α führt. Die Effekte waren hierbei zeit- und dosisabhängig und durch eine gleichzeitige Applikation spezifischer Antagonisten am AT2-Rezeptor praktisch vollständig reversibel. Die Mechanismen, über die der AT2-Rezeptor zu einer Hemmung der Inflammation führt, sind bislang nicht genau verstanden. Untersuchungen konnten zeigen, dass die Hemmung von NF- κ B im Mittelpunkt der anti-inflammatorischen Signalkaskade steht (80). In einer Reihe von tierexperimentellen Modellen, in denen eine lokale Inflammation eine ausschlaggebende Rolle spielt, ist das Konzept eines funktionellen Agonismus am AT2-Rezeptor bereits erfolgreich therapeutisch angewendet worden (38,39,49-54). Hierbei ließen sich *in vitro* und *in vivo*

deutliche geweberegenerative und anti-inflammatorische Wirkungen von C21 nachweisen, die teilweise mit einem verbesserten klinischen Zustand der Versuchstiere verbunden waren. So reduzierte die selektive AT2-Rezeptorstimulation mit C21 in einem Tiermodell des akuten Schlaganfalls die lokale Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 oder IL-6 und führte zu einer signifikanten Begrenzung des neuronalen Schadens und einer geringeren Zahl an apoptotischen Zellen (26). In einem Modell des akuten Myokardinfarktes an der Ratte senkte C21 die Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, IL-1 und IL-2 signifikant. Überdies war die Rate an lokal apoptotischen Zellen signifikant geringer als in der Vergleichsgruppe. Dies führte zu einem signifikant kleineren Infarktareal und einer verbesserten myokardialen links- und rechtsventrikulären Pumpfunktion (50). Diese Ergebnisse unterstreichen die geweberegenerativen und protektiven Wirkmechanismen des AT2-Rezeptors. Beim akuten Lungenversagen ist dieses Konzept allerdings bislang nicht angewendet worden.

3.6 AT2-Rezeptor und akutes Lungenversagen

Da die pharmakologische Stimulation des AT2-Rezeptors sowohl anti-inflammatorisches, als auch geweberegeneratives Wirkpotential hat, erscheint es sehr wahrscheinlich, dass die Aktivierung dieses Rezeptors auch beim akuten Lungenversagen, bei dem gerade inflammatorische und gewebedestruktive Mechanismen im Vordergrund stehen, wirksam sein könnte. Die putative Wirkung des AT2-Rezeptors, nämlich die Hemmung pro-inflammatorischer Zytokine, die Verminderung des zellulären Schadens und die Minderung des apoptotischen Zelltodes in der Lunge, verspricht therapeutisches Potential. Neu ist in diesem Zusammenhang der Ansatz am Renin-Angiotensin-System, das bislang kein therapeutisches Target in der Therapie des akuten Lungenversagens darstellt. Aus diesem Grund wurde das Prinzip einer selektiven AT2-Rezeptorstimulation auf das in eigenen Vorarbeiten charakterisierte Modell des akuten Lungenversagens übertragen (77). Die Anwendung von C21 in diesem Modell führte zu einer signifikanten Hemmung der pulmonalen Inflammation. Besonders die Expression von TNF- α war durch eine gleichzeitige Stimulation des AT2-Rezeptors im experimentellen Lungenversagen signifikant reduziert. Allerdings konnte im Rahmen dieser Untersuchungen keine signifikante Verbesserung des pulmonalen Ödems oder des pulmonalen Gasaustausches gezeigt werden. Klein und Kollegen konnten in verschiedenen anderen Modellen des akuten Lungenversagens teilweise protektive Wirkungen von Angiotensin-(1-7) und dessen pharmakologischer Analoga nachweisen (81). Für diese Substanzen, die in ihrer Struktur mit Angiotensin-II eng verwandt sind, wird ein teilweiser Agonismus am AT2-Rezeptor diskutiert. Die beschriebenen protektiven Effekte

verringerten zwar im Modell das pulmonale Ödem und verbesserten den histologisch quantifizierbaren Schaden in der Lunge, eine Verbesserung des pulmonalen Gasaustausches konnte allerdings auch in diesen Modellen nicht zweifelsfrei gezeigt werden. Aus theoretischen Überlegungen heraus erscheint der hier gemessene Effekt einer substantiellen Hemmung von TNF- α dennoch als ein erstrebenswertes Ziel in der experimentellen Therapie des Lungenversagens. Weitere Studien, die andere Modelle und andere Zielgrößen einbeziehen, müssen in Zukunft klären, welche Bedeutung der AT2-Rezeptor als pharmakologisches Target bei der Therapie des akuten Lungenversagens hat.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Das "*Adult Respiratory Distress Syndrom*" (ARDS) ist das akute Lungenversagen des Erwachsenen, dessen klinisches Leitsymptom die schwere, teils lebensbedrohliche Hypoxämie ist. Spezifische, pharmakologische Therapien für dieses relevante, intensivmedizinische Krankheitsbild existieren bislang nicht. Trotz intensiver Forschungsbemühungen und erheblicher Fortschritte in den Behandlungsmöglichkeiten ist das ARDS auch heute noch mit einer hohen Mortalitätsrate behaftet und bleibt eine Herausforderung für die moderne Intensivmedizin.

Die vorliegende Habilitationsschrift nähert sich dem akuten Lungenversagen sowohl von klinischer, als auch von grundlagenwissenschaftlich-experimenteller Seite. Die hier vorgestellten Arbeiten befassen sich im ersten Teil schwerpunktmäßig mit der Bewertung des Mortalitätsrisikos von Patienten im akuten Lungenversagen. Klinische Faktoren und funktionelle Parameter des pulmonalen Gasaustausches werden auf ihre Wertigkeit bei der Einschätzung von Risiko und Prognose im ARDS überprüft. Die vorgestellten Untersuchungen zeigen dabei, dass die Betrachtung der pulmonalen Funktionalität unter Berücksichtigung der verwendeten Beatmungsinvasivität valide Aussagen über die Prognose des Patienten im ARDS liefern kann. Der Oxygenierungsindex OI, in dessen Berechnung der mittlere Atemwegsdruck eingeht, erscheint hierbei als ein gut geeigneter Parameter zur Einschätzung des Mortalitätsrisikos von Patienten mit ARDS. Eine Abschätzung der Prognose anhand intensivmedizinischer Scoringssysteme oder kategorialer Einteilungen der Patienten nach derzeit gültigen ARDS-Definitionen liefert nur unscharfe Aussagen. Eine weitere klinisch-retrospektive Arbeit zu diesem Thema zeigt, dass die Zahl der im peripheren Blut nachweisbaren Erythroblasten eine hohe prognostische Wertigkeit bei der Einschätzung des Mortalitätsrisikos von ARDS-Patienten aufweist. Das Vorhandensein dieser Zellen im Blut ist mit der Schwere des ARDS und dessen klinischen Verlauf assoziiert.

Im zweiten Teil dieser Habilitationsschrift sind experimentelle Arbeiten zusammengefasst, die eine pharmakologische Therapieoption evaluieren, die auf die pulmonale Inflammation als wesentlichen Mechanismus der Pathophysiologie im ARDS abzielt. Hierzu wurde zunächst ein Modell des akuten Lungenversagens hinsichtlich der pulmonalen Inflammation charakterisiert. In weiteren experimentellen Arbeiten wird gezeigt, dass der Angiotensin II AT₂-Rezeptor Agonist Compound 21 (C21) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* anti-inflammatorisches Wirkpotential hat und effektiv die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- α hemmen kann. Abschließend wird das Prinzip einer AT₂-Rezeptor-vermittelten Hemmung der Inflammation auf das zuvor charakterisierte Modell des akuten Lungenversagens angewendet. Die Ergebnisse dieser experimentellen Arbeit

zeigen, dass durch die Anwendung von C21 im Modell des akuten Lungenversagens zwar die pulmonale Inflammation signifikant abgemildert werden kann, es aber unter den gegebenen Bedingungen nicht zu einer messbaren Verbesserung des pulmonalen Ödems und des Gasaustausches kommt.

Im Rahmen der in dieser Habilitationsschrift zusammengefassten Studien und Untersuchungen konnte das Verständnis des akuten Lungenversagens erweitert werden. Zukünftige Studien müssen zeigen, ob Erythroblasten tatsächlich geeignet sind, als neuer Biomarker im ARDS zu fungieren. Ebenso bleibt abzuwarten, ob in Zukunft evidenzbasierte, pharmakologische Therapiestrategien entwickelt werden können, die über eine Stimulation des AT2-Rezeptors die Prognose von Patienten mit akutem Lungenversagen verbessern können.

5. Literaturverzeichnis

1. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, et al. Acute respiratory distress syndrome: The berlin definition. *JAMA* 2012, Jun 20;307(23):2526-33.
2. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967, Aug 12;2(7511):319-23.
3. Bellani G, Laffey JG, Pham T, Fan E, Brochard L, Esteban A, et al. Epidemiology, patterns of care, and mortality for patients with acute respiratory distress syndrome in intensive care units in 50 countries. *JAMA* 2016, Feb 23;315(8):788-800.
4. Pham T, Rubenfeld GD. Fifty years of research in ARDS. The epidemiology of acute respiratory distress syndrome. A 50th birthday review. *Am J Respir Crit Care Med* 2017, Apr 1;195(7):860-70.
5. Raymondos K, Dirks T, Quintel M, Molitoris U, Ahrens J, Dieck T, et al. Outcome of acute respiratory distress syndrome in university and non-university hospitals in germany. *Crit Care* 2017, May 30;21(1):122.
6. Wilson MR, Takata M. Inflammatory mechanisms of ventilator-induced lung injury: A time to stop and think? *Anaesthesia* 2013, Feb;68(2):175-8.
7. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest* 2012, Aug;122(8):2731-40.
8. Radermacher P, Maggiore SM, Mercat A. Fifty years of research in ARDS. Gas exchange in acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2017, Oct 15;196(8):964-84.
9. 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, May 4;342(18):1301-8.
10. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 2005, Oct 20;353(16):1685-93.
11. Dernaika TA, Keddissi JI, Kinaseswitz GT. Update on ARDS: Beyond the low tidal volume. *Am J Med Sci* 2009, May;337(5):360-7.
12. Baron RM, Levy BD. Recent advances in understanding and treating ARDS. *F1000Res* 2016;5.
13. Guérin C, Reignier J, Richard JC, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, et al. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2013, Jun 6;368(23):2159-68.
14. Combes A, Pesenti A, Ranieri VM. Fifty years of research in ARDS. Is extracorporeal circulation the future of acute respiratory distress syndrome management? *Am J Respir Crit Care Med* 2017, May 1;195(9):1161-70.
15. Alessandri F, Pugliese F, Ranieri VM. The role of rescue therapies in the treatment of severe ARDS. *Respir Care* 2018, Jan;63(1):92-101.

16. Amato MB, Meade MO, Slutsky AS, Brochard L, Costa EL, Schoenfeld DA, et al. Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2015, Feb 19;372(8):747-55.
17. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L, et al. Report of the american-european consensus conference on ARDS: Definitions, mechanisms, relevant outcomes and clinical trial coordination. The consensus committee. *Intensive Care Med* 1994;20(3):225-32.
18. Yadav H, Thompson BT, Gajic O. Fifty years of research in ARDS. Is acute respiratory distress syndrome a preventable disease? *Am J Respir Crit Care Med* 2017, Mar 15;195(6):725-36.
19. Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, et al. Epidemiology and outcome of acute lung injury in european intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive Care Med* 2004, Jan;30(1):51-61.
20. Lin CY, Kao KC, Tian YC, Jenq CC, Chang MY, Chen YC, et al. Outcome scoring systems for acute respiratory distress syndrome. *Shock* 2010, Oct;34(4):352-7.
21. Villar J, Pérez-Méndez L, López J, Belda J, Blanco J, Saralegui I, et al. An early PEEP/FIO2 trial identifies different degrees of lung injury in patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2007, Oct 15;176(8):795-804.
22. Ortiz RM, Cilley RE, Bartlett RH. Extracorporeal membrane oxygenation in pediatric respiratory failure. *Pediatr Clin North Am* 1987, Feb;34(1):39-46.
23. Seeley E, McAuley DF, Eisner M, Miletin M, Matthay MA, Kallet RH. Predictors of mortality in acute lung injury during the era of lung protective ventilation. *Thorax* 2008, Nov;63(11):994-8.
24. Relvas MS, Silver PC, Sagy M. Prone positioning of pediatric patients with ARDS results in improvement in oxygenation if maintained > 12 h daily. *Chest* 2003, Jul;124(1):269-74.
25. Dechert RE, Park PK, Bartlett RH. Evaluation of the oxygenation index in adult respiratory failure. *J Trauma Acute Care Surg* 2014, Feb;76(2):469-73.
26. Chen W, Ware LB. Prognostic factors in the acute respiratory distress syndrome. *Clin Transl Med* 2015, Dec;4(1):65.
27. Monteiro Júnior JG, Torres Dde O, da Silva MC, Ramos TM, Alves ML, Nunes Filho WJ, et al. Nucleated red blood cells as predictors of all-cause mortality in cardiac intensive care unit patients: A prospective cohort study. *PLoS One* 2015;10(12):e0144259.
28. Martin TR, Matute-Bello G. Experimental models and emerging hypotheses for acute lung injury. *Crit Care Clin* 2011;27(3):735-52.
29. Schuster DP. ARDS: Clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, Jan;149(1):245-60.
30. Modelska K, Pittet JF, Folkesson HG, Courtney Broaddus V, Matthay MA. Acid-induced lung injury. Protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 1999, Nov;160(5 Pt 1):1450-6.
31. Wang HM, Bodenstein M, Markstaller K. Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *Eur Surg Res* 2007;40(4):305-16.

32. Lachmann B, Robertson B, Vogel J. In vivo lung lavage as an experimental model of the respiratory distress syndrome. *Acta Anaesthesiol Scand* 1980, Jun;24(3):231-6.
33. Kuckelt W, Dauberschmidt R, Bender V, Hieronymi U, Mrochen H, Winsel K, Meyer M. Experimental investigations in adult respiratory distress syndrome (ARDS). Repeated pulmonary lavage in lewe-mini-pigs. I. Pulmonary mechanics, gas exchange, and pulmonary hemodynamics. *Exp Pathol* 1981;20(2):88-104.
34. Hoegl S, Boost KA, Czerwonka H, Dolfen A, Scheiermann P, Muhl H, et al. Inhaled IL-10 reduces biotrauma and mortality in a model of ventilator-induced lung injury. *Respir Med* 2009, Mar;103(3):463-70.
35. Hoegl S, Brodsky KS, Blackburn MR, Karmouty-Quintana H, Zwissler B, Eltzschig HK. Alveolar epithelial A2B adenosine receptors in pulmonary protection during acute lung injury. *J Immunol* 2015, Aug 15;195(4):1815-24.
36. Meduri GU, Bridges L, Shih MC, Marik PE, Siemieniuk RAC, Kocak M. Prolonged glucocorticoid treatment is associated with improved ARDS outcomes: Analysis of individual patients' data from four randomized trials and trial-level meta-analysis of the updated literature. *Intensive Care Med* 2016, May;42(5):829-40.
37. Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003, Jun;35(6):881-900.
38. Matavelli LC, Siragy HM. AT2 receptor activities and pathophysiological implications. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015, Mar;65(3):226-32.
39. Namsolleck P, Recarti C, Foulquier S, Steckelings UM, Unger T. AT2 receptor and tissue injury: Therapeutic implications. *Curr Hypertens Rep* 2014;16(2):1-10.
40. Menk M, Graw JA, von Haefen C, Sifringer M, Schwaiberger D, Unger T, et al. Stimulation of the angiotensin II AT2 receptor is anti-inflammatory in human lipopolysaccharide-activated monocytic cells. *Inflammation* 2015, Aug;38(4):1690-9.
41. Steckelings UM, Kaschina E, Unger T. The AT2 receptor--a matter of love and hate. *Peptides* 2005, Aug;26(8):1401-9.
42. Volpe M, Musumeci B, De Paolis P, Savoia C, Morganti A. Angiotensin II AT2 receptor subtype: An uprising frontier in cardiovascular disease? *J Hypertens* 2003, Aug;21(8):1429-43.
43. Granzow M, Schierwagen R, Klein S, Kowallick B, Huss S, Linhart M, et al. Angiotensin-II type 1 receptor-mediated janus kinase 2 activation induces liver fibrosis. *Hepatology* 2014, Jul;60(1):334-48.
44. Yaguchi S, Ogawa Y, Shimmura S, Kawakita T, Hatou S, Satofuka S, et al. Angiotensin II type 1 receptor antagonist attenuates lacrimal gland, lung, and liver fibrosis in a murine model of chronic graft-versus-host disease. *PLoS One* 2013;8(6):e64724.
45. Wang Y, Huang J, Liu X, Niu Y, Zhao L, Yu Y, et al. B-Arrestin-biased AT1R stimulation promotes extracellular matrix synthesis in renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 2017, Jul 1;313(1):F1-8.
46. Shen L, Mo H, Cai L, Kong T, Zheng W, Ye J, et al. Losartan prevents sepsis-induced acute lung injury and decreases activation of nuclear factor-kappaB and mitogen-activated protein kinases. *Shock* 2009;31(5):500-6.

47. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B, et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 2005, Jul 7;436(7047):112-6.
48. Imai Y, Kuba K, Penninger JM. Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2007;64(15):2006-12.
49. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, Beaudry H, Mahalingam AK, Wu X, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. *J Med Chem* 2004, Nov 18;47(24):5995-6008.
50. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: A novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation* 2008, Dec 9;118(24):2523-32.
51. Gelosa P, Pignieri A, Fändriks L, de Gasparo M, Hallberg A, Banfi C, et al. Stimulation of AT2 receptor exerts beneficial effects in stroke-prone rats: Focus on renal damage. *J Hypertens* 2009, Dec;27(12):2444-51.
52. McCarthy CA, Vinh A, Miller AA, Hallberg A, Alterman M, Callaway JK, Widdop RE. Direct angiotensin AT2 receptor stimulation using a novel AT2 receptor agonist, compound 21, evokes neuroprotection in conscious hypertensive rats. *PLoS One* 2014;9(4):e95762.
53. Chow BS, Koulis C, Krishnaswamy P, Steckelings UM, Unger T, Cooper ME, et al. The angiotensin II type 2 receptor agonist compound 21 is protective in experimental diabetes-associated atherosclerosis. *Diabetologia* 2016, Aug;59(8):1778-90.
54. Schwengel K, Namsolleck P, Lucht K, Clausen BH, Lambertsen KL, Valero-Esquitino V, et al. Angiotensin at2-receptor stimulation improves survival and neurological outcome after experimental stroke in mice. *J Mol Med (Berl)* 2016, Aug;94(8):957-66.
55. Töpfer L, Menk M, Weber-Carstens S, Spies C, Wernecke KD, Uhrig A, et al. Influenza A (H1N1) vs non-h1n1 ARDS: Analysis of clinical course. *J Crit Care* 2014, Jun;29(3):340-6.
56. Kumar A, Zarychanski R, Pinto R, Cook DJ, Marshall J, Lacroix J, et al. Critically ill patients with 2009 influenza A(H1N1) infection in Canada. *JAMA* 2009, Nov 4;302(17):1872-9.
57. Ramsey C, Kumar A. H1N1: Viral pneumonia as a cause of acute respiratory distress syndrome. *Curr Opin Crit Care* 2011, Feb;17(1):64-71.
58. Bertolini G, Rossi C, Crespi D, Finazzi S, Morandotti M, Rossi S, et al. Is influenza A(H1N1) pneumonia more severe than other community-acquired pneumonias? Results of the giviti survey of 155 Italian ICUs. *Intensive Care Med* 2011, Nov;37(11):1746-55.
59. Riquelme R, Torres A, Rioseco ML, Ewig S, Cillóniz C, Riquelme M, et al. Influenza pneumonia: A comparison between seasonal influenza virus and the H1N1 pandemic. *Eur Respir J* 2011, Jul;38(1):106-11.
60. Luyt CÉ, Combes A, Trouillet JL, Nieszkowska A, Chastre J. Virus-induced acute respiratory distress syndrome: Epidemiology, management and outcome. *Presse Med* 2011, Dec;40(12 Pt 2):e561-8.
61. Gattinoni L, Quintel M. Fifty years of research in ARDS why is acute respiratory distress syndrome so important for critical care? *Am J Respir Crit Care Med* 2016;194(9):1051-2.
62. Miles LF, Bailey M, Young P, Pilcher DV. Differences in mortality based on worsening ratio of partial pressure of oxygen to fraction of inspired oxygen corrected for immune system status and respiratory support. *Crit Care Resusc* 2012, Mar;14(1):25-32.

63. Ware LB. Prognostic determinants of acute respiratory distress syndrome in adults: Impact on clinical trial design. *Crit Care Med* 2005, Mar;33(3 Suppl):S217-22.
64. Balzer F, Menk M, Ziegler J, Pille C, Wernecke KD, Spies C, et al. Predictors of survival in critically ill patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): An observational study. *BMC Anesthesiol* 2016;16(1):108.
65. Burkett LL, Cox ML, Fields ML. Leukoerythroblastosis in the adult. *Am J Clin Pathol* 1965, Nov;44(5):494-8.
66. Stachon A, Sondermann N, Imohl M, Krieg M. Nucleated red blood cells indicate high risk of in-hospital mortality. *J Lab Clin Med* 2002, Dec;140(6):407-12.
67. Stachon A, Holland-Letz T, Krieg M. High in-hospital mortality of intensive care patients with nucleated red blood cells in blood. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(8):933-8.
68. Lehnhardt M, Katzy Y, Langer S, Druecke D, Homann HH, Steinstraesser L, et al. Prognostic significance of erythroblasts in burns. *Plast Reconstr Surg* 2005, Jan;115(1):120-7.
69. Stachon A, Segbers E, Holland-Letz T, Kempf R, Hering S, Krieg M. Nucleated red blood cells in the blood of medical intensive care patients indicate increased mortality risk: A prospective cohort study. *Crit Care* 2007;11(3):R62.
70. Menk M, Giebelhäuser L, Vorderwülbecke G, Gassner M, Graw JA, Weiss B, et al. Nucleated red blood cells as predictors of mortality in patients with acute respiratory distress syndrome (ARDS): An observational study. *Ann Intensive Care* 2018, Mar 27;8(1):42.
71. Stachon A, Bolulu O, Holland-Letz T, Krieg M. Association between nucleated red blood cells in blood and the levels of erythropoietin, interleukin 3, interleukin 6, and interleukin 12p70. *Shock* 2005, Jul;24(1):34-9.
72. Ward HP, Holman J. The association of nucleated red cells in the peripheral smear with hypoxemia. *Ann Intern Med* 1967, Dec;67(6):1190-4.
73. Purtle SW, Horkan CM, Moromizato T, Gibbons FK, Christopher KB. Nucleated red blood cells, critical illness survivors and postdischarge outcomes: A cohort study. *Crit Care* 2017;21(1):154.
74. Yang G, Hamacher J, Gorshkov B, White R, Sridhar S, Verin A, et al. The dual role of TNF in pulmonary edema. *J Cardiovasc Dis Res* 2010, Jan;1(1):29-36.
75. Schnyder-Candrian S, Quesniaux VF, Di Padova F, Maillet I, Noulin N, Couillin I, et al. Dual effects of p38 MAPK on tnf-dependent bronchoconstriction and tnf-independent neutrophil recruitment in lipopolysaccharide-induced acute respiratory distress syndrome. *J Immunol* 2005, Jul 1;175(1):262-9.
76. Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of tnfalpha in pulmonary pathophysiology. *Respir Res* 2006;7(1):125.
77. Menk M, Graw JA, Steinkraus H, Haefen CV, Siffringer M, Spies CD, et al. Characterization of inflammation in a rat model of acute lung injury after repeated pulmonary lavage. *Exp Lung Res* 2015;41(8):466-76.

78. Dümmler BA, Hauge C, Silber J, Yntema HG, Kruse LS, Kofoed B, et al. Functional characterization of human RSK4, a new 90-kda ribosomal S6 kinase, reveals constitutive activation in most cell types. *Journal of Biological Chemistry* 2005;280(14):13304-14.
79. Takashima K, Matsushima M, Hashimoto K, Nose H, Sato M, Hashimoto N, et al. Protective effects of intratracheally administered quercetin on lipopolysaccharide-induced acute lung injury. *Respir Res* 2014, Nov 21;15(1):150.
80. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Ströder K, Thöne-Reineke C, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension* 2010, Apr;55(4):924-31.
81. Klein N, Gembardt F, Supé S, Kaestle SM, Nickles H, Erfinanda L, et al. Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury. *Crit Care Med* 2013, Nov;41(11):e334-43.

6. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich auf meinem Weg in der Klinik und der Wissenschaft mit Rat und Tat begleitet haben und ohne die diese Habilitation nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Claudia Spies, Direktorin der Klinik für Anästhesie mit Schwerpunkt für operative Intensivmedizin – Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow-Klinikum & Campus Charité Mitte, für Ihre unermüdliche Unterstützung in der Klinik, der Forschung und der Wissenschaft und für das immer in mich gesetzte Vertrauen. Die durch sie geschaffenen Rahmenbedingungen haben mir den Freiraum gegeben, die wissenschaftlichen Projekte zu entwickeln und voranzutreiben, die dieser Habilitation zugrunde liegen.

Meinen zahlreichen Lehrern in der Klinik danke ich für eine exzellente Ausbildung, die mich erst zu einem Anästhesisten gemacht hat. Ein besonderer Dank gilt dabei Frau Prof. Maria Deja und Herrn Prof. Steffen Weber-Carstens, die in mir die Begeisterung für die Intensivmedizin geweckt haben. Die zahlreichen Gespräche und Diskussionen und ihre stete Ermutigung haben ganz wesentlich dazu beigetragen, dass ich diese Arbeit fertigstellen konnte.

Dr. Clarissa von Haefen, Dr. Marco Sifringer, PD Adrian Graw, Dr. David Schwaiberger und Nadine Lanzke danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit in der Klinik und im Labor, für die Freundschaften, die daraus entstanden sind und für die vielen Gespräche auch außerhalb der Laborwelt. Allen Kolleginnen und Kollegen meiner Klinik, insbesondere dem Team der Intensivstation, danke ich für Ihre Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und dafür, dass sie alle ein Arbeitsklima geschaffen haben, in dem diese Arbeit entstehen konnte.

Janko und Robert, die mich seit Jahrzehnten begleiten, danke ich dafür, dass sie die besten Freunde sind, die man sich wünschen kann. Meinen Eltern danke ich für ihre immerwährende und bedingungslose Unterstützung und dafür, dass sie mir immer alle Möglichkeiten gegeben haben.

Den wohl größten Dank möchte ich meiner wunderbaren Frau Jasmin und meinen Söhnen, Vincent und Constantin, aussprechen. Nur durch ihren Rückhalt, ihr Verständnis, ihre Geduld und ihre Unterstützung, ist diese Habilitation möglich geworden. Dafür von ganzem Herzen Danke.

7. Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Berlin, den 26.April 2018

Mario Menk