

Aus dem
CharitéCentrum 12 für Innere Medizin und Dermatologie
Medizinische Klinik m. S. Infektiologie und Pneumologie
Direktor: Prof. Dr. Norbert Suttorp
und
Arbeitsbereich Pulmonale Inflammation
Leitung: Prof. Dr. Martin Witzernath

Habilitationsschrift

Adjuvante Therapien für Beatmungsassoziierten Lungenschaden und akutes Lungenversagen

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach Innere Medizin, Pneumologie, Intensivmedizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Dr. med. Holger Christian Müller-Redetzky

Eingereicht: Februar 2022

Dekan: Prof. Dr. Axel R. Pries

1. Gutachter: Prof. Dr. Mathias Pletz

2. Gutachter: Prof. Dr. Armin Braun

Inhalt

1.	Einleitung.....	1
1.1.	Akutes Lungenversagen (ARDS) und Beatmungsinduzierter Lungenschaden	1
1.2.	Pathophysiologische Grundlagen von VILI – Biotraumakonzept	2
1.2.1.	Mechanotransduktion.....	3
1.2.2.	Zytokine und Danger associated molecular patterns (DAMPs)	4
1.2.3.	Leukozyten	4
1.2.4.	Pulmonalvaskuläre Permeabilität	5
1.2.5.	VILI in vorgeschädigtem Lungengewebe.....	6
1.2.6.	VILI und extrapulmonales Organversagen	6
1.2.7.	VILI und Fibrose	7
1.3.	Adjuvante Therapien bei VILI und ARDS.....	8
2.	Eigene Arbeiten	10
2.1.	FTY720 beeinflusst dosisabhängig pulmonalvaskuläre Permeabilität bei VILI.....	10
2.2.	Intermedin stabilisiert endotheliale Barrierefunktion in vitro und bei VILI	21
2.3.	Exazerbation des Lungenschadens in der schweren Pneumonie durch Beatmung – protektive Wirkung von Adrenomedullin	33
2.4.	Neutralisation des Komplementfaktors C5a schützt vor Lungenschaden und extrapulmonaler Organschädigung bei schwerer Pneumonie und Beatmung	48
2.5.	Die Verlängerung der Inspirationszeit bei maschineller Beatmung aggraviert bei VILI	63
3.	Diskussion	75
3.1.	Verknüpfung von ARDS und VILI – Relevanz für experimentelle Studien	75
3.2.	Adjuvante Therapien für VILI und ARDS.....	76
3.2.1.	Der Sphingosin 1P Signalweg	77
3.2.2.	Adrenomedullin und Intermedin.....	79
3.2.3.	Neutralisation von C5a	82

3.2.4.	Einfluss des I:E Verhältnisses bei maschineller Beatmung auf die Entwicklung von VILI	84
4.	Zusammenfassung.....	85
5.	Literaturangaben	87
6.	Danksagung	96
7.	Erklärung.....	97

1. Einleitung

1.1. Akutes Lungenversagen (ARDS) und Beatmungsinduzierter Lungenschaden

Das akute Lungenversagen (*Acute Respiratory Distress Syndrome*; ARDS) ist definiert als eine akute, schwere hypoxämie respiratorische Insuffizienz, die sich auf dem Boden diverser Ätiologien entwickeln kann. Dazu zählen in abnehmender Häufigkeit Pneumonien, Septischer Schock, Aspirationsereignisse, Thoraxtrauma oder die Verbrennungskrankheit. Die verschiedenen Ätiologien haben im Detail unterschiedliche Pathomechanismen, münden aber alle in der Entstehung einer schweren respiratorischen Insuffizienz. Meist ist dabei ein Großteil des Lungengewebes betroffen, es kommt zu einer entzündlichen Aktivierung des Lungengewebes, dem Einstrom von Leukozyten und der Freisetzung von proentzündlichen Botenstoffen, sowie der Entwicklung eines Hochpermeabilitätslungenödems als Konsequenz einer gestörten endo-epithelialen Barrierefunktion. Entsprechend versteht man das ARDS auch als ein Syndrom und nicht als eine spezifische Erkrankung (1). Die aktuelle klinische Definition des ARDS, die „Berlin Definition“ formuliert folgende Diagnosekriterien für das ARDS: Akutes Auftreten der Erkrankung innerhalb von 7 Tagen, bilaterale Verdichtungen im Röntgenthorax bzw. in der Computertomographie (CT) des Thorax und Ausschluss einer kardialen Genese des Lungenödems. Anhand des Ausmaßes der Hypoxämie werden die Schweregrade mild (arterieller Sauerstoffpartialdruck ($p\text{aO}_2$) / inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO_2); P/F Ratio) P/F 300-200, moderat P/F Ratio 200 bis 100, schwer P/F Ratio <100 bei invasiver bzw. nicht invasiver Beatmung mit einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) von mindestens 5 cmH_2O eingeteilt (2).

Die invasive Beatmung ist das Fundament der Therapie von ARDS Patient:innen. Durch die maschinelle Beatmung kann in der Mehrheit der Fälle die Oxygenierung sichergestellt werden und die Lunge kann unter dieser lebenserhaltenden Maßnahme heilen, bis ihre Funktion ausreichend wiederhergestellt ist.

Obwohl auf der einen Seite lebenserhaltend kristallisierte sich in diversen experimentellen Untersuchungen heraus, dass eine Überdruckbeatmung selbst Lungenschaden auszulösen bzw. eine bestehende Lungenschädigung aggravieren kann (3). Da vornehmlich Patientinnen und Patienten mit respiratorischem Versagen beatmet werden, die schon eine relevante Lungenschädigung aufweisen, war es nach Verbreitung der invasiven Überdruckbeatmung außerhalb der Operationsäle auf den entstehenden Intensivstationen lange nicht klar und weder histopathologisch noch klinisch abzugrenzen, ob und mit welcher Konsequenz Überdruckbeatmung Lungenschaden auslösen oder

aggravieren kann. Erst in Tierversuchen wurde erkannt, dass Beatmung neben den offensichtlichen Nebenwirkungen wie dem Pneumothorax bezeichnet als Barotrauma, Lungenschaden - VILI verursachen kann (4). Es wurde die protektive Wirkung von positivem endexpiratorischen Druck (PEEP) und der Reduktion von Tidalvolumen entdeckt (4,5). Diese, in vielen experimentellen Studien reproduzierten Beobachtungen waren die Voraussetzung für die Durchführung einer Reihe von klinischen Studien bei ARDS Patienten, von denen letztendlich die Reduktion der Tidalvolumina auf die besagten 6 ml/kg einen Überlebensvorteil für ARDS Patienten brachte (6,7).

In der zentralen großen ARDSNet Studie aus dem Jahr 2000 zeigte sich ein relevanter Überlebensvorteil für Patient:innen mit ARDS, wenn diese mit Tidalvolumina bis maximal 6 ml/kg (bezogen auf das ideale Körpergewicht) beatmet wurden. Die Kontrollgruppe wurde mit 12 ml/kg beatmet (7). Dies belegt die Relevanz von VILI für das Outcome von ARDS Patient:innen und war die Geburtsstunde der sich seitdem international weitläufig durchgesetzten lungenprotektiven Beatmung.

Die aktuellen Empfehlungen für die maschinelle Beatmung im ARDS beinhalten entsprechend das Limitieren von Tidalvolumina auf maximal 6 ml/kg Körpergewicht (bezogen auf das ideale Körpergewicht), Anwenden eines positiven endexpiratorischen Drucks, der sich an der für eine adäquate Oxygenierung benötigten inspiratorischen Sauerstoffkonzentration bemisst und die Beatmung mit inspiratorischen Plateaudrücken von unter 30 cmH₂O (8).

Trotzdem ist nicht auszuschließen, dass insbesondere in entzündlich bereits vorgeschädigtem Lungengewebe beim ARDS auch unter lungenprotektiver Beatmung noch VILI entsteht, der Einfluss auf den Krankheitsverlauf von ARDS Patient:innen haben kann. Aus dem Verständnis der Pathophysiologie von VILI könnten sich somit potenzielle pharmakologische adjuvante Therapieansätze für das ARDS ableiten lassen.

1.2. Pathophysiologische Grundlagen von VILI – Biotraumakonzept

Das klassische Barotrauma, also mechanisches Zerreißen von Lungengewebe und Austreten von Luft aus den originär luftleitenden Strukturen der Lunge, was nachfolgend z. B. zum Pneumothorax führt, ist für VILI nicht relevant. Die ohnehin schon niedrige Inzidenz von Barotraumata wurde auch in den klinischen Studien durch lungenprotektive Beatmung nicht beeinflusst (6,7).

Heute wird unter VILI das sogenannte Biotrauma verstanden. Biotrauma bedeutet, dass die Lunge den physikalischen Dehnungsreiz der Beatmung detektiert und in ein biochemisches Signal übersetzt.

Daraus resultiert eine potenziell gewebeschädigende Entzündungsreaktion. Es kommt sekundär oder auch als direkte Reaktion auf die Dehnung zur Erhöhung mikrovaskulärer Permeabilität, woraus ein Permeabilitätslungenödem entsteht (9). Mit der lokalen und systemischen Hyperinflammation ist das Auftreten von extrapulmonalem Organversagen assoziiert und es werden durch Beatmung auch Umbauprozesse im Lungengewebe angestoßen, die eine Fibrosierung von Lungengewebe als Folgeschäden bedingen können (10–13). Exemplarisch soll im Folgenden auf einzelne Pathomechanismen des Biotraumas eingegangen werden.

1.2.1. Mechanotransduktion

Die extrazelluläre Matrix ist über Ankerproteine wie Integrine an intrazelluläre Kinasen wie die *focal adhesion kinase* (FAK) gekoppelt. Die in der Matrix aufgenommene Dehnung wird so gerichtet in die Zelle „übertragen“, wodurch z. B. die FAK aktiviert wird. Die Deformierung von Aktinfasern des Zytoskeletts im Rahmen von Dehnung führt auch zu einer Aktivierung von Src Kinasen (14). Diese Kinasen stoßen Kaskaden von Signalen an, die z. B. die Aktivierung von Mitogen activated Kinasen wie p38, ERK und JNK beinhalten (15–17). Es resultiert die Translokation von Transkriptionsfaktoren wie z. B. Erg-1 und NFκB in den Zellkern, und in der Folge die Aktivierung von z. B. NFκB-abhängigen Signalwegen, in deren Folge es u. a. zur Produktion von pro-inflammatorische Zytokinen wie IL-8 oder IL-6 kommt (18,19). Weitere Mechanosensoren sind TRPV4 Kalziumkanäle, die z. B. durch Dehnung Makrophagen aktivieren und unmittelbar die endotheliale Barriere destabilisieren können, so dass es zur Entwicklung eines Lungenödems kommt (20–22). Epithelzellen, Makrophagen, aber auch Endothelzellen können durch Mechanotransduktion auf diese Weise Dehnung in Inflammation übersetzen. Es scheint dabei eine zeitliche Sequenz der Aktivierung einzelner Zellpopulationen in der Lunge zu geben, in der bereits in der ersten Minute nach Beginn der Beatmung Endothel-, dann Epithelzellen und schließlich erst mit etwas Verzögerung Makrophagen inflammatorisch aktiviert werden. Dies scheint vor dem Hintergrund der strukturellen Integration des Endothels und Epithels in das Parenchym und somit der unmittelbaren Übertragung der Lungendehnung auf diese Zellen nachvollziehbar und suggeriert eine sekundäre Aktivierung von Makrophagen z. B. durch parakrine Signalwege zwischen Makrophagen und Endo- bzw. Epithelzellen (23). Dieser fein regulierte Prozess der Mechanotransduktion suggeriert, dass über das Tidalvolumen hinaus auch andere Parameter der maschinellen Beatmung wie Atemfrequenz oder die Justierung von Inspirationszeiten oder Atemgasflüssen Einfluss auf VILI haben könnten.

1.2.2. Zytokine und Danger associated molecular patterns (DAMPs)

Pro-inflammatorische Zytokine tragen zur Steuerung der lokalen und wahrscheinlich auch systemischen Entzündungsreaktion bei VILI bei, indem sie z. B. Endothelzellen aktivieren und als chemotaktische Stimuli für die Rekrutierung von Entzündungszellen wie neutrophile Granulozyten wirken (9,24). Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$ oder $\text{IL-1}\beta$ können aber auch direkt Permeabilität am Endothel auslösen (25,26). Die isolierte Antagonisierung oder Neutralisierung von einzelnen Zytokinen wie $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$ oder CXCR2 Liganden konnte im Tiermodell die Entwicklung von VILI relevant vermindern (26–30).

Unter DAMPs werden endogene Moleküle subsummiert, die von Geweben im Rahmen von Schädigung oder Stress freigesetzt werden. Dazu gehören z. B. High Mobility Group Box 1 (HMGB-1), oxidierte Phospholipide oder Harnsäure (31,32). Diese Moleküle werden u. a. von Rezeptoren wie *Toll-like Receptor* (TLR) 2 und TLR 4 erkannt. TLRs sind klassische *pathogen recognition receptors*, die konservierte bakterielle Moleküle wie Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäure oder virale Nukleinsäuren erkennen. Sie sind essentiell für die adäquate pro-inflammatorische Reaktion des Wirtes bei Invasion durch Mikroorganismen (33). Auch nach Bindung von DAMPs wird eine entzündliche Reaktion analog der Erkennung von exogenen Molekülen ausgelöst, die zur inflammatorischen Schädigung des Lungengewebes und auch direkter Entwicklung von endo-epithelialer Permeabilität im VILI beiträgt. Die Neutralisation oder Antagonisierung von HMGB-1, Harnsäure oder oxydierten Phospholipiden zeigte sich als protektiv bei VILI und ARDS im Tiermodell (34–36).

1.2.3. Leukozyten

Histopathologisch imponiert bei VILI die Infiltration des Lungengewebes mit Leukozyten, vornehmlich neutrophilen Granulozyten. Neutropene Versuchstiere und Tiere, bei denen die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten durch Neutralisieren von für die Rekrutierung essentiellen Ankerproteinen wie Integrinen behindert wurde, scheinen vor VILI geschützt zu sein (26,37,38). Dies belegt in ausgewählten experimentellen Modellen eine funktionelle Rolle von neutrophilen in der Genese von VILI. Allerdings haben auch andere, unter Beatmung in die Lunge rekrutierte Leukozytenpopulationen, wie spezielle Monozytensubpopulationen Einfluss auf die Genese von VILI (39). Zentral scheint die Funktion von Alveolarmakrophagen zu sein, die wie beschrieben als residente Zellen schon an der initialen Mechanotransduktion und frühen Inflammation bei VILI beteiligt sind (21,23). Depletion von

Alveolarmakrophagen schützt Ratten vor der Entwicklung von VILI – es kommt zu einer geringeren Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine, geringeren Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und geringerem Lungenödem (40,41). Epithelzellen, die ebenfalls mechanosensibel sind, können die pro-inflammatorische Funktion von Alveolarmakrophagen anscheinend nicht übernehmen. Ob die Aktivierung der Alveolarmakrophagen aber durch direkte Aufnahme von Dehnungsreizen oder sekundär durch Aktivierung von gedehnten Epithelzellen erfolgt, ist experimentell bis dato noch nicht abschließend geklärt.

1.2.4. Pulmonalvaskuläre Permeabilität

Letztendlich resultiert die pulmonale Entzündungsreaktion in einem Permeabilitätslungenödem. Zentraler Mechanismus ist die Entwicklung von hoher pulmonalvaskulärer Permeabilität, es kommt zum Austreten von Blutplasma in das Interstitium und die Alveole und es resultiert eine Diffusionsstörung. Durch in die Alveole austretende Plasmaproteine wie Albumin wird Surfactant inaktiviert, der bei Beatmung darüber hinaus ohnehin verloren geht, die pulmonale Compliance sinkt und es kommt über die bereits bestehende Diffusionsstörung hinaus zu vermehrter Bildung von Atelektasen und somit Verlust von Gasaustauschfläche (24). Durch das Austreten von Fibrin und Gerinnungsfaktoren werden hyaline Membranen in den Alveolen gebildet, was die Diffusion beeinträchtigt (42). Durch das entstehende Lungenödem und die Surfactantinaktivierung kommt es zum Absinken der Compliance, und es steigen in der nun progredient inhomogen zu ventilierenden Lunge die transpulmonalen Drücke, was wiederum zu mehr physikalischer Belastung des Lungengewebes und somit Aggravierung von VILI führen kann. Permeabilität entsteht wie unter 1.2.1. beschrieben z. B. direkt durch Aktivierung von mechanosensiblen Kalziumkanälen, aber auch im Rahmen der inflammatorischen Antwort des Lungengewebes. Vaskuläre Permeabilität ist eine fein regulierte Reaktion des Endothels (43). Das ultrastrukturelle Korrelat für Permeabilität – interzelluläre Porenbildung – ist ein dynamischer Prozess und kann pharmakologisch beeinflusst werden. So konnte durch exogen zugeführtes Adrenomedullin, Simvastatin, Sphingosin 1 Phosphat oder einen Sphingosin 1 Phosphatrezeptoragonisten FTY720 Permeabilität im VILI bzw. ARDS gesenkt und somit das Lungenversagen eindrucksvoll minimiert werden (44–46).

Pulmonalvaskuläre Permeabilität und das resultierende Lungenödem mit seinen Folgen für die mechanische und Gasaustauschfunktion der Lunge ist somit ein zentraler Pathomechanismus von VILI und ARDS. Wie beschrieben kann Permeabilität pharmakologisch beeinflusst werden und stellt damit

einen sehr interessanten und potenziell effektiven Angriffspunkt für adjuvante Therapien für VILI und ARDS dar.

1.2.5. VILI in vorgeschädigtem Lungengewebe

Die überwiegende Mehrheit der pathophysiologischen Konzepte zur Genese von VILI beruhen auf Erkenntnissen, die in naiven gesunden Lungen in Tierversuchen gewonnen wurden. Allerdings scheint bereits entzündlich aktiviertes bzw. vorgeschädigtes Lungengewebe relevant vulnerabler hinsichtlich der Entwicklung von VILI zu sein.

So prädisponieren hämorrhagischer Schock, vorausgegangene Exposition gegenüber Lipopolysaccharid und Hyperoxie sowie eine bakterielle Pneumonie das Lungengewebe dazu, auf eine maschinelle Beatmung, die sonst nur subtilen Schaden verursacht, mit der Entwicklung von ausgeprägtem Lungenschaden zu reagieren (17,47–50).

Inflammatorisch aktiviertes Lungengewebe ist sehr viel empfänglicher für die Entwicklung von VILI und damit assoziierter extrapulmonaler Organdysfunktion. Folglich ist dies für die Übertragung von grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnissen in die Klinik zu berücksichtigen.

1.2.6. VILI und extrapulmonales Organversagen

Beatmung resultiert nicht nur in der Lunge in einer Entzündungsreaktion, sondern es kommt auch zu einem Anstieg von pro-inflammatorischen Zytokinen in der Zirkulation. Ranieri zeigte, dass bei Patientinnen und Patienten mit ARDS die Reduktion der Tidalvolumina von 12 ml/kg auf 6 ml/kg binnen Stunden zu einem Absinken der pro-inflammatorischen Zytokine in der Zirkulation führt (12). Weitere Analysen ergaben, dass lungenprotektive Beatmung mit niedrigeren IL-6 Spiegeln und damit assoziiert weniger extrapulmonalem Organversagen vor allem der Niere bei ARDS Patienten einhergingen (13). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Beobachtungen experimenteller Arbeiten. So provoziert VILI in Kaninchen die Freisetzung des Zytokins Fas Ligand (FasL) in die Zirkulation, was zu Nieren und Darmschädigung führt. Bemerkenswerterweise konnte auch bei ARDS Patientinnen und Patienten, die mit hohen Tidalvolumina beatmet wurden, im Vergleich zu lungenprotektiv beatmeten Patientinnen und Patienten signifikant mehr FasL im Blut nachgewiesen werden. Die gemessenen FasL Spiegel korrelierten wiederum positiv mit der Höhe des Serumkreatininspiegels (11). Bei Mäusen mit Pneumonie aggravierte Beatmung nicht nur Lungenschaden, sondern provozierte eine Exazerbation systemischer Zytokinspiegel und Leukopenie,

und führte zu extrapulmonaler Organschädigung in Leber, Nieren und Darm (47,48). VILI scheint somit ein relevanter Trigger für das Ausbilden von Sepsis und septischem Organversagen, insbesondere bei Pneumonie zu sein.

1.2.7. VILI und Fibrose

In Lungenbiopsien von ARDS Betroffenen ließ sich in ca. 50% der Proben eine Fibrosierung des Lungengewebes nachweisen und die Entwicklung von Lungenfibrose scheint mit einem schlechteren Behandlungsergebnis beim ARDS assoziiert zu sein (51). In experimentellen Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass VILI ein Auslöser bzw. zusätzlicher Stimulus für die Entwicklung von Lungenfibrose ist. So kommt es bei Mäusen, die nach Induktion eines Lungenschadens durch Säureinstillation für nur 2h beatmet wurden unter hohen Tidalvolumina im Gegensatz zu niedrigen Tidalvolumina zu deutlich höheren TGF- β Spiegeln in der Bronchoalveolären Lavage und Ablagerung von Kollagen im Lungengewebe. Ein zentraler Pathomechanismus scheint die Epithelial-Mesenchymale Transformation (EMT) zu sein (52). Es kommt unter Beatmung zur Aktivierung des darin integrierten WNT/ β -Catenin Signalweges (53,54). Eine weitere Beobachtung ist die Aktivierung von Mastzellen und Liberation von Tryptase ins Lungengewebe. Tryptase wiederum kann Fibrozyten zur Produktion von Kollagen stimulieren und ist so mit der Entwicklung von Lungenfibrose assoziiert (55). Neben der akuten Schädigung und den systemischen Auswirkungen ist somit auch die bereits früh einsetzende Fibrosierung des Lungengewebes als ein Pathomechanismus von VILI zu betrachten. Die Fibrosierung kann den akuten Verlauf wie beschrieben nachteilig beeinflussen und es liegt nahe, dass es im Falle der Genesung zu langfristigen lungenfunktionellen Einbußen bei Patienten nach ARDS kommen könnte. In der Tat finden sich 5 Jahre nach dem Überleben eines ARDS in einem Großteil von Patientinnen und Patienten milde Lungengerüstveränderungen in der CT des Thorax im Sinne leichtgradiger Fibrosierungen. Die Betroffenen haben teilweise auch entsprechende Auskultationsbefunde und trockenen Husten. Bemerkenswert erscheint, dass die Veränderungen vor allem in den nicht abhängigen Lungenpartien zu finden sind, was für einen kausalen Zusammenhang mit VILI spricht (56). Diese Veränderungen sind aber nicht mit lungenfunktionellen Einschränkungen zu korrelieren, denn lungenfunktionell finden sich keine Einschränkungen mehr 5 Jahre nach überstandenen ARDS. In einer gut charakterisierten großen ARDS Kohorte der Canadian Critical Care Trial Group war die Lungenfunktion normal, aber es wurden relevante funktionelle Leistungsminderungen auch noch 5 Jahre nach ARDS beobachtet, die mit keinem lungenstrukturellen Residuum zu erklären waren, sondern wahrscheinlich Spätfolgen der „ICU acquired weakness“

darstellten. (57). Somit kann die Interaktion von VILI und Fibrose bereits in der Akutphase des ARDS relevant sein. Ob dies bei ARDS Überlebenden langfristig von Relevanz ist, bleibt zu klären.

1.3. Adjuvante Therapien bei VILI und ARDS

VILI ist integraler Bestandteil der Pathologie des ARDS. Aus dem zuvor beschriebenen Konzept des Biotraumas bei VILI lässt sich ableiten, dass VILI über lungenprotektive Beatmung hinaus auch pharmakologisch adjuvant adressiert werden könnte. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass auch gesundes Lungengewebe unter Beatmung mit niedrigen Tidalvolumina inflammatorisch reagiert, in Tiermodellen auch unter niedrigen Tidalvolumina subtiler Lungenschaden nachzuweisen ist und vor allem vorgeschädigtes Lungengewebe relevant vulnerabler für die Entwicklung von VILI ist, scheint es sinnvoll, solche Therapiekonzepte in Erwägung zu ziehen. Dazu kommt, dass mit zunehmendem Schweregrad des ARDS das noch zu belüftende bzw. für die Beatmung zu rekrutierende Lungenvolumen sehr klein sein kann und man auch den empfohlenen Tidalvolumina unter 6 ml/kg das tolerable Ausmaß an verabreichter Dehnung des ventilierten Lungengewebes überschreiten kann(58).

Aus der Pathophysiologie, die hier in Grundzügen dargestellt wurde, lassen sich multiple Ansatzpunkte für eine adjuvante Pharmakotherapie ableiten. Da die überschießende, in ihrer Konsequenz letztendlich schädliche Entzündungsreaktion im Zentrum der Pathophysiologie von VILI steht, scheint es auf den ersten Blick logisch, VILI antiinflammatorisch zu begegnen. In der Tat kann durch immunsuppressive Therapie mit z. B. Steroiden VILI reduziert werden (59). Auch die Antagonisierung oder Neutralisation einzelner pro-inflammatorischer Mediatoren wie $TNF\alpha$ oder $IL-1\beta$, oder Depletion z. B. von neutrophilen Granulozyten oder Alveolarmakrophagen sind im Tiermodell beeindruckend protektiv gegen VILI (26,27,30,40,41). Allerdings wären bei diesen immunsuppressiven Strategien in einem nicht akzeptabel erscheinenden Maß infektiologische Nebenwirkungen zu erwarten. Insbesondere kritisch kranke Patienten sind durch ihre Grunderkrankungen wie z. B. Sepsis nicht ausreichend immunkompetent und haben somit ohnehin schon ein erhöhtes Risiko, Infektionen zu akquirieren (60,61). Inflammation im VILI führt letztendlich zur Störung von endo-epithelialer Barrierefunktion und in der Folge zur Entwicklung oder Progression eines Permeabilitätslungenödems, das mit seinen Konsequenzen wie oben beschrieben ganz im Zentrum der Pathophysiologie des Lungenversagens steht (62,63). Die endotheliale Barrierefunktion lässt sich direkt modulieren, ohne mit der angeborenen Immunantwort des Betroffenen zu interferieren. Beispiele dafür sind z. B. Sphingosin-1 Phosphat oder der Calcitonin receptor like receptor (CRLR) Ligand Adrenomedullin (ADM)

(44,64–66). Die Modulation der endothelialen Barrierefunktion stellt somit im Besonderen eine rationale und vielversprechende Therapiestrategie zur adjuvanten pharmakologischen Behandlung beim ARDS dar. Darüber hinaus ist es für die Minimierung von VILI von Interesse welche Beatmungsparameter neben Tidalvolumen und PEEP Einfluss auf das Biotrauma im VILI haben könnten, da auch auf diesem Wege VILI weiter minimiert werden könnte.

2. Eigene Arbeiten

2.1. FTY720 beeinflusst dosisabhängig pulmonalvaskuläre Permeabilität bei VILI

The Sphingosine-1 Phosphate receptor agonist FTY720 dose dependently affected endothelial integrity in vitro and aggravated ventilator-induced lung injury in mice

Holger Christian Müller, Andreas Christian Hocke, Katharina Hellwig, Birgitt Gutbier, Harm Peters, Stefanie Maria Schönrock, Thomas Tschernig, Andreas Schmiedl, Stefan Hippenstiel, Philippe Dje N'Guessan, Simone Rosseau, Norbert Suttorp, Martin Witzenrath

Pulm Pharmacol Ther. 2011 Aug;24(4):377-85. doi: 10.1016/j.pupt.2011.01.017. Epub 2011 Mar 23

Sphingosin-1 Phosphat (S1P) kann in vitro und in vivo durch Bindung an die Sphingosin-1 Phosphatrezeptoren endotheliale Barrierefunktion stabilisieren und S1P und der S1P Rezeptor Agonist Fingolimod (FTY720) schützen vor der Entwicklung endothelialer Permeabilität in verschiedenen Tiermodellen. Hohe Konzentration von S1P können aber gegenteilige Effekte am Endothel auslösen. FTY720 wird als Immunmodulator in der Therapie der Multiplen Sklerose eingesetzt, hat ein sehr hohes Verteilungsvolumen und ist in seiner Elimination abhängig von einem intakten Leberstoffwechsel. Bei kritisch kranken Patienten bzw. anderweitig eingeschränktem Leberstoffwechsel besteht das Risiko einer Akkumulation von FTY720. Es wurde untersucht welche Effekte hohe Konzentrationen von FTY720 auf Endothelzellen, endotheliale Barrierefunktion in vitro, pulmonalvaskuläre Permeabilität bei Mäusen und im speziellen bei beatmeten Mäusen haben.

FTY720 in Konzentrationen von 0.01, 0.1 und 1 μM verbesserte die endotheliale Barrierefunktion gemessen am transzellulären Widerstand von endothelialen Monolayern aus primären humanen umbelikalischen venösen Endothelzellen (HUVEC), während 10 und 100 μM FTY720 zu einem Abfall des transzellulären Widerstandes führten. Immunhistochemische Analysen und Messung der Degradation von Pro-Caspase 3 ergaben, dass FTY720 in diesen hohen Konzentrationen das Auftreten von Apoptose in HUVECs bedingte. Mäuse wurde mit einer niedrigen Dosis FTY720 0.1 mg/kgKG und einer hohen Dosis 2 mg/kgKG behandelt. Es wurde pulmonalvaskuläre Permeabilität gemessen und das Lungengewebe elektronenmikroskopisch untersucht. Verglichen mit Lösungsmittelkontrollen war die Permeabilität in beiden Gruppen normal aber in der 2mg/kgKG Gruppe zeigten sich vereinzelt Apoptose von Endothelzellen. Mit 0.1 mg/kgKG, 2mg/kgKG oder Lösungsmittel behandelte Mäuse wurden mit hohen Tidalvolumina von 17ml/kgKG für 2 Stunden beatmet um VILI auszulösen. 0.1

mg/kgKG FTY720 reduzierte in diesem Modell pulmonale Permeabilität während es bei Mäusen mit die mit 2mg/kg FTY720 behandelt wurden zu einem starken Anstieg der pulmonalen Permeabilität kam. In den mit 2mg/kg FTY720 behandelten Mäusen ergaben elektronenmikroskopische Untersuchungen ausgeprägte endotheliale Apoptosen was in der 0.1 mg/kgKG FTY720 Gruppe und der Kontrollgruppe nicht zu verzeichnen war.

Hohe Konzentrationen von FTY720 können das Endothel schädigen und zum Verlust der endothelialen Barrierefunktion führen. FTY720 in hoher Dosierung kann VILI Aggravieren. Dies könnte für FTY720 behandelte Patienten unter Beatmung bei denen es ggf. unter Verschlechterung der hepatischen Elimination zur Akkumulation von FTY720 kommt von Nachteil sein.

The Sphingosine-1 Phosphate receptor agonist FTY720 dose dependently affected endothelial integrity in vitro and aggravated ventilator-induced lung injury in mice

Pulm Pharmacol Ther. 2011 Aug;24(4):377-85

<https://doi.org/10.1016/j.pupt.2011.01.017>

2.2. Intermedin stabilisiert endotheliale Barrierefunktion in vitro und bei VILI

Intermedin stabilized endothelial barrier function and attenuated ventilator-induced lung injury in mice

Holger Christian Müller-Redetzky, Wolfgang Kummer, Uwe Pfeil, Katharina Hellwig, Daniel Will, Renate Paddenberg, Christoph Tabeling, Stefan Hippenstiel, Norbert Suttorp, Martin Witzenrath

PLoS One. 2012;7(5):e35832.doi: 10.1371/journal.pone.0035832. Epub 2012 May 1.

Das endogene Peptid Intermedin (IMD), alternativ auch Adrenomedullin (ADM) 2 genannt, weist eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit ADM auf. IMD bindet an den gleichen Rezeptor CRLR wie ADM und stabilisiert ebenfalls in vitro endotheliale Barrierefunktion. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse der Untersuchungen von ADM im VILI wurde die Wirkung von IMD auf endotheliale Barrierefunktion in vitro, seine Expression in der Lunge und Regulation im VILI, den Einfluss auf VILI induzierte Hyperpermeabilität und Entzündungsantwort sowie auf die hypoxische pulmonale Vasokonstriktion untersucht. IMD stabilisierte dosisabhängig die endotheliale Barrierefunktion, gemessen am transzellulären elektrischen Widerstand eines Endothelzellmonolayers. In der Lunge war IMD in Alveolarmakrophagen und Endothelzellen exprimiert. Die Expression von IMD, gemessen auf RNA- und Proteinebene, änderte sich durch Beatmung nicht. Bemerkenswert war aber die VILI induzierte Reduktion der Expression des receptor activity modifying protein 2 (RAMP2) Proteins, ein Protein, das für eine suffiziente Wirkung von IMD nach der Bindung am CRLR Rezeptor, essenziell ist. Mäuse wurden mit moderaten Tidalvolumina und einem PEEP von 2 cmH₂O für 6h beatmet und IDM über diese Zeit kontinuierlich infundiert. Unter IMD Behandlung entwickelte sich eine geringere pulmonalvaskuläre Permeabilität. Beatmung führte zu einer Rekrutierung von Leukozyten in die Lunge, und der Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, worauf IMD keinen Einfluss hatte. Die barriestabilisierende Wirkung von IMD scheint somit ein direkter Effekt auf das Endothel gewesen zu sein und nicht indirekt über Modulation von Inflammation vermittelt worden zu sein. Trotz verminderter Permeabilität war die Oxygenierung unter IMD nur leicht verbessert. Experimente an vitalem murinen Lungengewebe konnten nachweisen, dass die hypoxische Vasokonstriktion durch IDM dosisabhängig reduziert wurde. In vivo würde ein solcher Effekt das Verhältnis von Ventilation zu Perfusion im Lungengewebe potenziell nachteilig beeinflussen, die Shuntperfusion der Lunge erhöhen, was zu einer schlechteren Oxygenierung führen würde. Dies könnte eine Erklärung für den geringen Effekt von IMD auf die gemessene Oxygenierung sein. Zusammengefasst zeigte IMD, ähnlich wie ADM, barriestabilisierende Effekte, die protektiv bei VILI wirkten.

Intermedin Stabilized Endothelial Barrier Function and Attenuated Ventilator-induced Lung Injury in Mice

Holger Christian Müller-Redetzky¹, Wolfgang Kummer², Uwe Pfeil², Katharina Hellwig¹, Daniel Will¹, Renate Paddenberg², Christoph Tabeling¹, Stefan Hippenstiel¹, Norbert Suttorp¹, Martin Witzernath^{1*}

¹ Department of Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany, ² Institute for Anatomy and Cell Biology, Universities of Giessen and Marburg Lung Center, Justus-Liebig-University Giessen, Germany

Abstract

Background: Even protective ventilation may aggravate or induce lung failure, particularly in preinjured lungs. Thus, new adjuvant pharmacologic strategies are needed to minimize ventilator-induced lung injury (VILI). Intermedin/Adrenomedullin-2 (IMD) stabilized pulmonary endothelial barrier function in vitro. We hypothesized that IMD may attenuate VILI-associated lung permeability in vivo.

Methodology/Principal Findings: Human pulmonary microvascular endothelial cell (HPMVEC) monolayers were incubated with IMD, and transcellular electrical resistance was measured to quantify endothelial barrier function. Expression and localization of endogenous pulmonary IMD, and its receptor complexes composed of calcitonin receptor-like receptor (CRLR) and receptor activity-modifying proteins (RAMPs) 1–3 were analyzed by qRT-PCR and immunofluorescence in non ventilated mouse lungs and in lungs ventilated for 6 h. In untreated and IMD treated mice, lung permeability, pulmonary leukocyte recruitment and cytokine levels were assessed after mechanical ventilation. Further, the impact of IMD on pulmonary vasoconstriction was investigated in precision cut lung slices (PCLS) and in isolated perfused and ventilated mouse lungs. IMD stabilized endothelial barrier function in HPMVECs. Mechanical ventilation reduced the expression of RAMP3, but not of IMD, CRLR, and RAMP1 and 2. Mechanical ventilation induced lung hyperpermeability, which was ameliorated by IMD treatment. Oxygenation was not improved by IMD, which may be attributed to impaired hypoxic vasoconstriction due to IMD treatment. IMD had minor impact on pulmonary leukocyte recruitment and did not reduce cytokine levels in VILI.

Conclusions/Significance: IMD may possibly provide a new approach to attenuate VILI.

Citation: Müller-Redetzky HC, Kummer W, Pfeil U, Hellwig K, Will D, et al. (2012) Intermedin Stabilized Endothelial Barrier Function and Attenuated Ventilator-induced Lung Injury in Mice. PLoS ONE 7(5): e35832. doi:10.1371/journal.pone.0035832

Editor: Samithamby Jeyaseelan, Louisiana State University, United States of America

Received: September 14, 2011; **Accepted:** March 22, 2012; **Published:** May 1, 2012

Copyright: © 2012 Müller-Redetzky et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study is supported in part by grants from the German Research Foundation (<http://www.dfg.de/index.jsp>) to ACH, SH, NS, MW (SFB/TR84) and SH (HI-789/6-1) and MW (OP-87/1), the Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System to UP and WK, and the German Federal Ministry of Education and Research (<http://www.bmbf.de/>) to SH, NS (Pneumonia Research Network on Genetic Resistance and Susceptibility for the Evolution of Severe Sepsis PROGRESS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: martin.witzernath@charite.de

Introduction

Mechanical ventilation (MV) is a life saving treatment without alternatives in acute respiratory failure, and MV is also employed following surgery or trauma. One third of all patients in intensive care units are receiving MV [1]. Notably, even a minimum of physical forces on lung tissue induced by MV may evoke ventilator-induced lung injury (VILI), an important undesirable effect of respirator therapy [2]. Minimization of MV-induced physical stress by reduction of tidal volumes to 6 ml/kg significantly improved clinical outcome of mechanically ventilated patients [3]. However, particularly preinjured lungs are sensitive for the development of VILI even in the setting of lung-protective ventilation [4,5]. VILI is characterized by pulmonary inflammation with liberation of cytokines, recruitment of leukocytes to the lung and particularly increased lung permeability, resulting in lung edema, surfactant dysfunction, impaired lung compliance and deterioration of pulmonary gas exchange [6]. As the necessity to

guarantee sufficient gas exchange frequently limits a further substantial reduction of tidal volumes and oxygen supply, new adjuvant pharmacological therapies enhancing pulmonary vascular barrier function in VILI/acute respiratory distress syndrome (ARDS) in addition to lung-protective ventilation are needed to prevent or ameliorate VILI.

We have previously shown that the potent barrier protective properties of the calcitonin receptor-like receptor (CRLR) agonist adrenomedullin reduced VILI in different murine VILI models [7]. Intermedin (IMD), alternatively named adrenomedullin-2, is an endogenous peptide also signaling via CRLR coupled to the receptor activity-modifying proteins (RAMP) 2 or 3 [8,9]. Intermedin stabilized endothelial barrier function in vitro and in an isolated mouse lung model of hydrostatic lung edema [10,11], and reduced pulmonary leukocyte infiltration in pulmonary ischemia/reperfusion injury [12]. Further, IMD had protective effects in cardiac ischemia/reperfusion injury and lowered systemic blood pressure [8,13,14].

Pulmonary hyperpermeability and hyperinflammation are hallmarks of VILI and ARDS, and pharmacologic attenuation of vascular barrier breakdown in these conditions may be a promising therapeutic approach to limit VILI in addition to lung protective ventilation strategies. We hypothesized that the CRLR ligand IMD has barrier protective effects in a murine model of VILI *in vivo*.

In the current study we observed IMD-evoked barrier stabilization on endothelial cell layers *in vitro*. In a clinically relevant mouse model of VILI, continuously infused IMD reduced VILI-induced pulmonary hyperpermeability without affecting pulmonary and systemic inflammation. IMD revealed vasodilatory effects on pulmonary vasculature in mouse lungs. Further, the influence of MV on pulmonary IMD expression and distribution as well as on expression of the IMD receptor components was investigated.

Methods

Ethics Statement

Animal experiments were approved by the animal ethics committee of the Charité-Universitätsmedizin Berlin and local governmental authorities (LAGeSo (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin), approval ID: G 0100/10).

Transcellular Electrical Resistance (TER) of Endothelial Cells

Human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMVEC) were purchased from PromoCell (Heidelberg, Germany) and grown on evaporated gold electrodes, connected to an electrical cell-substrate impedance system (Applied Biophysics, Troy, NY, USA). Cells were exposed to 0.01 or 0.1 μM human IMD (1–47, Phoenix, Burlingame, CA, USA) or solvent and TER values from each microelectrode were continuously monitored as described previously [15].

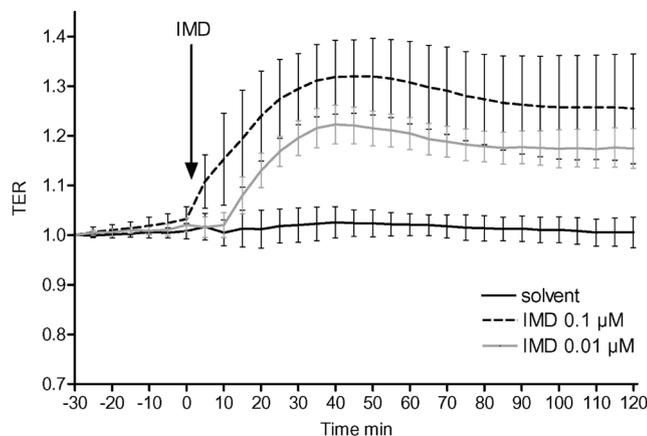


Figure 1. IMD improved endothelial barrier function in endothelial cells. HPMVECs grown to confluence on gold microelectrodes to measure transcellular electrical resistance (TER) were stimulated with 0.01 or 0.1 μM IMD or with solvent. IMD dose dependently improved endothelial barrier function as displayed by TER increase. (n = 6). doi:10.1371/journal.pone.0035832.g001

Mice

Female C57Bl/6 mice (8 to 10 weeks; 18 to 20 g; Charles River, Sulzfeld, Germany) were used.

Mechanical Ventilation and IMD Treatment

As described previously [16] mice were anesthetized by intraperitoneal injections of Fentanyl (75 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Midazolam (1.5 mg/kg) and Medetomidin (0.75 mg/kg). Repetitively, Fentanyl (16 $\mu\text{g}/\text{kg}$), Midazolam (0.33 mg/kg) and Medetomidin (0.16 mg/kg) was supplied via an intraperitoneal catheter when required to guarantee adequate anaesthesia during the observation period. Body temperature was maintained at 37°C by a temperature-controlled heating pad. After tracheotomy and intubation, mice were ventilated (MiniVent, Hugo-Sachs-Electronics, March-Hugstetten, Germany) with 70% oxygen; tidal volume (V_T) 7 ml/kg; respiratory rate (RR) 240 min^{-1} ; positive end-expiratory pressure (PEEP) 6 cmH_2O . A carotid artery catheter was placed for blood pressure monitoring and infusion of NaCl 0.9% containing 100 mmol/l HCO_3^- (350 $\mu\text{l}/\text{h}$). There was no additional fluid support in any conducted experiment. A urinary catheter was inserted. V_T , RR, airway pressure, peripheral oxygen saturation and urine output were monitored (Pulmodyn, Hugo-Sachs-Electronics, March-Hugstetten, Germany; MouseOx, STARRLife-Sciences, Oakmont, PA, USA). After preparation, a recruitment manoeuvre was performed (airway pressure 35 cmH_2O for 5 sec) before respirator settings were adjusted for 6 h to V_T 12 ml/kg, RR 120 min^{-1} , PEEP 2 cmH_2O . A second recruitment manoeuvre was performed 5 min before termination of the experiment. All mice survived the protocol. At termination of the experiments mice were sacrificed by exsanguination via the carotid artery catheter. Blood samples were analyzed for $p_a\text{O}_2$ and lactate by blood gas analyzer (ABL-800, Radiometer, Copenhagen, Denmark). P/F ratio was calculated as $p_a\text{O}_2/\text{FiO}_2$. Non-ventilated mice served as controls. Murine IMD (1–47, Phoenix, Burlingame, CA, USA) (0.025 mg/kg/h) was continuously infused via the carotid artery catheter starting with onset of ventilation.

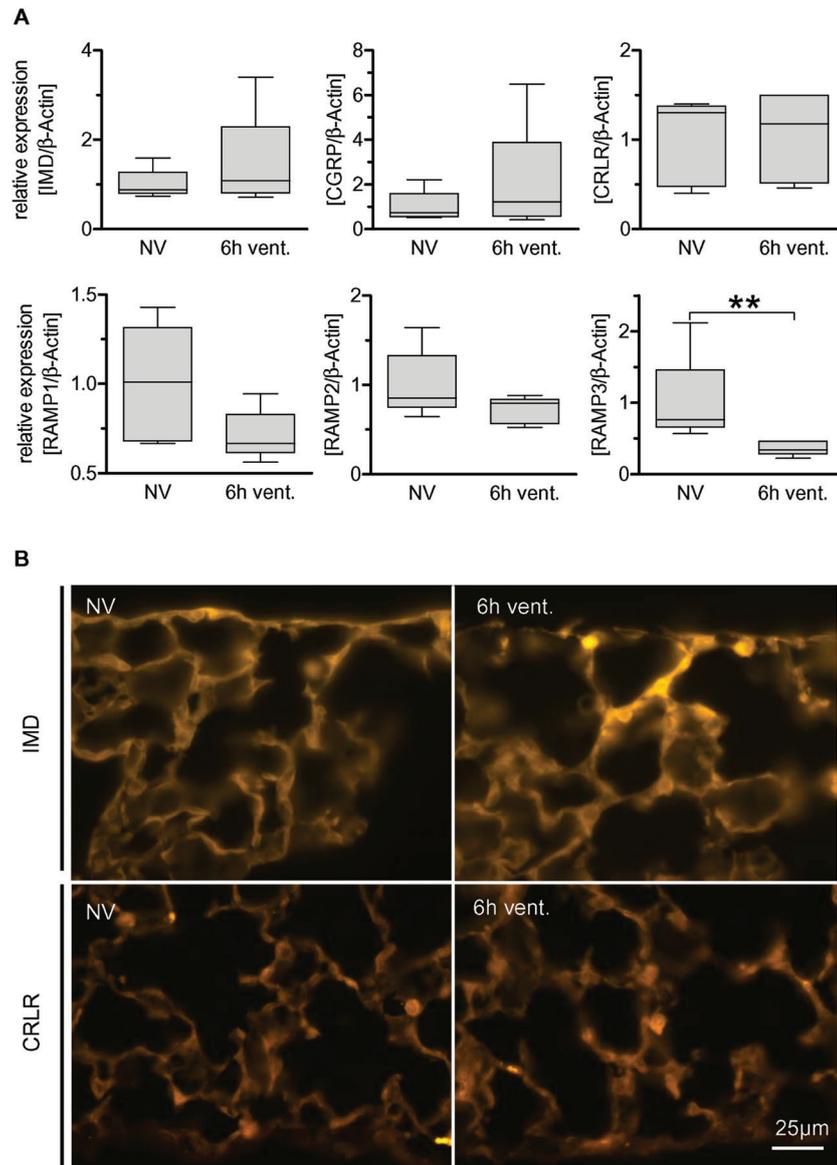


Figure 2. Regulation of IMD and its receptor complexes in VILI. Mice were ventilated with a tidal volume of 12 ml/kg for 6 h (6 h vent.). Non ventilated individuals (NV) served as controls. A) Regulation of IMD, CGRP and RAMP1-3 was quantified by qRT-PCR in the lungs of ventilated (6 h vent.) and non ventilated mice (NV). (** $p < 0.01$, $n = 5$). B) Immunofluorescence analysis of subpleural peripheral lung. IMD-immunolabelling was slightly enhanced in ventilated (6 h vent.) compared to non-ventilated mice (NV) while CRLR-immunolabelling did not differ between groups. Tissue sections depicting NV and 6 h vent groups were processed simultaneously and images were taken at the same exposure time (30 ms for IMD and 150 ms for CRLR).
doi:10.1371/journal.pone.0035832.g002

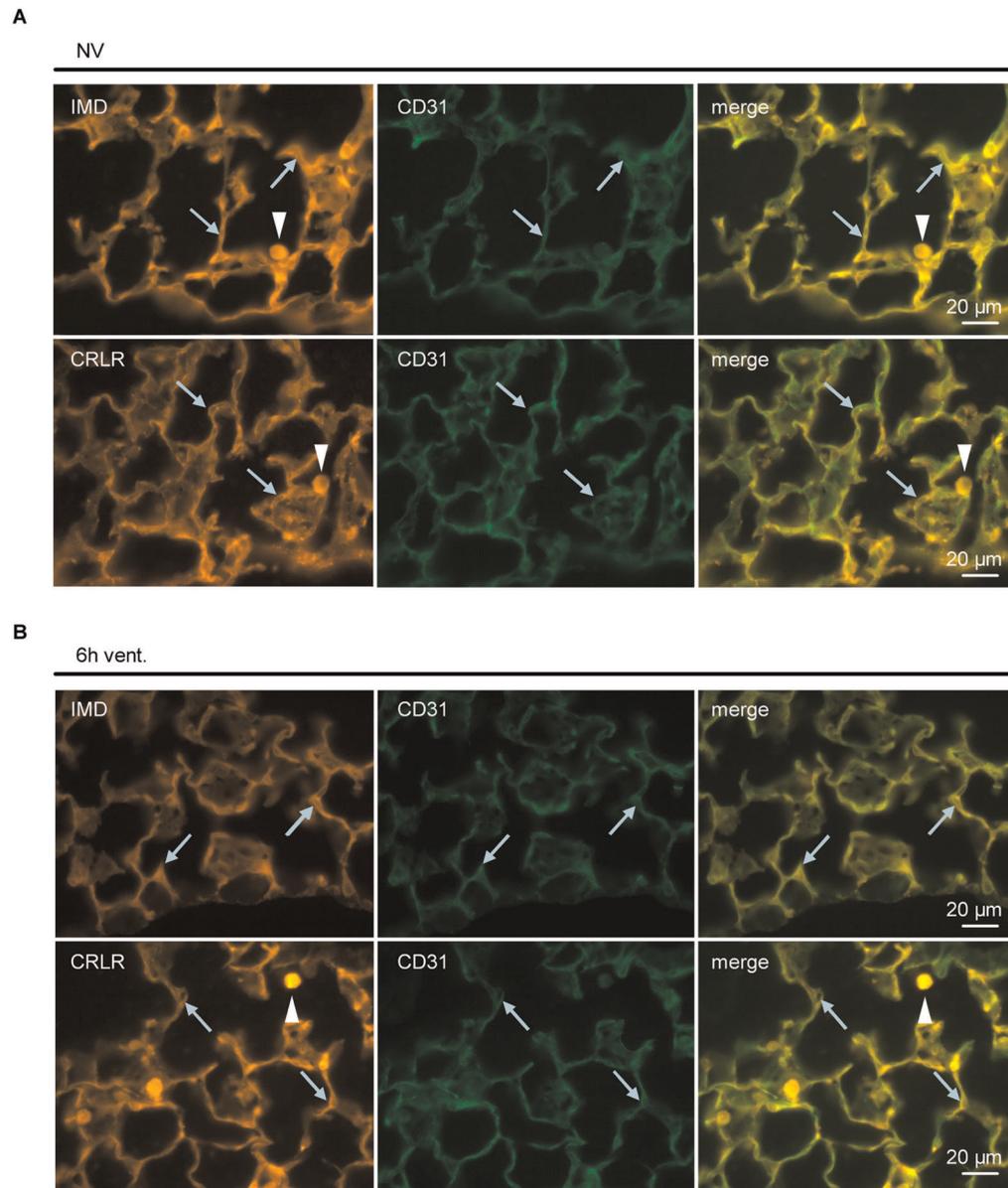


Figure 3. Pulmonary distribution of IMD and CRLR was not altered in VILI. In non ventilated mice (A) and individuals ventilated with a tidal volume of 12 ml/kg for 6 h (6 h vent.) (B) IMD- and CRLR-immunolabelling colocalized with CD31-immunoreactivity (*arrows*), a marker for endothelial cells. In addition, alveolar macrophages were IMD- and CRLR-positive (*arrowheads*). (n = 5, representative images shown).
doi:10.1371/journal.pone.0035832.g003

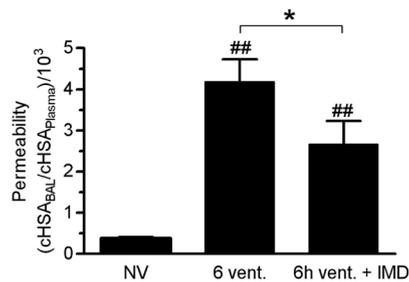


Figure 4 IMD reduced pulmonary vascular hyperpermeability in VILI. Mice were ventilated with a tidal volume of 12 ml/kg for 6 h and treated with IMD 0.025 mg/kg^h (6 h vent.+IMD) or solvent (6 h vent). NV = non ventilated mice. Human serum albumin (HSA) was infused 90 min prior to termination of the experiment. HSA concentration (cHSA) in plasma and BAL were determined. Increased HSA BAL/plasma ratio indicated microvascular leakage. (* $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ vs. NV, NV $n = 5$, 6 h vent. $n = 7$, 6 h vent. + IMD $n = 8$) doi:10.1371/journal.pone.0035832.g004

qRT-PCR

Lungs were flushed and snap frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated from the lungs using RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. To remove genomic DNA contamination, isolated RNA samples were treated with 1 U DNase/ μ g RNA (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) for 15 min at 37°C. One microgram of total RNA was used in a 20 μ l reaction to synthesize cDNA using Superscript H⁻ reverse transcriptase (200 U/ μ g RNA, Invitrogen) and oligo dTs as primers. Reverse transcription reaction was for 50 min at 42°C. Real-time quantitative PCR was performed using the I-Cycler IQ detection system (Bio-Rad, Munich, Germany) in combination with the IQ SYBR Green Real-Time PCR Supermix (Bio-Rad). The PCR conditions included initial denaturation in one cycle of 10 min at 95°C followed by 40 cycles of 20 s at 95°C, 20 s at 60°C, and 20 s at 72°C. The relative expressions were calculated as: $2^{-(\Delta\Delta CT)} \times 1/\text{mean control } 2^{-(\Delta\Delta CT)}$, where $\Delta\Delta CT$ is calculated as: $\Delta\Delta CT = CT_{GOI} - CT_{HKG}$ (GOI: gene of interest, HKG: house keeping gene). Primer sequences are provided in Table S1.

Immunofluorescent Staining

Immunolabelling for IMD and CRLR immunolabelling was performed by overnight incubation at room temperature with previously characterized antibodies [11,17], including double-labelling with biotinylated rat monoclonal anti-CD31 (1 μ g/ml; clone MEC 13.3, BD Biosciences, Heidelberg, Germany); an endothelial marker [18], and biotinylated lycopersicon esculentum (LEA) lectin (1:3200; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), a type I alveolar epithelial cell marker [19]. Secondary reagents, each applied for 1 h, were Cy3-conjugated goat anti-human IgG F(ab)₂ (1:500; Dianova, Hamburg, Germany), Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:2000; Dianova), and FITC-conjugated streptavidin (1:500; Sigma, Deisenhofen, Germany). Optionally, nuclei were counterstained by adding 0.4 μ g/ml 4',6-diamidino-2'-phenylindole-dihydrochloride (DAPI; Sigma) to the secondary reagent solution.

Lung Permeability

At the end of the experiment BAL and plasma concentration of previously injected human serum albumin (cHSA) was determined

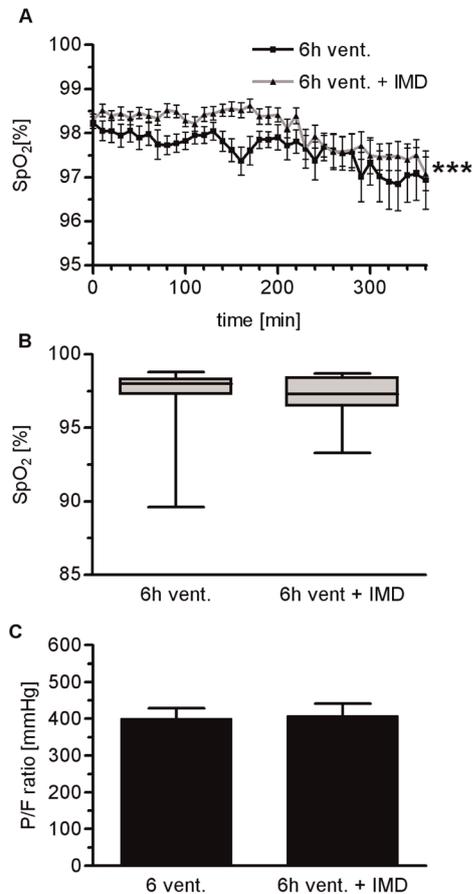


Figure 5 IMD had no impact on oxygenation in VILI. Mice were ventilated with a tidal volume of 12 ml/kg for 6 h and treated with IMD 0.025 mg/kg^h (6 h vent.+IMD) or solvent (6 h vent). A) Peripheral SpO₂ was monitored. B) At the end of the 6 h ventilation period, SpO₂ was not relevantly different between groups. C) After 6 h of MV, the P/F ratio was not different between groups. (**** $p < 0.001$, $n = 15$) doi:10.1371/journal.pone.0035832.g005

and permeability was assessed by calculating the cHSA BAL/Plasma ratio as described previously [16].

Hypoxic Vasoconstriction in Precision Cut Lung Slices (PCLS)

PCLS were prepared as described previously [20,21]. Briefly, mice were killed by cervical dislocation and the airways were filled with 1.5% low melting point agarose. After solidification of the agarose, the lungs were cut into 200 μ m thick slices. The agarose was removed by incubation of the PCLS in phenolred-free minimal essential medium (MEM) continuously gassed with 21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂ for at least 2 h at 37°C. To analyze

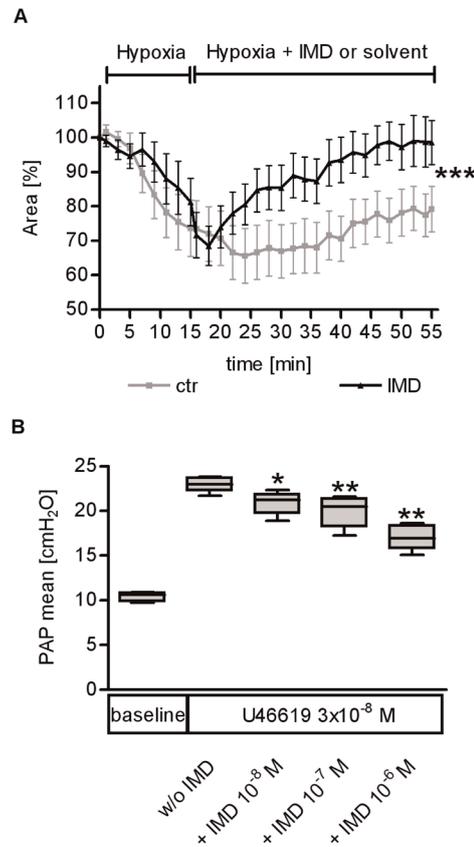


Figure 6. IMD mediated pulmonary vasodilation and reversed hypoxic pulmonary vasoconstriction. A) In precision cut lung slices (PCLS) hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) was induced, and the luminal areas of single intra-acinar pulmonary arteries were continuously analyzed by planimetry. HPV was markedly reduced by 500 nM IMD (***p*<0.001; *n* = 10). B) In isolated ventilated and perfused mouse lungs the thromboxane agonist U46619 induced a marked elevation of pulmonary artery pressure (PAP) during constant perfusion flow. PAP was lowered dose dependently by IMD bolus injection (* *p*<0.05, ** *p*<0.01, *n* = 5)
doi:10.1371/journal.pone.0035832.g006

vasoreactivity of individual cross-sectioned intra-acinar arteries (minimal inner diameter up to 40 μ m), PCLS were transferred into a flow-through superfusion chamber (Hugo Sachs Elektronik, March, Germany). At the beginning of each experiment the capability of the vessel to contract in response to the thromboxane analogue U46619 and to dilate after application of the NO donor sodium nitroprusside was checked. After washing out these drugs with normoxic gassed in phenolred-free MEM (21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂) PCLS were incubated with hypoxic gassed medium (1% O₂, 5% CO₂, 94% N₂; 0.7 ml/min). After 15 min 500 nM of murine IMD was added to the hypoxic medium. Pictures of the

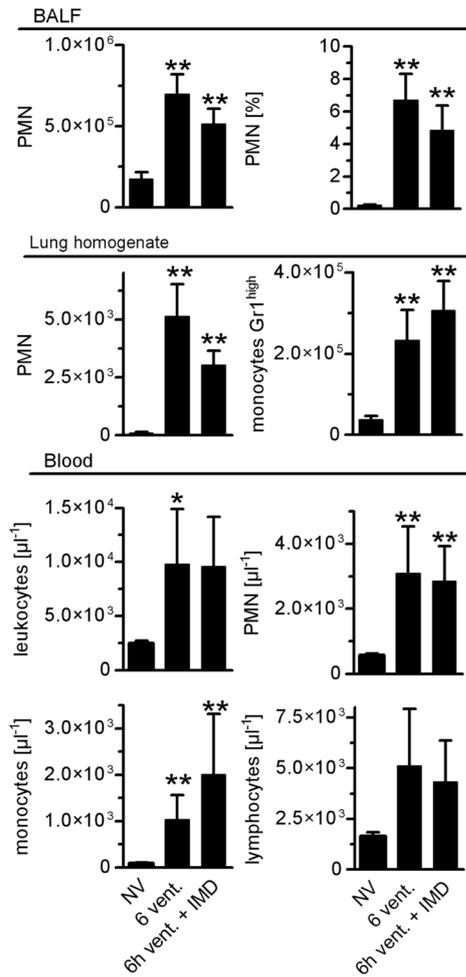
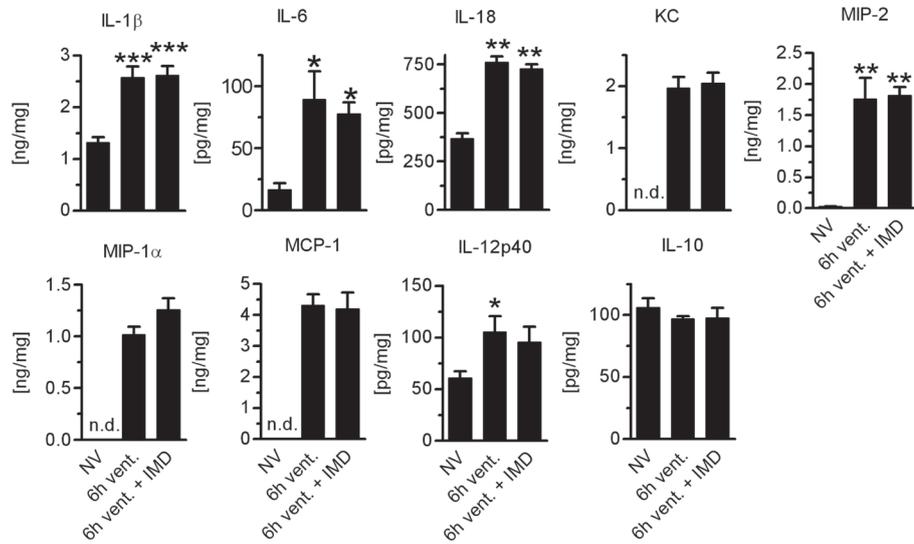


Figure 7. VILI induced pulmonary leukocyte recruitment and blood leukocytosis were unaffected by IMD treatment. Mice were ventilated with a tidal volume of 12 ml/kg for 6 h and treated with IMD 0.025 mg/kg*6h (6 h vent.+IMD) or solvent (6 h vent.). NV = non ventilated mice. Leukocytes isolated from bronchoalveolar lavage fluid (BALF), lung homogenate and blood, respectively, were quantified and differentiated by flow cytometry (**p*<0.05 vs. NV, ***p*<0.01 vs. NV, NV *n* = 5, 6 h vent. *n* = 7, 6 h vent. + IMD *n* = 8)
doi:10.1371/journal.pone.0035832.g007

artery were taken every 2 min using an inverted microscope mounted on the superfusion chamber. Changes of the luminal area of the vessels were evaluated by lining the inner boundaries by hand. The luminal area at the beginning of the experiment was defined as 100% and vasoreactivity was expressed as relative decrease or increase of this area. In the graph shown only the values obtained for the hypoxic incubation followed by the

A Lung homogenate



B Blood

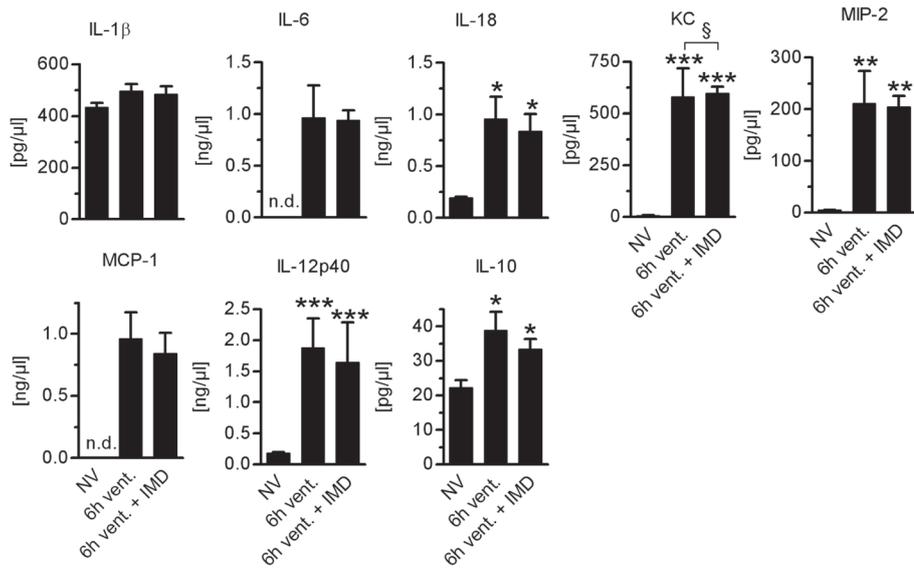


Figure 8. VILI-induced cytokine production was not altered by IMD. Mice were ventilated with a tidal volume of 12 ml/kg for 6 h and treated with IMD 0.025 mg/kg*6h (6 h vent.+IMD) or solvent (6 h vent). NV = non-ventilated mice. A) IL-1β, IL-18, IL-6, KC, MIP-1α, MIP-2, MCP-1, IL12p40 were determined in lung homogenate by multiplex assay technique. (*p<0.05 vs. NV, **p<0.01 vs. NV n=8) B) IL-1β, IL-18, IL-6, KC, MIP-1α, MIP-2, MCP-1, IL12p40 were determined in plasma by multiplex assay technique. (*p<0.05 vs. NV, **p<0.01 vs. NV n=8). doi:10.1371/journal.pone.0035832.g008

incubation in hypoxic medium +/- IMD are given. For a clear graphic presentation the values obtained at the beginning of hypoxia were defined as 100%.

Isolated Perfused and Ventilated Mouse Lungs

Lungs were prepared as described [22,23]. Briefly, anesthetized mice were tracheotomized and ventilated. After sternotomy and cannulation of left atrium and pulmonary artery, lungs were perfused with 37°C sterile Krebs-Henseleit hydroxyethylamylol-pectine buffer (1 mL/min) and ventilated by negative pressure ($P_{exp} -4.5$, $P_{ins} -9.0$ cm H_2O) in a humidified chamber. After a steady state period of 30 min, the thromboxane receptor agonist U46619 (3×10^{-8} M) was administered to the perfusate, evoking an increase in pulmonary arterial pressure. Murine IMD was administered to the perfusate for 30 seconds in 12-min intervals with IMD concentrations being increased. Maximum pressure response after IMD administration was determined.

Leukocytes in Lung Tissue, BAL Fluid and Blood

Lungs were flushed. The left lung was digested in RPMI containing collagenase and DNase for 1 h. Leukocytes were extracted by meshing the lung tissue through a cell strainer (100 μ m). BAL cells were isolated by centrifugation of BAL fluid gained as described above. Lung and BAL leukocytes were counted by haemocytometer and blood leukocytes were quantified using TruCount-Tubes. Leukocytes were differentiated by flow cytometry according to their sidescatter/forward-scatter properties and CD45, Gr-1 and F4-80 expression (FACSCalibur, BD, Heidelberg, Germany).

Quantification of Cytokines

Cytokines were quantified from total protein of flushed homogenized left lungs and from plasma samples (BioRad, Hercules, CA, USA).

Data Analyses

Data are expressed as mean \pm SEM. For comparison between groups, Mann-Whitey U-test was used. For the comparison of continuously measured data between groups, 2-way ANOVA was applied. P values <0.05 were considered statistically significant.

Results

IMD Stabilized Endothelial Barrier Function in HPMVECs

Confluent monolayers of HPMVECs stimulated with 0.01 or 0.1 μ M IMD showed a dose dependent increase in TER displaying improved endothelial barrier integrity. This effect lasted for the whole observation period of 120 min (Fig. 1). Comparable improvement of barrier function was observed in primary human umbilical vein endothelial cell monolayers (data not shown in detail).

Pulmonary RAMP3 mRNA Levels were Down Regulated in VILI

The impact of mechanical ventilation on endogenous IMD and its receptors was determined prior to exogenous IMD application. The influence of mechanical ventilation on the mRNA expression of IMD and its receptor compounds CRLR, RAMP1-3 as well as on the CRLR/RAMP1 agonist calcitonin gene-related peptide (CGRP) was assessed by qRT-PCR. VILI caused down regulation of pulmonary RAMP3 mRNA levels while the mRNA levels of IMD, CRLR, CGRP and RAMP1-2 were not affected by MV

(Fig. 2A). IMD and CRLR protein expression and distribution in lung tissue was not altered by MV.

To investigate the effect of VILI on pulmonary IMD and CRLR protein expression and distribution in the lungs, immunofluorescence analysis was performed. The IMD specificity of the employed antibody was validated in precabsorption experiments (Fig. S1). A trend towards increased pulmonary IMD expression in VILI was observed (Fig. 2B). CRLR expression was not altered by MV (Fig. 2B). IMD and CRLR protein were located mainly, although not exclusively, in alveolar macrophages and in the pulmonary endothelium, which was confirmed by double staining of IMD or CRLR and the endothelial marker CD31 (Fig. 3A). These expression patterns were not altered by MV (Fig. 3B). Colabelling with LEA, a marker for type I alveolar epithelial cells, demonstrated limited colocalization. Instead, large epithelial stretches without IMD- or CRLR-immunolabelling were evident (Fig S2).

Exogenous IMD Reduced Pulmonary Hyperpermeability in VILI

As we had been observing a robust barrier stabilizing effect of IMD in vitro, and after having characterized the impact of MV on the endogenous IMD system we aimed to investigate whether continuously infused IMD protects against VILI induced pulmonary hyperpermeability in mechanically ventilated mice. Translocation of human serum albumin (HSA) from the vascular into the alveolar compartment was quantified after 6 h of MV and served as a marker for lung permeability. MV provoked a marked increase of lung vascular permeability, thereby indicating VILI. Treatment with exogenous IMD significantly reduced VILI-evoked pulmonary hyperpermeability (Fig. 4). As increased permeability is the crucial mechanism for the development of high permeability lung edema in ALI/VILI, pharmacologic targeting of this major pathomechanism by IMD is promising.

IMD Infusion Lowered Systemic Arterial Blood Pressure

IMD is a vasoactive peptide causing vasodilation in rodents. Arterial hypotension and consecutive disturbance of the microcirculation thus had to be excluded to avoid interference of shock with VILI and IMD treatment. Mean systemic arterial blood pressure (MAP) was measured continuously by means of a catheter in the carotid artery of each ventilated individual. Blood lactate was chosen as an indicator for disturbance of the microcirculation and urine output during the last two hours of the experiment served as an indicator for parenchymal perfusion pressure and renal function. IMD treatment resulted in a significant reduction of MAP. Notably, this decrease in blood pressure did not impact blood lactate levels and urinary output, suggesting that systemic microcirculation and renal perfusion were not relevantly compromised (Fig S3). In additional experiments, an increased IMD dose (0.075 mg/kg/h) resulted in blood lactate levels of 56 ± 13 mg/dl ($n = 4$) indicating a significant deterioration of the microcirculation despite a constant mean arterial blood pressure between 60–65 mmHg throughout the experiment (data not shown). Blood lactate levels in the control group were 37 ± 5 mg/dl respectively. Thus, the dose of 0.025 mg/kg/h IMD was chosen, which reduced hyperpermeability while severe side effects due to haemodynamic alterations were not evident.

Peripheral Oxygen Saturation in VILI was Slightly Improved by IMD Treatment

Improvement of oxygenation is not necessarily associated with improved survival in ARDS. However, loss of oxygenation

capacity is a key marker of lung injury, and improvement of oxygenation would provide evidence for the efficacy of IMD associated reduction of VILI. Therefore, peripheral oxygen saturation was measured continuously throughout the experiments by pulse oxymetry, and pO₂ was determined in arterial blood by a routine blood gas analyzer.

IMD treated individuals showed significantly ($p < 0.001$) but only slightly improved peripheral oxygen saturation as compared to untreated ventilated mice throughout the observation period (Fig. 5A). However, following a final recruitment manoeuvre there was no detectable difference between groups regarding SpO₂ and P/F ratio (Fig. 5B; Fig. 5C).

IMD Reduced Pulmonary Vasoconstriction

With regard to the missing improvement in oxygenation despite barrier-stabilizing properties of IMD, we hypothesized that vasodilatory properties known for IMD might counteract reduction of lung injury by an increase of ventilation/perfusion mismatch. Indeed, hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) was reduced by IMD in murine precision cut lung slices of mice (Fig. 6A). Further, IMD dose dependently reduced pulmonary vasoconstriction evoked by the thromboxane receptor agonist U46619 in isolated ventilated and perfused mouse lungs (Fig. 6B). Thus, an IMD related increase of the ventilation/perfusion mismatch possibly overrode improvement of barrier function due to IMD treatment.

IMD did not Reduce Inflammation in VILI

Activation of the innate immune system plays a key role in the pathophysiology of VILI, and dampening this response can ameliorate VILI. However, interference with pathways of the innate immune system may render ARDS patients even more susceptible towards infections and cause unfavorable outcomes. Thus, we aimed to determine the impact of IMD on crucial innate immune responses in VILI. We analyzed leukocyte counts in the BAL fluid, lung homogenate and blood and quantified cytokines in lungs and blood. VILI evoked recruitment of neutrophils and Gr-1high monocytes as detected in BAL fluid and in lung homogenates. IMD did not impact pulmonary recruitment of neutrophils or Gr-1high monocytes in VILI (Fig. 7). VILI provoked blood leukocytosis with elevated numbers of monocytes and neutrophils, which was not modified by IMD treatment (Fig. 7). VILI increased pulmonary levels of IL-1 β , IL-18, IL-6, KC, MIP-1 α , MIP-2, MCP-1 and IL12p40, while IL-10 levels remained at baseline. IMD treatment did not alter pulmonary cytokine profiles (Fig. 8A). Also, plasma levels of IL-18, IL-6, KC, MIP-2, MCP-1, IL-12p40 and IL-10 were increased in mice ventilated for 6 h. IL-1 β levels remained at baseline. IMD did not alter levels of measured plasma cytokines (Fig. 8B). Notably, in additional experiments with a higher dosage of IMD (0.075 mg/kg/h) we observed a trend towards reduced neutrophil counts in the BAL fluid ($p = 0.0571$, $n = 4$) and reduced monocyte counts in blood ($p = 0.0286$, $n = 4$) due to IMD treatment. As outlined above, 0.075 mg/kg/h IMD probably tended to cause deterioration of microcirculation and was therefore not used for further investigations.

Discussion

In the current study, IMD enhanced endothelial barrier function in vitro and diminished lung hyperpermeability, but not pulmonary and systemic inflammation in a clinically relevant mouse model of VILI.

Impairment of endothelial barrier function is a hallmark of VILI and ARDS, leading to development of lung edema, surfactant dysfunction and deterioration of pulmonary gas exchange [6]. Particularly preinjured lungs are susceptible to VILI, and VILI may contribute to lung injury in ARDS patients despite lung protective ventilation strategies [4,5]. A pharmacologic approach to reduce pulmonary permeability in addition to lung protective ventilation strategies thus may be a promising adjuvant therapeutic strategy to minimize VILI in ARDS patients.

IMD is an endogenous CRLR ligand that mediated endothelial barrier stabilizing effects in vitro and in an isolated lung model of hydrostatic lung edema [10,11]. In mechanically ventilated mice, we investigated the regulation of IMD and its receptor complex composed of CRLR and one of the auxiliary proteins RAMP1, 2 and 3, which are mandatory for efficient CRLR signalling [8,9]. Expression of IMD, CRLR and RAMP1 and 2 were not affected by MV, whereas RAMP3 expression was significantly reduced. Previous studies suggested that IMD predominantly signals through receptor complexes composed of CRLR and RAMP2 or 3 [8,9]. Thus, the observed down regulation of RAMP3 may indicate reduced efficacy of endogenous IMD signalling in VILI, and treatment with exogenous IMD may restore or further amplify endogenous barrier stabilizing IMD effects in VILI.

Indeed, in the currently employed mouse model, continuously infused IMD markedly reduced lung permeability in VILI. To the best knowledge of the authors this study is the first providing evidence for pulmonary permeability reduction due to exogenous IMD in VILI. Mechanisms suggested to be responsible for the barrier stabilizing properties of CRLR signalling include increase of intracellular cAMP, leading to a protein kinase A dependent inhibition of myosin light chain phosphorylation and stabilization of intercellular junctions, finally leading to reduced endothelial intercellular gap formation [10,11,24,25]. This mechanism, originally studied by CRLR stimulation with AM has been confirmed in a murine VILI model, in models of ALI and in isolated rat intestine exposed to bacterial toxin [7,24,26,27].

Despite marked reduction of VILI-induced pulmonary permeability in IMD treated individuals, oxygenation was not improved. This contradictory finding may be partly explained by vasodilatory effects displayed by IMD. Specifically in the current study, increased pulmonary vascular resistance due to thromboxane receptor stimulation was reduced by IMD in isolated perfused and ventilated mouse lungs, and HPV in murine lung tissue slices was diminished by IMD. Although direct evidence is not provided by the current study, it is tempting to speculate that reduction of pulmonary vascular resistance by IMD resulted in ventilation/perfusion (V/Q) mismatch and increment of pulmonary shunt perfusion, probably masking improved oxygenation capacity due to reduced oedema formation in IMD treated individuals.

Pulmonary hyperinflammation is a central feature of VILI and contributes to lung permeability [6]. Previously, the CRLR ligand adrenomedullin ameliorated inflammatory responses in polymicrobial sepsis suggesting that CRLR signalling may mediate immunomodulating effects [28,29]. In hyperoxic VILI, we observed ameliorated leukocyte infiltration into the alveolar space due to AM treatment [7], which was not evident in the current study using 0.025 mg/kg/h IMD. Also, cytokine production was unaltered by IMD. Notably in preliminary experiments, IMD in a higher dosage (0.075 mg/kg/h) reduced neutrophil counts in the BAL fluid of IMD treated mice subjected to VILI as compared to solvent treated controls by trend ($p = 0.057$; $n = 4$; data not shown in detail). Concurrently, neutrophil counts were significantly reduced in the blood and increased in lung tissue ($p < 0.05$; $n = 4$; data not shown in detail), probably as a result of leukocyte

sequestration due to deterioration of microcirculation, as lactate levels were elevated in these mice. In line, IMD has been reported to lower systemic blood pressure in rodents [8,13,30]. In preliminary experiments (n = 4), 0.075 mg/kg/h IMD lowered mean arterial blood pressure and compromised systemic microcirculation. However, treatment with 0.025 mg/kg/h IMD reduced MAP only moderately and did not result in compromised systemic microcirculation or relevant reduction of end organ perfusion pressure as indicated by comparable blood lactate levels and urine output in both groups. Thus, IMD most likely reduced endothelial gap formation in VILI by inflammation-independent mechanisms in the current study, which may hold relevant clinical benefits. First, in ventilated ARDS patients with sepsis or severe pneumonia, hyperinflammation may override anti-inflammatory properties of pharmacologic therapies. Second, limiting central mechanisms of the innate immune response may compromise host defence against invading pathogens and thereby pave the way for secondary bacterial infections.

In conclusion, the endogenous CRLR ligand peptide IMD reduced pulmonary vascular leakage in a clinically relevant mouse model of VILI. Reduction of lung permeability was not accompanied by reduced pulmonary or systemic inflammation. However, regarding oxygenation capacity IMD may counteract reduction of lung edema by increasing V/Q mismatch.

Supporting Information

Figure S1 Preabsorption of the IMD antibody with mouse IMD (1–47) resulted in almost complete absence of labelling, suggesting high specificity of the primary antibody. Both tissue sections were cut from the same specimen and processed simultaneously. Images were taken at the same exposure time (190 ms).

References

- Esteban A, Anzueto A, Frutos F, Alia I, Brochard L, et al. (2002) Characteristics and outcomes in adult patients receiving mechanical ventilation: a 28-day international study. *JAMA* 287: 345–355.
- Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, et al. (2009) Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care* 13: R1.
- The Acute Respiratory Distress Syndrome Network (2000) Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 342: 1301–1308.
- Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenn RW, et al. (2006) Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extrapulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest* 86: 790–799.
- O'Mahony DS, Liles WC, Altemeier WA, Dhanireddy S, Frevert GW, et al. (2006) Mechanical ventilation interacts with endotoxemia to induce extrapulmonary organ dysfunction. *Crit Care* 10: R136.
- Verbrugge SJ, Lachmann B, Kesecioglu J (2007) Lung protective ventilatory strategies in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: from experimental findings to clinical application. *Clin Physiol Funct Imaging* 27: 67–90.
- Müller HC, Witzernath M, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, et al. (2010) Adrenomedullin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Thorax* 65: 1077–1084.
- Bell D, McDermott BJ (2008) Intermedin (adrenomedullin-2): a novel counter-regulatory peptide in the cardiovascular and renal systems. *Br J Pharmacol* 153 Suppl 1: S247–S262.
- Roh J, Chang CL, Bhalla A, Klein G, Hsu SY (2004) Intermedin is a calcitonin/calcitonin gene-related peptide family peptide acting through the calcitonin receptor-like receptor/receptor activity-modifying protein receptor complexes. *J Biol Chem* 279: 7264–7274.
- Aslam M, Pfeil U, Gunduz D, Rafiq A, Kummer W, et al. (2011) Intermedin/adrenomedullin-2 stabilises endothelial barrier and antagonises thrombin-induced barrier failure. *Br J Pharmacol*.
- Pfeil U, Aslam M, Paddenberger R, Quanz K, Chang CL, et al. (2009) Intermedin/adrenomedullin-2 is a hypoxia-induced endothelial peptide that stabilizes pulmonary microvascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297: L837–L845.

(TIF)

Figure S2 Double labelling with LEA to depict the epithelial lining of the alveolus in non ventilated lungs.

The merged image also includes DNA labelling with DAPI to highlight cellular nuclei. There is little overlap of LEA binding to alveolar type I cells with IMD- or CRLR-immunoreactivity. Arrows in the merged image point to LEA-binding epithelial stretches without IMD- or CRLR-immunoreactivity.

(TIF)

Figure S3 Mice were ventilated with a tidal volume of 12 ml/kg for 6 h and treated with IMD 0.025 mg/kg*6h (6 h vent.+IMD) or solvent (6 h vent).

A) Mean arterial blood pressure (MAP) was monitored. MAP was lower in IMD treated individuals B) Lactate levels quantified at the end of the experiment and C) urine output were not different between groups (***) $p < 0.001$; n = 15).

(TIF)

Table S1

(DOC)

Acknowledgments

We thank Dr. G. P. McGregor for kindly providing CRLR antiserum and Annika Kühn, Doris Stoll and Anna Goldenberg for excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HM-R MW. Performed the experiments: HM-R WK KH DW UP RP CT SH. Analyzed the data: HM-R WK UP RP CT. Wrote the paper: HM-R NS MW.

- Körner C, Kuchenbuch T, Pfeil U, Jung K, Padberg W, et al. (2011) Intermedin-treatment of pulmonary ischemia/reperfusion injury in the living mouse. *Pneumologie* 65: 114–122.
- Fujisawa Y, Nagai Y, Miyatake A, Miura K, Nishiyama A, et al. (2007) Effects of adrenomedullin 2 on regional hemodynamics in conscious rats. *Eur J Pharmacol* 558: 128–132.
- Yang JH, Jia YX, Pan CS, Zhao J, Ouyang M, et al. (2005) Effects of intermedin(1–53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun* 327: 713–719.
- Müller HC, Hocke AC, Hellwig K, Gutbier B, Peters H, et al. (2011) The Sphingosine-1 Phosphate receptor agonist FTY720 dose dependently affected endothelial integrity in vitro and aggravated ventilator-induced lung injury in mice. *Pulm Pharmacol Ther* 24: 377–385.
- Müller HC, Hellwig K, Rosseau S, Tschernig T, Schmiel A, et al. (2010) Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Crit Care* 14: R143.
- Hagner S, Haberberger R, Kummer W, Springer J, Fischer A, et al. (2001) Immunohistochemical detection of calcitonin gene-related peptide receptor (CGRPR)-1 in the endothelium of human coronary artery and bronchial blood vessels. *Neuropeptides* 35: 58–64.
- Vecchi A, Garlanda C, Lampugnani MG, Resnati M, Matteucci C, et al. (1994) Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* 63: 247–254.
- Bankston PW, Porter GA, Milici AJ, Palade GE (1991) Differential and specific labeling of epithelial and vascular endothelial cells of the rat lung by Lycopersicon esculentum and Griffonia simplicifolia I lectins. *Eur J Cell Biol* 54: 187–195.
- Paddenberger R, König P, Faulhammer P, Goldenberg A, Pfeil U, et al. (2006) Hypoxic vasoconstriction of partial muscular intra-acinar pulmonary arteries in murine precision cut lung slices. *Respir Res* 7: 93.
- Paddenberger R, Faulhammer P, Goldenberg A, Gries B, Heintz J, et al. (2009) Impact of modulators of mitochondrial ATP-sensitive potassium channel (mitoK(ATP)) on hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Adv Exp Med Biol* 648: 361–368.
- Witzernath M, Ahrens B, Kube SM, Hocke AC, Rosseau S, et al. (2006) Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 28: 370–377.

23. Witzernath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, et al. (2006) Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 34: 1947–1954.
24. Hippenstiel S, Witzernath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, et al. (2002) Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 91: 618–625.
25. Temmesfeld-Wollbrück B, Hocke AC, Suttorp N, Hippenstiel S (2007) Adrenomedullin and endothelial barrier function. *Thromb Haemost* 98: 944–951.
26. Brell B, Temmesfeld-Wollbrück B, Altschner I, Frisch E, Schmeck B, et al. (2005) Adrenomedullin reduces Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced rat ileum microcirculatory damage. *Crit Care Med* 33: 819–826.
27. Temmesfeld-Wollbrück B, Brell B, David I, Dorenberg M, Adolphs J, et al. (2007) Adrenomedullin reduces vascular hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensive Care Med* 33: 703–710.
28. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, Robledo G, Delgado M (2006) Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response. *Am J Pathol* 168: 1921–1930.
29. Itoh T, Obata H, Murakami S, Hamada K, Kangawa K, et al. (2007) Adrenomedullin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L446–L452.
30. Takei Y, Hyodo S, Katafuchi T, Minamino N (2004) Novel fish-derived adrenomedullin in mammals: structure and possible function. *Peptides* 25: 1643–1656.

2.3. Exazerbation des Lungenschadens in der schweren Pneumonie durch Beatmung – protektive Wirkung von Adrenomedullin

Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin

Holger C Müller-Redetzky, Daniel Will, Katharina Hellwig, Wolfgang Kummer, Thomas Tschernig, Uwe Pfeil, Renate Paddenberg, Michael D Menger, Olivia Kershaw, Achim D Gruber, Norbert Weissmann, Stefan Hippenstiel, Norbert Suttorp, Martin Witzenrath

Crit Care. 2014 Apr 14;18(2):R73.doi: 10.1186/cc13830.

Insbesondere entzündlich vorgeschädigtes Lungengewebe reagiert deutlich sensibler auf Beatmung und VILI ist wahrscheinlich vornehmlich im ARDS, also einer schweren entzündlichen Lungenschädigung relevant. Die häufigste Ursache eines ARDS ist die Pneumonie. Die häufigste ambulant erworbene Pneumonie ist die Pneumokokkenpneumonie. Vor diesem Hintergrund wurde im Tiermodell die Interaktion von Beatmung und schwerer Pneumokokkenpneumonie untersucht und geprüft, ob die in nicht vorgeschädigten Lungen nachgewiesenen protektiven Effekte von ADM bei VILI auch in diesem klinisch relevanten Szenario zum Tragen kommen.

Mäuse wurden mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert, entwickelten nach 24h eine schwere Pneumonie und wurden in diesem Zustand für weitere 6h invasiv beatmet. Im Vergleich zu Mäusen mit Pneumonie, die nicht beatmet wurden resultierte aus der Beatmung eine dramatisch höhere pulmonale Permeabilität, eine deutlich verschlechterte Oxygenierung und eine Exazerbation der pulmonalen und systemischen Entzündungsantwort, gemessen an Konzentrationen typischer pro-inflammatorischer Zytokinspiegel im Lungengewebe und Blut. In beatmeten Mäusen mit Pneumonie entwickelten sich Leber- und Darmschädigungen, die in Mäusen mit schwerer Pneumonie ohne Beatmung nicht nachweisbar waren. Die Beatmung hatte weder einen Einfluss auf die bereits ausgeprägte Infiltration des Lungengewebes durch neutrophile Granulozyten und inflammatorische Monozyten, noch auf die Erregerlast in der Lunge oder das Ausmaß der Bakteriämie bei Pneumonie. Das Ausmaß an pulmonaler und extrapulmonaler Schädigung war nicht durch reine Überlagerung von VILI und Pneumonie zu erklären. Zusammengefasst wurde nachgewiesen, dass Beatmung pulmonales und extrapulmonales Organversagen bei Pneumonie deutlich aggravierern kann.

Mäuse, die mit ADM behandelt wurden, entwickelten eine deutlich geringere pulmonale Permeabilität, die Lungenfunktion der Mäuse war besser und es trat deutlich weniger Leber- und

Darmschädigung auf. Bemerkenswerterweise geschah das unabhängig von der ausgeprägten pulmonalen und systemischen Entzündungsreaktion. Der ADM Effekt scheint damit auf einer direkten Wirkung wahrscheinlich am Endothel zu basieren und nicht indirekt über die Modulation von Inflammation vermittelt worden zu sein, was für eine potenziell adjuvante Therapie im ARDS günstig wäre.

ADM wies somit auch in diesem sehr komplexen und klinisch relevanten Tiermodell des ARDS und der schweren Sepsis protektive Wirkungen auf.

RESEARCH

Open Access

Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin

Holger C Müller-Redetzky¹, Daniel Will¹, Katharina Helliwig¹, Wolfgang Kummer^{2,3}, Thomas Tschernig⁴, Uwe Pfeil², Renate Paddenberg², Michael D Menger⁵, Olivia Kershaw⁶, Achim D Gruber⁶, Norbert Weissmann⁷, Stefan Hippenstiel¹, Norbert Suttorp¹ and Martin Witzernath^{1*}

Abstract

Introduction: Ventilator-induced lung injury (VILI) contributes to morbidity and mortality in acute respiratory distress syndrome (ARDS). Particularly pre-injured lungs are susceptible to VILI despite protective ventilation. In a previous study, the endogenous peptide adrenomedullin (AM) protected murine lungs from VILI. We hypothesized that mechanical ventilation (MV) contributes to lung injury and sepsis in pneumonia, and that AM may reduce lung injury and multiple organ failure in ventilated mice with pneumococcal pneumonia.

Methods: We analyzed in mice the impact of MV in established pneumonia on lung injury, inflammation, bacterial burden, hemodynamics and extrapulmonary organ injury, and assessed the therapeutic potential of AM by starting treatment at intubation.

Results: In pneumococcal pneumonia, MV increased lung permeability, and worsened lung mechanics and oxygenation failure. MV dramatically increased lung and blood cytokines but not lung leukocyte counts in pneumonia. MV induced systemic leukocytopenia and liver, gut and kidney injury in mice with pneumonia. Lung and blood bacterial burden was not affected by MV pneumonia and MV increased lung AM expression, whereas receptor activity modifying protein (RAMP) 1–3 expression was increased in pneumonia and reduced by MV. Infusion of AM protected against MV-induced lung injury (66% reduction of pulmonary permeability $p < 0.01$; prevention of pulmonary restriction) and against VILI-induced liver and gut injury in pneumonia (91% reduction of AST levels $p < 0.05$, 96% reduction of alanine aminotransaminase (ALT) levels $p < 0.05$, abrogation of histopathological changes and parenchymal apoptosis in liver and gut).

Conclusions: MV paved the way for the progression of pneumonia towards ARDS and sepsis by aggravating lung injury and systemic hyperinflammation leading to liver, kidney and gut injury. AM may be a promising therapeutic option to protect against development of lung injury, sepsis and extrapulmonary organ injury in mechanically ventilated individuals with severe pneumonia.

Introduction

In acute respiratory failure, mechanical ventilation (MV) is a life-saving intervention without alternatives, but MV may cause ventilator-induced lung injury (VILI). Since clinical trials have been highlighting the impact of VILI on acute respiratory distress syndrome (ARDS) mortality [1], lung-protective ventilation has been widely implemented

in clinical practice. However, clinical and experimental studies provide evidence that VILI occurs despite low tidal volume ventilation and that particularly preinjured lungs are susceptible for the development of VILI [2,3].

Lung injury worsened in ventilated mice upon infection with *Staphylococcus aureus* even under protective ventilation strategies [4], which is intriguing as pneumonia is the leading cause of ARDS and sepsis [1,5]. However a major limitation of this and other studies was that mice were infected after initiation of MV [4,6,7]. Experimental studies investigating the impact

* Correspondence: martin.witzernath@charite.de

¹Department of Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany
Full list of author information is available at the end of the article

of VILI in established pneumonia – that is, when the immune system is already activated and lung mechanics are changed due to pneumonic infiltrates – would be of particular clinical relevance.

VILI has been linked to multiple organ failure [8,9]. Improved understanding of the impact of VILI on the progression of pneumonia towards sepsis with its detrimental complications is desirable. Thus, we implemented a new second-hit model of established pneumococcal pneumonia and MV.

While the risk of ARDS development may be reduced by lowering tidal volumes, MV with low tidal volumes still seems to aggravate lung injury and further tidal volume reduction is limited by hypercapnia, which aggravates acidosis. Adjuvant pharmacotherapies in addition to protective ventilation are thus needed to further limit VILI. Adrenomedullin (AM), an endogenous 52-amino acid peptide belonging to the calcitonin gene-related peptide family, is crucial for regulation of endothelial barrier integrity [10]. AM binds to the calcitonin receptor-like receptor (CRLR) assembled with receptor activity modifying protein (RAMP)-1 to RAMP3, thereby raising intracellular cAMP levels in endothelial cells and reducing myosin light chain phosphorylation. Consequently, interendothelial gap formation is prevented [10-12]. Exogenous AM reduced pulmonary hyperpermeability in experimental acute lung injury and sepsis [13,14], and we identified AM as being protective against VILI and associated kidney injury in previously healthy mice by stabilizing endothelial barrier function and microcirculation [13]. These and other studies gave rise to a recent positive opinion from the Committee for Orphan Medicinal Products of the European Medicines Agency (EMA), recommending the granting of the development of AM as an orphan drug for the treatment of acute lung injury/ARDS (EMA/COMP/104704/2010 to SH). However, although AM proved to be beneficial in healthy lungs subjected to VILI, evidence is lacking for a protective effect of AM during MV of individuals with severe pneumonia. Clinical trials with AM are currently being planned, so additional preclinical evidence is desirable.

We therefore conducted the current study to decipher the contribution of VILI and underlying mechanisms to the progression of ARDS, sepsis and multiple organ dysfunction syndrome in pneumonia, to test the therapeutic impact of AM in the treatment of VILI-driven lung injury in pneumonia, and to investigate potential protective effects of AM on VILI-driven extrapulmonary organ dysfunction.

Methods

Ethics statement

Animal experiments were approved by the animal ethics committee of Charité-Universitätsmedizin Berlin and local

governmental authorities (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin).

Mice

Female C57Bl/6 mice (8 to 10 weeks; 18 to 20 g; Charles River, Sulzfeld, Germany) were used.

Pneumococcal pneumonia

Streptococcus pneumoniae (serotype 3, strain NCTC7978) was grown to mid log phase. Mice were anesthetized by intraperitoneal ketamine (1.6 mg) and xylazine (0.5 mg) and were transnasally inoculated with 5×10^6 colony-forming units of *S. pneumoniae* diluted in 20 μ l sterile phosphate-buffered saline (10 μ l into each nostril) as described previously [15]. Noninfected mice were anesthetized and transnasally inoculated with 20 μ l phosphate-buffered saline.

Mechanical ventilation and adrenomedullin treatment

Twenty-four hours after infection when severe pneumonia had developed, mice were subjected to MV as described previously [16,17]. Mice were anesthetized by intraperitoneal injections of fentanyl (75 μ g/kg), midazolam (1.5 mg/kg) and medetomidin (0.75 mg/kg). Repetitive, fentanyl (16 μ g/kg), midazolam (0.33 mg/kg) and medetomidin (0.16 mg/kg) were supplied via an intraperitoneal catheter when required to guarantee adequate anesthesia during the observation period. Body temperature was maintained at 37°C by a body temperature-controlled heating pad. Tracheotomy and intubation was performed, and a carotid artery catheter was placed for blood pressure monitoring and infusion of NaCl 0.9% containing 100 mmol/l HCO₃⁻ (350 μ l/hour). No additional fluid support was provided in any experiment. A urinary catheter was inserted. The tidal volume, respiratory rate, airway pressure, and urine output were monitored (Pulmodyn; Hugo-Sachs-Electronics, March-Hugstetten, Germany).

After preparation, a recruitment maneuver was performed (airway pressure 35 cmH₂O for 5 seconds) and mice were ventilated for 6 hours with a tidal volume of 12 ml/kg, a respiratory rate of 120 breaths/minute, and a positive end-expiratory pressure of 2 cmH₂O (MiniVent; Hugo-Sachs-Electronics). A second recruitment maneuver was performed 5 minutes before termination of the experiment. All mice survived the protocol. At termination of the experiments, mice were sacrificed by exsanguination via the carotid artery catheter. Blood samples were analyzed for partial arterial pressure of oxygen by blood gas analyzer (ABL-800; Radiometer, Copenhagen, Denmark). The P/F ratio was calculated as partial arterial pressure of oxygen/fraction of inspired oxygen. Nonventilated mice served as controls. Murine AM (0.05 mg/kg/hour; Phoenix, Burlingame, CA, USA) was

continuously infused via the carotid artery catheter, starting with onset of ventilation. The dosage was proven to be effective without causing relevant hemodynamic changes in mice [13].

Quantitative real-time polymerase chain reaction

Lungs were flushed and snap-frozen in liquid nitrogen. Total RNA was isolated from the lungs using the RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. To remove genomic DNA contamination, isolated RNA samples were treated with 1 U DNase/ μ g RNA (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) for 15 minutes at 37°C. One microgram of total RNA was used in a 20 μ l reaction to synthesize cDNA using Superscript H⁻ reverse transcriptase (200 U/ μ g RNA; Invitrogen) and oligo dTs as primers. Reverse transcription reaction was carried out for 50 minutes at 42°C. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was performed using the I-Cycler IQ detection system (Bio-Rad, Munich, Germany) in combination with the IQ SYBR Green Real-Time PCR Supermix (Bio-Rad). The polymerase chain reaction conditions included initial denaturation in one cycle of 10 minutes at 95°C followed by 40 cycles of 20 seconds at 95°C, 20 seconds at 60°C, and 20 seconds at 72°C. The relative expressions were calculated as:

$$2^{-(\Delta CT)} \times \left(1/\text{mean control } 2^{-(\Delta CT)}\right)$$

where ΔCT (CT; Threshold Cycle) is calculated as:

$$\Delta CT = CT_{\text{gene of interest}} - CT_{\text{housekeeping gene}}$$

Primer sequences are provided in Additional file 1. Regulation of CRLR and RAMP 1, 2 and 3 mRNA in uninfected, spontaneously breathing mice and uninfected, mechanically ventilated mice has been published previously [16].

Lung permeability

Human serum albumin (HSA) was injected intravenously 90 min prior to the end of the experiment. After ligation of the left stem bronchus bronchoalveolar lavage (BAL) was performed twice with 400 μ l PBS each. From each BAL portion, 250 μ l were pooled and BAL and plasma HSA concentration was determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Permeability was assessed by calculating the HSA BAL/plasma ratio as described [17].

Hypoxic vasoconstriction in precision-cut lung slices

Precision-cut lung slices (PCLS) were prepared as described previously [18]. Briefly, mice were killed by cervical dislocation and the airways were filled with 1.5% low melting point agarose. After solidification of the

agarose, the lungs were cut into 200 μ m thick slices. The agarose was removed by incubation of the PCLS in phenol red-free minimal essential medium continuously gassed with 21% oxygen, 5% carbon dioxide (CO₂), 74% nitrogen for at least 2 hours at 37°C.

To analyze the vasoreactivity of individual cross-sectioned intra-acinar arteries (minimal inner diameter up to 40 μ m), the PCLS were transferred into a flow-through superfusion chamber (Hugo-Sachs-Elektronik). At the beginning of each experiment the capability of the vessel to contract in response to the thromboxane analogue U46619 and to dilate after application of the nitric oxide donor sodium nitroprusside was checked. After washing out these drugs with normoxic gassed phenol red-free minimal essential medium (21% oxygen, 5% CO₂, 74% nitrogen), the PCLS were incubated with hypoxic gassed medium (1% oxygen, 5% CO₂, 94% nitrogen; 0.7 ml/minute). After 15 minutes, 500 nM murine AM was added to the hypoxic medium. After a second washout, the PCLS were again challenged with U46619 in the presence of 500 nM AM when the hypoxic incubation was performed in the presence of AM or solvent, respectively.

Pictures of the artery were taken every 2 minutes using an inverted microscope mounted on the superfusion chamber. Changes in the luminal area of the vessels were evaluated by manually lining the inner boundaries. The luminal area at the beginning of hypoxia was defined as 100% and vasoreactivity was expressed as a relative decrease or increase of this area. Only the values (mean \pm standard error of the mean) obtained for the hypoxic incubation followed by the incubation in hypoxic medium \pm AM, the second washout phase and the final challenge with U46619 \pm AM are given below.

Leukocytes in lung tissue, bronchoalveolar lavage fluid and blood

The lungs were flushed. The left lung was digested in RPMI containing collagenase and DNase for 1 hour. Leukocytes were extracted by meshing the lung tissue through a cell strainer (100 μ m) and differentiated by flow cytometry according to their side-scatter/forward-scatter properties and CD45, Gr-1 and F4-80 expression (FACSCalibur, BD, Heidelberg, Germany). Blood leukocytes were quantified and differentiated by flow cytometry using TruCount-Tubes (BD, Heidelberg, Germany) according to cellular side-scatter/forward-scatter properties and CD45, Gr-1 and CD3 expression.

Quantification of cytokines

Cytokines were quantified from total protein of flushed homogenized left lungs and from plasma samples by the

multiplex cytokine assay technique (BioRad, Hercules, CA, USA).

Bacterial burden

Serial dilutions of BALF, spleen homogenate and blood were plated on blood agar and incubated at 37°C under 5% CO₂ for 24 hours to count colony-forming units.

Creatinine, aspartate transaminase, alanine transaminase and neutrophil gelatinase-associated lipocalin

Creatinine, aspartate transaminase and alanine transaminase plasma levels were quantified by routine laboratory tests. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in urine samples collected over the last 2 hours of the MV period were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (BioPorto, Gentofte, Denmark).

Histology

Immunolabeling for AM was performed by overnight incubation at room temperature with previously characterized antibodies, including double-labeling with biotinylated rat monoclonal anti-CD31 (1 µg/ml, clone MEC 13.3; BD Biosciences, Heidelberg, Germany), an endothelial marker [19]. Secondary reagents, each applied for 1 hour, were Cy3-conjugated goat anti-human IgG F(ab)₂ (1:500; Dianova, Hamburg, Germany), Cy3-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:2,000; Dianova), and fluorescein isothiocyanate-conjugated streptavidin (1:500; Sigma, Deisenhofen, Germany). Tissue sections depicting all groups were processed simultaneously and images were taken at the same exposure time.

For analysis of apoptosis, staining against cleaved caspase-3 (CC3) was used as an indicator of apoptotic cell death as described previously [20]. In brief, paraffin sections were incubated overnight with a polyclonal anti-cleaved caspase-3 antibody (Asp175, 1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany). A secondary antibody was added and 3,3'-diaminobenzidine served as chromogen. Apoptotic cells appeared with a brown color. The sections were counterstained with hemalaun. In each procedure, sections of thymus tissue served as positive control because apoptosis is a constant event in this organ.

Data analyses

Data are expressed as mean ± standard error of the mean. For comparison between groups, the Mann-Whitney *U* test was used. $P < 0.05$ was considered statistically significant. For the comparison of experiments using PCLS, the area under the curve of each phase of every single experiment was calculated. Comparison between groups for each phase was performed again by Mann-Whitney *U* test, and $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

Pulmonary expression of adrenomedullin and its receptor complexes

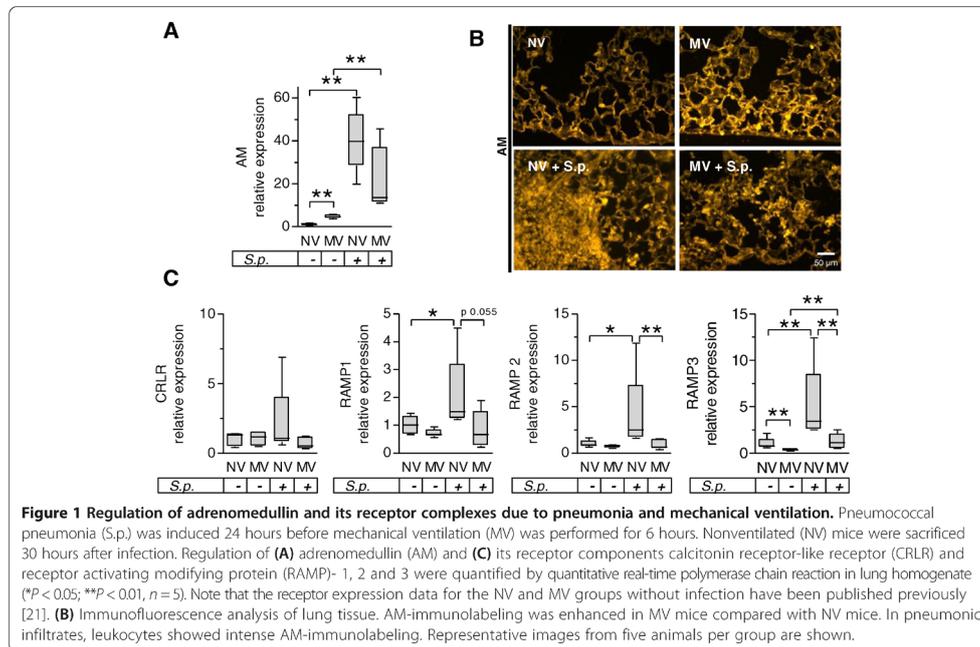
Pneumonia and MV each increased pulmonary AM mRNA expression (Figure 1A). Immunofluorescent staining of AM in pulmonary tissue revealed that in naïve lungs AM protein was located mainly, although not exclusively, in macrophages and in pulmonary endothelium, which was confirmed by double staining of AM and the endothelial marker CD31 (see Additional file 2). In line with increased AM mRNA expression after MV, we observed a MV-induced increase of parenchymal AM protein. Furthermore, pneumonic infiltrates were positive for AM immunostaining, with recruited leukocytes displaying marked immunoreactivity (Figure 1B). AM specificity of the employed antibody was validated in pre-absorption experiments (see Additional file 3). Regulation of the AM receptor components CRLR and RAMP1 to RAMP3 was investigated by qRT-PCR analyses. As reported previously [16], MV alone had no impact on CRLR or RAMP1 and RAMP2 expression while RAMP3 was downregulated. Pneumonia resulted in an increase of RAMP1 to RAMP3 expression, while MV markedly reduced mRNA levels of RAMP1 to RAMP3 in pneumonia (Figure 1C). Notably, treatment with AM did not alter expression of AM, CRLR or RAMP1 to RAMP3 in pneumonia and subsequent MV (see Additional file 4).

Regulation of the AM receptor components CRLR and RAMP1 to RAMP3 was investigated by qRT-PCR analyses. As reported previously [21], MV alone had no impact on CRLR or RAMP1 and RAMP2 expression while RAMP3 was downregulated. Pneumonia resulted in an increase of RAMP1 to RAMP3 expression, while MV markedly reduced mRNA levels of RAMP1 to RAMP3 in pneumonia (Figure 1C). Notably, treatment with AM did not alter expression of AM, CRLR or RAMP1 to RAMP3 in pneumonia and subsequent MV (see Additional file 4).

Mechanical ventilation exacerbated lung injury in pneumonia: protection by adrenomedullin

Pneumonia as well as MV each increased pulmonary vascular permeability. AM reduced MV-evoked lung permeability. Notably, when mice with pneumonia were subjected to MV a further dramatic increase in lung permeability was observed, which was almost completely avoided by AM treatment starting with onset of MV (Figure 2A).

Under volume-controlled MV, an increase in the peak inspiratory pressure reflects a decrease of lung compliance, which is mostly due to lung edema in the current model. While pneumonia and MV alone had no impact on peak inspiratory pressure as compared with healthy mice, MV in infected mice led to a significant increase of peak inspiratory pressure after 6 hours of MV, which was almost completely impeded by AM treatment (Figure 2B).



While oxygenation capacity was not impaired due to pneumonia or MV alone, the combination of pneumonia and MV led towards severe deterioration of oxygenation. Although AM reduced lung injury in mechanically ventilated mice, AM did not ameliorate the deterioration of oxygenation (Figure 2C). Histology performed 24 hours post infection confirmed severe necrotizing bronchopneumonia affecting 40 to 60% of the lung tissue. Changes due to MV could not be dissected from the already prevalent severe alteration in the lungs due to pneumonia (see Additional file 5). With regard to the missing improvement in oxygenation despite barrier-stabilizing properties of AM and preserved lung mechanics in the pneumonia + MV group, we hypothesized that vasodilatory properties in the lung of AM might have been counteracting the reduction of lung injury by increasing ventilation/perfusion mismatch. Indeed, vasoconstriction due to hypoxia or the thromboxane agonist U46619 was significantly reduced by AM in murine PCLS (Figure 2D).

Mechanical ventilation aggravated pulmonary inflammation in pneumonia

The concentrations of the cytokines interleukin (IL)-1 β , IL-6, keratinocyte-derived cytokine (KC) and IL-10 in lung homogenate were increased by pneumonia and, to a lesser extent, by MV. In pneumonia, MV led to a further dramatic

increase of IL-1 β , IL-6 and KC, while IL-10 levels remained unaffected. AM treatment had no impact on pulmonary cytokine levels (Figure 3A).

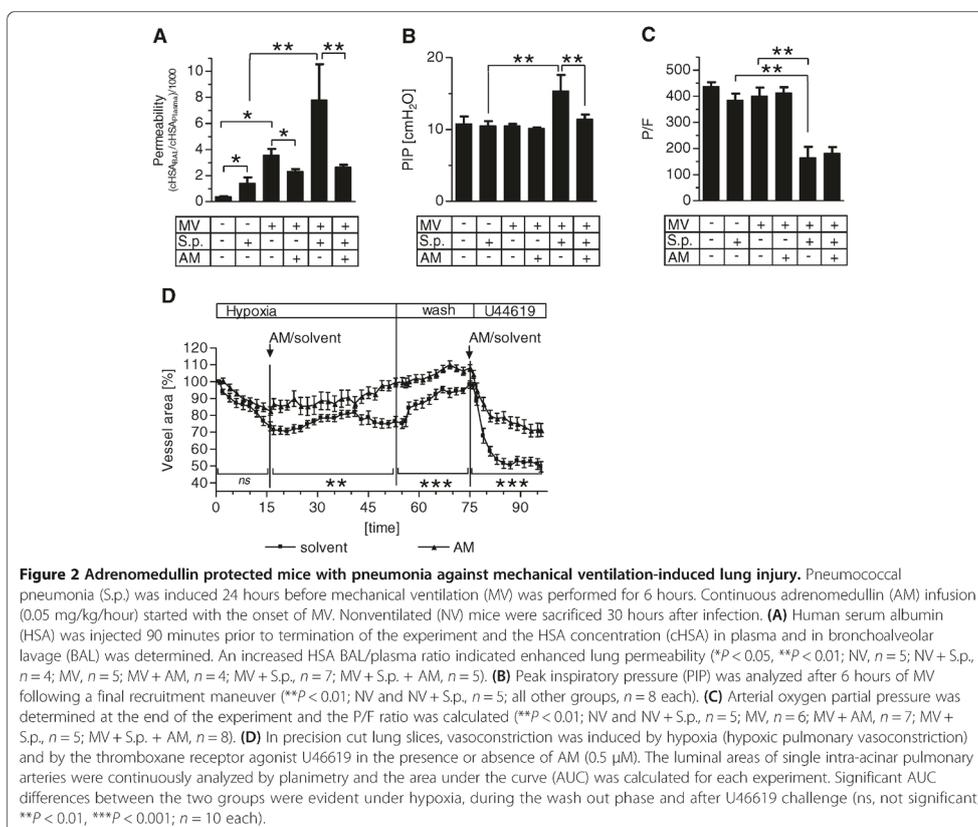
In pneumonia and in MV, pulmonary polymorphonuclear neutrophils (PMN) and Gr-1^{high} monocytes were increased. A combination of MV and pneumonia did not further increase PMN and Gr-1^{high} monocytes. Notably, AM decreased pulmonary Gr-1^{high} monocyte recruitment in uninfected mice subjected to MV, but not in mice with pneumonia subjected to MV (Figure 3B).

Mechanical ventilation had no impact on pulmonary bacterial outgrowth and development of bacteremia in pneumonia

Blood and spleen homogenate bacterial counts were assessed in BALF. MV and AM each had no impact on pulmonary bacterial burden, bacteremia or dissemination to the spleen in pneumonia (Figure 4).

Mechanical ventilation aggravated systemic hyperinflammation in pneumonia

Pneumonia and MV each increased plasma IL-6, KC and IL-10 levels. In pneumonia, MV caused a further increase of systemic cytokine levels. AM treatment had no impact on cytokine levels (Figure 5A).



Mechanical ventilation induced leukopenia in pneumonia

Pneumonia increased circulating neutrophils and monocytes while lymphocyte counts remained unaffected. MV reduced lymphocytes but had no effect on other leukocyte populations. In infected mice subjected to MV, blood leukocyte counts were significantly reduced compared with nonventilated mice with pneumonia, and lymphocyte counts dropped significantly below those observed in naïve mice. Besides almost restoring lymphocyte levels in uninfected mice subjected to MV, AM treatment had no significant impact on blood leukocyte counts (Figure 5B).

Adrenomedullin protected mice with pneumonia against MV-related organ failure

Aspartate aminotransferase and alanine aminotransaminase levels were not altered by pneumonia or MV, whereas MV in pneumonia dramatically increased transaminase

levels, which was almost completely avoided by AM (Figure 6A). We observed extended liver injury displayed by necrotic areas and induction of hepatic apoptosis exclusively in the pneumonia + MV group, which was undetectable under AM treatment. More specifically, periportal rings of CC3⁺ cells were highly prominent (Figure 6B) in four out of six livers from the pneumonia + MV group and showed weaker prominence in two livers. In the liver sections of the pneumonia + MV + AM group only small, single islets of CC3⁺ cells were found. In all other groups, CC3⁺ cells were rare (0 to 5 per section). In ileum sections, an enhanced number of CC3⁺ cells was almost exclusively observed in the pneumonia + MV group, indicating tissue injury that was abolished by AM treatment (Figure 6C).

In the pneumonia + MV group increased urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels were measured (see Figure S5A in Additional file 6). Pneumonia and

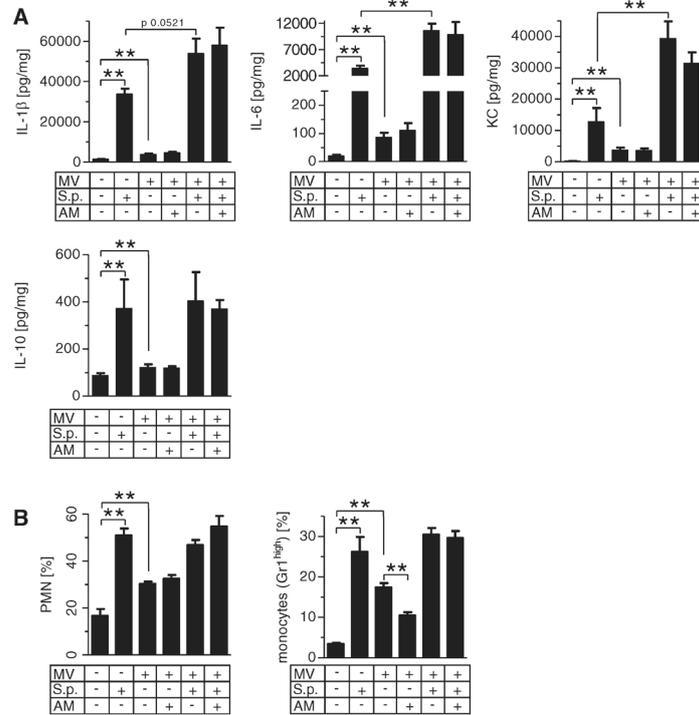


Figure 3 Mechanical ventilation induced exacerbation of pulmonary inflammation in pneumonia independently of leukocyte counts. Pneumococcal pneumonia (S.p.) was induced 24 hours before mechanical ventilation (MV) was performed for 6 hours. Continuous adrenomedullin (AM) infusion (0.05 mg/kg/hour) started with the onset of MV. Nonventilated mice were sacrificed 30 hours after infection. **(A)** Cytokine levels of interleukin (IL)-1 β , IL-6, keratinocyte-derived cytokine (KC) and IL-10 were measured in lung homogenate. ** $P < 0.01$; $n = 6$ each. **(B)** Leukocytes were isolated from lung homogenate and differentiated by flow cytometry. ** $P < 0.01$; $n = 5$ each. PMN, polymorphonuclear neutrophils.

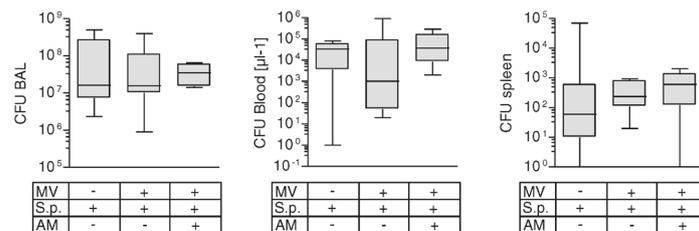
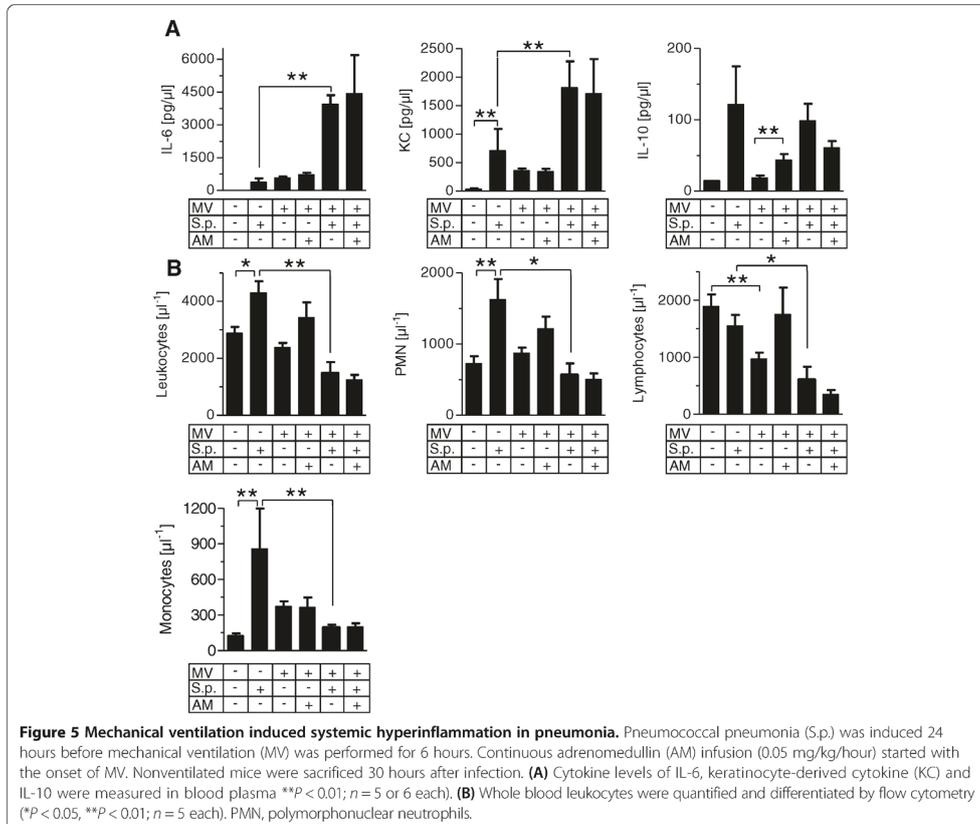


Figure 4 Mechanical ventilation has no impact on lung bacterial outgrowth and systemic bacterial dissemination. Pneumococcal pneumonia (S.p.) was induced 24 hours before mechanical ventilation (MV) was performed for 6 hours. Continuous adrenomedullin (AM) infusion (0.05 mg/kg/hour) started with the onset of MV. Nonventilated mice were sacrificed 30 hours after infection. Serial dilutions of bronchoalveolar lavage (BAL) fluid, spleen homogenate and blood were plated on agar, and colony-forming units (CFU) were counted after 24 hours of incubation ($n = 5$ to 7).



MV each increased blood creatinine levels in comparison with naïve mice and a trend towards further increased creatinine levels in the pneumonia + MV group was observed (see Figure S5B in Additional file 6). Urine output was not altered (see Figure S5C in Additional file 6). These findings suggest early tubular injury due to MV in pneumonia unaffected by AM.

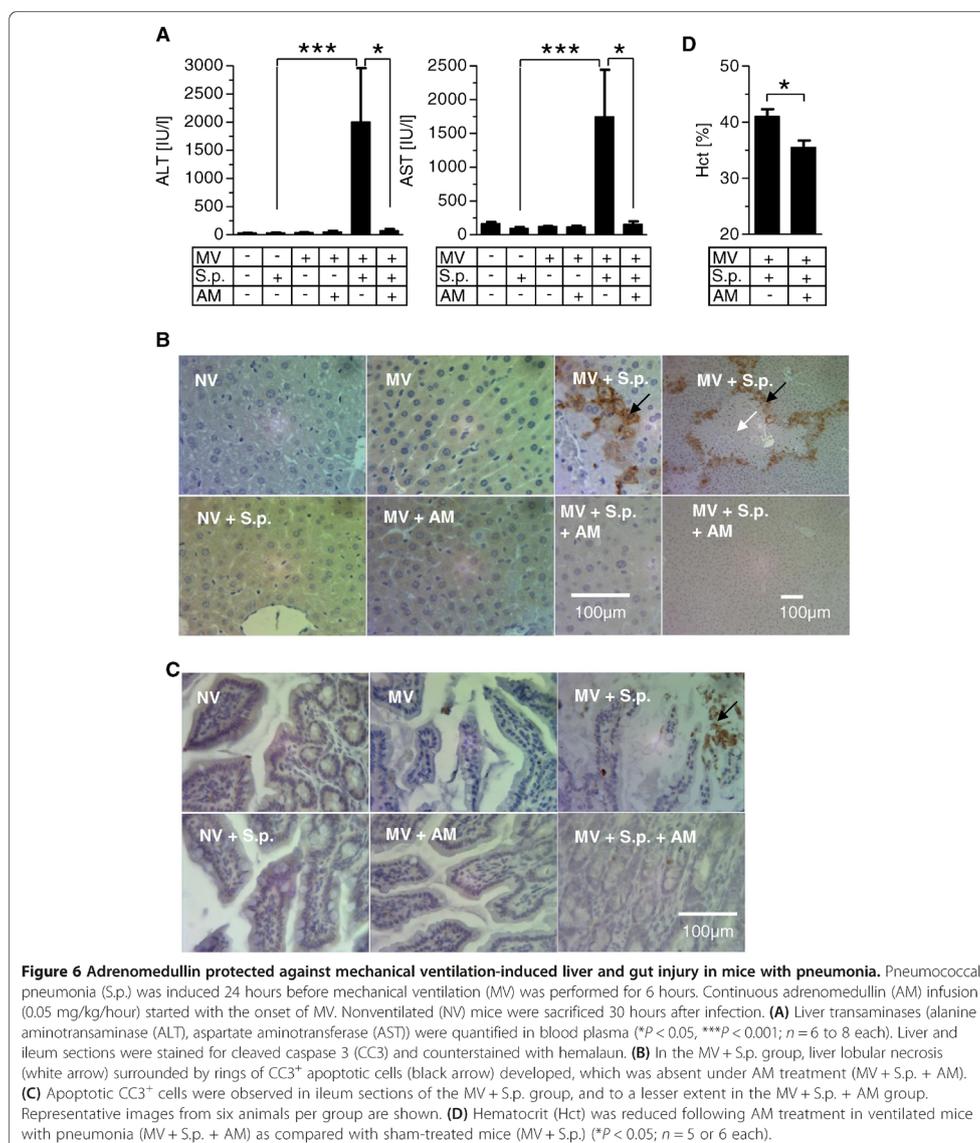
Notably, hematocrit in the pneumonia + MV + AM group was lower compared with the pneumonia + MV group, suggesting intravascular plasma conservation due to systemic stabilization of vascular barrier function by AM (Figure 6D).

Discussion

In the current experimental study, MV induced lung injury in pneumonia and promoted sepsis and multiple organ injury. AM infusion protected against lung edema and liver and gut injury without interfering with inflammatory host responses.

For this study, we launched a novel experimental model to display the relevant interaction of VILI and pre-established pneumonia regarding lung injury, systemic inflammation and multiple organ dysfunction. VILI was induced by ventilating mice for 6 hours with moderately injurious tidal volumes of 12 ml/kg. Although 6 ml/kg is recommended for lung-protective ventilation in humans, the currently applied settings meet the requirements for protective ventilation in mice. The tidal volume of 12 ml/kg with a respiratory rate of 120 breaths/minute induced only a minor increase in lung permeability and inflammation, while having no impact on hepatic or renal injury in healthy mice [17]. Lower tidal volumes would require higher respiratory rates to ensure CO₂ removal, which independently contributed to VILI [21] and was therefore avoided.

We first investigated the expression of AM and its receptor complexes and observed pulmonary upregulation of AM in each of both MV and pneumonia. MV



increased AM expression mainly in endothelial cells and macrophages, while AM expression in pneumonia could mainly be attributed to invading leukocytes forming pulmonary infiltrates. However, MV tended to downregulate overall AM expression in pneumonia. AM binds to

CRLR assembled with RAMPs, mainly RAMP2 and RAMP3 [10]. Expression of all three RAMPs was up-regulated in pneumonia, and reduced by additional MV. In summary, reduced expression of RAMP1 to RAMP3 under MV in pneumonia was observed,

suggesting weakened protection of endothelial integrity due to reduced endogenous AM function. Notably, AM therapy had no influence on the expression of AM, CRLR or RAMP1 to RAMP3.

We reported previously that exogenous AM protected mice against VILI even in the context of hyperoxia and delayed onset of treatment [13]. However, the applied models did not reproduce the clinically relevant situation when patients with respiratory failure due to pneumonia need MV. In the current study, pneumonia-induced lung injury was exacerbated by MV as displayed by increased permeability and edema and decreased oxygenation capacity. These changes could not be attributed to further pulmonary leukocyte recruitment due to MV, but were paralleled by a dramatic increase of pulmonary inflammatory cytokines. Some studies reported immunomodulating effects of AM offering protection against lipopolysaccharide-induced systemic hyperinflammation and lung injury or against polymicrobial sepsis in mice [22,23]. In line with these studies, pulmonary Gr-1^{high} monocytes, which have specifically been linked to VILI [24], were reduced by AM in mechanically ventilated mice without pneumonia. However, AM did not alter cytokine levels, overall leukocyte counts or Gr-1^{high} monocytes in the lungs of mechanically ventilated mice with pneumonia, suggesting that protection by AM was not primarily mediated by immunomodulation in this study but targets a central mechanism downstream of harmful hyperinflammation.

Taking the current and previous findings into account, stabilization of endothelial integrity was most probably the main mechanism of the observed protective AM effect [11,12,14,25,26]. From the clinical point of view it is preferable to stabilize lung barrier function independently from the inflammatory state because hyperinflammation is frequently established when it comes to intubation in pneumonia and sepsis, because hyperinflammation may override anti-inflammatory properties of pharmacologic therapies, and because pharmacologic immunosuppression may pave the way for secondary infections [27]. Further, while disturbance of microcirculation is a hallmark of organ failure during septic shock, AM stabilized microcirculation in inflammation [26,28]. Although not directly evidenced by the current study, this protective function of AM possibly contributed to the observed effects.

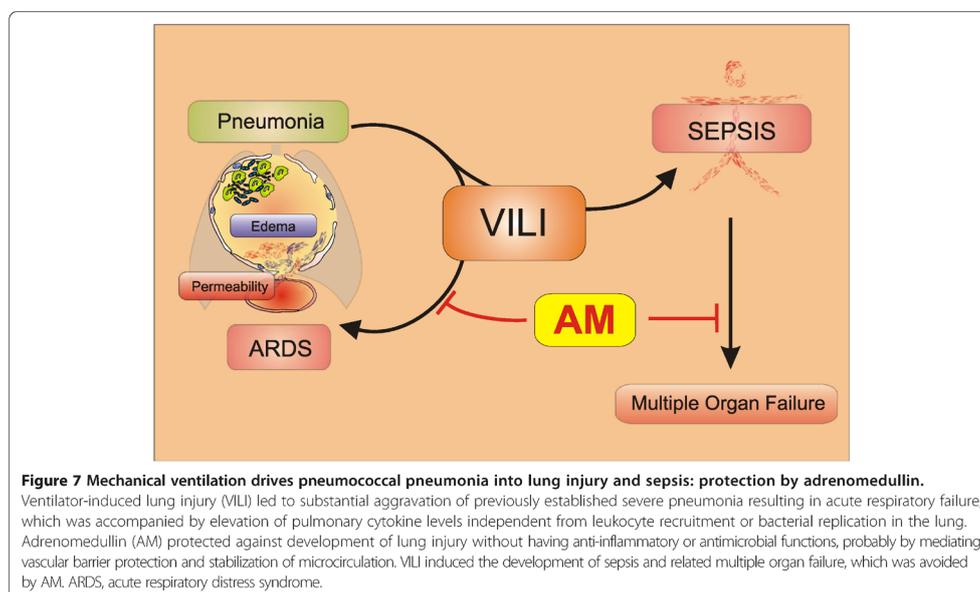
Oxygenation was not improved in AM-treated mice despite marked reduction of permeability and edema. This contradictory finding may be explained by vasodilatory AM effects. More specifically, vasoconstriction caused by the thromboxane agonist U44619 or hypoxia were diminished by AM in lung tissue slices. Although direct evidence is not provided, it is tempting to speculate that reduction of pulmonary vascular resistance by AM resulted in increased shunt perfusion, probably masking improvement of oxygenation capacity following reduction of edema

formation in AM-treated mice. Importantly, AM treatment did not result in deterioration of mean systemic arterial blood pressure or microcirculatory impairment as assessed by blood lactate.

Cyclic stretch of alveolar epithelial cells in MV has been observed to enhance bacterial growth and bacteremia, thereby augmenting the development of sepsis and organ failure [6,23,29,30]. However, this mainly holds true for Gram-negative bacteria, while bacterial growth and translocation of Gram-positive bacteria such as *S. aureus* was not influenced by cyclic stretch *in vitro* or by MV *in vivo* [4,30]. Further, Gram-positive *S. pneumoniae* actively invades lung tissue, so that MV-associated bacterial translocation may be of inferior relevance particularly in pneumococcal pneumonia [31]. In the current study, all infected mice were bacteremic and MV did not impact pulmonary *S. pneumoniae* outgrowth or bacteremia. Nevertheless, infected mice subjected to MV developed severe sepsis, whereas spontaneously breathing mice did not. Severe sepsis was displayed by dramatically increased blood cytokines, leukopenia and hepatic, renal and intestinal injury, which, most notably, could not be attributed to hemodynamic deterioration.

AM protected against hepatic and intestinal injury in VILI-driven sepsis. These findings support previous studies in which AM protected from liver or gut injury in staphylococcal α -toxin induced shock, in polymicrobial sepsis or in gut ischemia and reperfusion [14,22,32]. Again, in the majority of studies, tissue-protective effects of AM have been attributed to anti-inflammatory properties, whereas anti-inflammatory effects of AM were not detected in the current study. Apoptosis may be crucial for the development of organ failure in sepsis, and AM holds anti-apoptotic properties [33]. However, whether protection from apoptosis observed here and elsewhere is the mechanism of or a consequence of other yet unknown underlying AM functions remains unclear. The lower hematocrit in AM-treated mice currently observed indicated intravascular plasma conservation due to systemic vascular barrier protection by AM, confirming previous studies demonstrating barrier protection in the liver, ileum and kidney as a central beneficial mechanism of AM in shock [14]. Taken together, AM protected against hepatic and intestinal injury accompanied by anti-apoptotic and barrier protective effects without modulating hyperinflammation in pneumonia-associated VILI-driven sepsis. Further characterization of this potent protective AM function downstream of injurious hyperinflammation warrants further investigation.

One limitation of this study was that AM treatment could not be investigated in nonventilated mice because this requires vascular catheterization for continuous infusion due to the very short half-life of AM. This catheterization is not feasible in awake mice, and



anesthesia in spontaneously breathing mice placed in a supine position for instrumentation probably results in hypoventilation, thereby provoking major bias to the sensitive readout performed here.

- Being acknowledged as an orphan drug for ARDS treatment by the EMA, AM therapy may be a potential future adjuvant pharmacotherapy in patients with severe pneumonia subjected to MV.

Conclusion

This study provides evidence that MV with moderate tidal volumes aggravates lung injury and promotes progression of sepsis and multiple organ failure in pneumococcal pneumonia. Exogenous AM, which has gained orphan drug status from the EMA for treatment of ARDS recently, protected against MV-induced lung injury and sepsis-related organ failure without suppression of the host immune response (Figure 7). These data further encourage current efforts to evaluate AM as adjuvant therapy for VILI in addition to protective ventilation strategies and for sepsis-related organ failure in clinical trials.

Key messages

- In mice with pneumococcal pneumonia, MV evoked lung injury and led to the development of sepsis with multiple organ injury independent of bacterial translocation.
- AM infusion protected against lung injury and extrapulmonary organ failure in this condition.

Additional files

- Additional file 1: Table S1.** Presenting the used primer sequences for qRT-PCR.
- Additional file 2: Figure S1.** Showing the pulmonary distribution of AM.
- Additional file 3: Figure S2.** Showing the specificity of the used AM antibody.
- Additional file 4: Figure S3.** Showing gene expression of AM, CRLR and RAMP1 to RAMP3 under treatment with AM during MV in pneumonia.
- Additional file 5: Figure S4.** Showing histologic lung pathology of pneumonia before induction of MV and after the ventilation period.
- Additional file 6: Figure S5.** Showing that MV induced tubular injury in pneumonia (neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels in urine, creatinine levels in blood, urine output).

Abbreviations

AM: Adrenomedullin; ARDS: Acute respiratory distress syndrome; BAL: Bronchoalveolar lavage; BALF: Bronchoalveolar lavage fluid; CC3: Cleaved caspase 3; CO₂: Carbon dioxide; CRLR: Calcitonin receptor-like receptor; CT: Threshold cycle; EMA: European Medicines Agency; HSA: Human serum albumin; IL: Interleukin; KC: Keratinocyte-derived cytokine; MV: Mechanical ventilation; PCLS: Precision-cut lung slices; PMN: Polymorphonuclear neutrophils; qRT-PCR: Quantitative real-time polymerase chain reaction; RAMP: Receptor activity modifying protein; RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium; VILI: Ventilator-induced lung injury.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

HCM-R and MW planned and supervised the study, performed *in vivo* experiments, analyzed the data and drafted the manuscript. DW and KH performed animal experiments, flow cytometry and cytokine assays, and critically revised the manuscript for important intellectual content, WK, MDM, TT, OK and ADG performed histology and critically revised the manuscript for important intellectual content. RP performed experiments using PCLS and critically revised the manuscript for important intellectual content. UP performed qRT-PCR analyses and critically revised the manuscript for important intellectual content. SH, NW and NS were involved in the study design and participated in drafting the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

The authors thank Sandra Wienhold, Matthias Felten, Marfa Polikarpova, Ute Kellermann Anna Goldberg and Petra Merner for skillful technical assistance.

Funding

This study was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft to WK and NW (Excellence Cluster Cardio-Pulmonary System), to SH (SFB-TR84 C2 and DFG HI 789/7-1), to NS (SFB-TR84 Z2), to MW (SFB-TR84 C3, C6 and DFG OP 86/7-1) and to NW (SFB-TR84 C6), and by the German Federal Ministry of Education and Research to HCM-R (PROGRESS). The funding sources had no influence on study design or publication.

Author details

¹Department of Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Charitéplatz 1, 10117 Berlin, Germany. ²Institute for Anatomy and Cell Biology, Justus-Liebig-University, Universities of Giessen and Marburg Lung Center, Aulweg 123, 35392 Giessen, Germany. ³Member of the German Center for Lung Research, Aulweg 130, 35392 Giessen, Germany. ⁴Institute of Anatomy and Cell Biology, Saarland University, Faculty of Medicine, Kirrberger Str. 100, 66424 Homburg/Saar, Germany. ⁵Institute for Clinical and Experimental Surgery, Saarland University, Faculty of Medicine, Kirrberger Straße 100, 66424 Homburg/Saar/Homburg, Germany. ⁶Department of Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin, Robert-von-Ostertag-Straße 15, 14163 Berlin, Germany. ⁷Excellencecluster Cardio-Pulmonary System, Department of Internal Medicine, Aulweg 130, 35392 Giessen, Germany.

Received: 4 October 2013 Accepted: 3 April 2014

Published: 14 April 2014

References

1. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N Engl J Med* 2000, **342**:1301–1308.
2. Terragni PP, Del Sorbo L, Mascia L, Urbino R, Martin EL, Birocco A, Faggiano C, Quintel M, Gattinoni L, Ranieri VM: Tidal volume lower than 6 ml/kg enhances lung protection: role of extracorporeal carbon dioxide removal. *Anesthesiology* 2009, **111**:826–835.
3. Wolthuis EK, Vlaar AP, Choi G, Roelofs JJ, Juffermans NP, Schultz MJ: Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care* 2009, **13**:R1.
4. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O'Mahony DS, Glenn RW, Martin TR, Liles WC: Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest* 2006, **86**:790–799.
5. Brunkhorst FM, Oppert M, Marx G, Bloos F, Ludewig K, Putensen C, Nierhaus A, Jaschinski U, Meier-Hellmann A, Weyland A, Grundling M, Moerer O, Riessen R, Seibel A, Ragaller M, Buchler MW, John S, Bach F, Spies C, Reill L, Fritz H, Kiehntopf M, Kuhnt E, Bogatsch H, Engel C, Loeffler M, Kollef MH, Reinhart K, Welte T: Effect of empirical treatment with moxifloxacin and meropenem vs meropenem on sepsis-related organ dysfunction in patients with severe sepsis: a randomized trial. *JAMA* 2012, **307**:2390–2399.
6. van Kaam AH, Lachmann RA, Herting E, De Jaeger A, van Iwaarden F, Noorduin LA, Kok JH, Haitsma JJ, Lachmann B: Reducing atelectasis attenuates bacterial growth and translocation in experimental pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2004, **169**:1046–1053.
7. van Kaam AH, Lutter R, Lachmann RA, Haitsma JJ, Herting E, Snoek M, De Jaeger A, Kok JH, Lachmann B: Effect of ventilation strategy and surfactant on inflammation in experimental pneumonia. *Eur Respir J* 2005, **26**:112–117.
8. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, Cutz E, Liu M, Keshavjee S, Martin TR, Marshall JC, Ranieri VM, Slutsky AS: Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2003, **289**:2104–2112.
9. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS: Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA* 2000, **284**:43–44.
10. Temmesfeld-Wollbrück B, Hocke AC, Suttrop N, Hippenstiel S: Adrenomedullin and endothelial barrier function. *Thromb Haemost* 2007, **98**:944–951.
11. Hippenstiel S, Witzernath M, Schmeck B, Hocke A, Krisp M, Krull M, Seybold J, Seeger W, Rascher W, Schutte H, Suttrop N: Adrenomedullin reduces endothelial hyperpermeability. *Circ Res* 2002, **91**:618–625.
12. Hocke AC, Temmesfeld-Wollbrück B, Schmeck B, Berger K, Frisch EM, Witzernath M, Brell B, Suttrop N, Hippenstiel S: Perturbation of endothelial junction proteins by *Staphylococcus aureus* alpha-toxin: inhibition of endothelial gap formation by adrenomedullin. *Histochem Cell Biol* 2006, **126**:305–316.
13. Müller HC, Witzernath M, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Santel A, Suttrop N, Rosseau S: Adrenomedullin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Thorax* 2010, **65**:1077–1084.
14. Temmesfeld-Wollbrück B, Brell B, David I, Dorenberg M, Adolphs J, Schmeck B, Suttrop N, Hippenstiel S: Adrenomedullin reduces vascular hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensive Care Med* 2007, **33**:703–710.
15. Witzernath M, Schmeck B, Doehn JM, Tschernig T, Zahiten J, Loeffler JM, Zemlin M, Müller H, Gutbier B, Schutte H, Hippenstiel S, Fischetti VA, Suttrop N, Rosseau S: Systemic use of the endolysin Cpl-1 rescues mice with fatal pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med* 2009, **37**:642–649.
16. Müller-Redetzky HC, Kummer W, Pfeil U, Hellwig K, Will D, Paddenberg R, Tabeling C, Hippenstiel S, Suttrop N, Witzernath M: Intermedin stabilized endothelial barrier function and attenuated ventilator-induced lung injury in mice. *PLoS ONE* 2012, **7**:e35832.
17. Müller HC, Hellwig K, Rosseau S, Tschernig T, Schmiedl A, Gutbier B, Schmeck B, Hippenstiel S, Peters H, Morawietz L, Suttrop N, Witzernath M: Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Crit Care* 2010, **14**:R143.
18. Paddenberg R, König P, Faulhammer P, Goldenberg A, Pfeil U, Kummer W: Hypoxic vasoconstriction of partial muscular intra-acinar pulmonary arteries in murine precision cut lung slices. *Respir Res* 2006, **7**:93.
19. Vecchi A, Garlanda C, Lampugnani MG, Resnati M, Matteucci C, Stoppacciaro A, Schnurch H, Risau W, Ruco L, Mantovani A: Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur J Cell Biol* 1994, **63**:247–254.
20. Sperling J, Schäfer T, Ziemann C, Benz-Weiber A, Kollmar O, Schilling MK, Menger MD: Hepatic arterial infusion of bevacizumab in combination with oxaliplatin reduces tumor growth in a rat model of colorectal liver metastases. *Clin Exp Metastasis* 2012, **29**:91–99.
21. Vaporidi K, Voloudakis G, Priniannakis G, Kondili E, Koutsopoulos A, Tsatsanis C, Georgopoulos D: Effects of respiratory rate on ventilator-induced lung injury at a constant PaCO₂ in a mouse model of normal lung. *Crit Care Med* 2008, **36**:1277–1283.
22. Gonzalez-Rey E, Chorny A, Varela N, Robledo G, Delgado M: Urocortin and adrenomedullin prevent lethal endotoxemia by down-regulating the inflammatory response. *Am J Pathol* 2006, **168**:1921–1930.
23. Itoh T, Obata H, Murakami S, Hamada K, Kangawa K, Kimura H, Nagaya N: Adrenomedullin ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, **293**:L446–L452.
24. Wilson MR, O'Dea KP, Zhang D, Shearman AD, van Rooijen N, Takata M: Role of lung-margined monocytes in an *in vivo* mouse model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2009, **179**:914–922.
25. Brell B, Temmesfeld-Wollbrück B, Altschneider I, Frisch E, Schmeck B, Hocke AC, Suttrop N, Hippenstiel S: Adrenomedullin reduces *Staphylococcus aureus*

- alpha-toxin-induced rat ileum microcirculatory damage. *Crit Care Med* 2005, **33**:819–826.
26. Brell B, Hippenstiel S, David I, Pries AR, Habazettl H, Schmeck B, Suttorp N, Temmesfeld-Wollbrück B: **Adrenomedullin treatment abolishes ileal mucosal hypoperfusion induced by Staphylococcus aureus alpha-toxin—an intravital microscopic study on an isolated rat ileum.** *Crit Care Med* 2005, **33**:2810–016.
 27. Sprung CL, Annane D, Keh D, Moreno R, Singer M, Freivogel K, Weiss YG, Benbenishty J, Kalenka A, Forst H, Laterre PF, Reinhart K, Cuthbertson BH, Payen D, Briegel J: **Hydrocortisone therapy for patients with septic shock.** *N Engl J Med* 2008, **358**:1111–124.
 28. Vincent JL, De Backer D: **Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis.** *Crit Care* 2005, **9**:S9–S12.
 29. Charles PE, Piroth L, Desbiolles N, Lequeu C, Martin L, Portier H, Chavanet P: **New model of ventilator-associated pneumonia in immunocompetent rabbits.** *Crit Care Med* 2002, **30**:2278–2283.
 30. Pugin J, Dunn-Siegrist I, Dufour J, Tissieres P, Charles PE, Comte R: **Cyclic stretch of human lung cells induces an acidification and promotes bacterial growth.** *Am J Respir Cell Mol Biol* 2008, **38**:362–370.
 31. Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Müller E, Rohde M: **Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells.** *Infect Immun* 2005, **73**:4653–4667.
 32. Carrizo GJ, Wu R, Cui X, Dwivedi AJ, Simms HH, Wang P: **Adrenomedullin and adrenomedullin-binding protein-1 downregulate inflammatory cytokines and attenuate tissue injury after gut ischemia-reperfusion.** *Surgery* 2007, **141**:245–253.
 33. Yin H, Chao L, Chao J: **Adrenomedullin protects against myocardial apoptosis after ischemia/reperfusion through activation of Akt-GSK signaling.** *Hypertension* 2004, **43**:109–116.

doi:10.1186/cc13830

Cite this article as: Müller-Redetzky *et al.*: Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin. *Critical Care* 2014 **18**:R73.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



2.4. Neutralisation des Komplementfaktors C5a schützt vor Lungenschaden und extrapulmonaler Organschädigung bei schwerer Pneumonie und Beatmung

Neutralizing Complement C5a Protects Mice with Pneumococcal Pulmonary Sepsis

Holger Müller-Redetzky, Ute Kellermann, Sandra-Maria Wienhold, Birgitt Gutbier, Jasmin Lienau, Katharina Hellwig, Katrin Reppe, Eleftheria Letsiou, Thomas Tschernig, Markus Scholz, Peter Ahnert, Christian Maasch, Kai Hoehlig, Sven Klussmann, Axel Vater, Theresa C Firsching, Judith Hoppe, Norbert Suttorp, Martin Witzenrath

Anesthesiology. 2020 Apr;132(4):795-807.

Der Komplementfaktor C5 wird nach Aktivierung des Komplementsystems in C5a and C5b gespalten. Während C5b Teil des *Membrane Attack Complex* ist, der Zielzellen bzw. Erreger lysiert, ist C5a ein potenter pro-inflammatorischer Botenstoff, der auch als Anaphylatoxin bezeichnet wird. C5a aktiviert neutrophile Granulozyten, induziert deren Rekrutierung in entzündete Gewebe und kann indirekt durch Inflammation und durch unmittelbare Wirkung am Endothel die vaskuläre Barrierefunktion stören. Exogen in die Lunge appliziertes C5a löst in Versuchstieren Lungenschaden aus. C5a könnte somit ein relevanter, potenziell auch therapeutisch zu adressierender Mediator bei ARDS sein. Vor diesem Hintergrund wurden die C5a Konzentrationen bei Patientinnen und Patienten mit schwerer ambulant erworbener Pneumonie gemessen und C5a mittels eines L-RNA Aptamers D19 in der murinen Pneumokokkenpneumonie neutralisiert. Auf diesem Wege wurde der Einfluss der C5a Neutralisation auf die Entzündungsreaktion und den pulmonalen und extrapulmonalen Organschaden in der Pneumonie untersucht. Individuen mit ambulant erworbener Pneumonie wiesen erhöhte Konzentrationen von C5a in der Zirkulation auf. Die Höhe der Konzentration korrelierte dabei nicht mit dem Schweregrad der Erkrankung, C5a stellt folglich vor dem Hintergrund der aktuellen Daten keinen potenziellen Biomarker für die CAP dar. Mäuse wurden mit *Streptococcus pneumoniae* infiziert, und entwickelten im Verlauf eine schwere pneumogene Sepsis. Es kam zu einem schweren Lungenschaden, gemessen an einer sehr hohen pulmonalen Permeabilität und einer Sepsis assoziierten Leberschädigung, die mit Störung der lokalen Gerinnung im Sinne einer Hyperkoagulation einherging, was aus einer ausgeprägten Ablagerung von Fibrin in der Leber abzuleiten war. Auch in Mäusen mit Pneumonie war C5a erhöht und die Neutralisation von C5a mit D19 führte zu einem geringeren Lungenschaden und Schutz vor Leberschädigung in der pneumogenen Sepsis. In einem zweiten Modell wurden Mäuse, die bereits eine schwere Pneumonie entwickelt hatten, für 6h beatmet. Dies stellt ein komplexes Tiermodell der Kombination von Pneumonie und VILI dar. D19 wurde in diesem Modell erst

24h nach Infektion, also in einem therapeutischen Ansatz verabreicht. Im Anschluss erfolgte die 6-stündige Beatmung. Die Beatmung aggravierte den Lungenschaden und die pulmonale sowie systemische Entzündungsreaktion bei der Pneumonie analog zur unter Punkt 2.4. beschriebenen Arbeit. Die Neutralisation von C5a mittels D19 reduzierte auch in diesem Modell die Ausbildung von pulmonaler Permeabilität.

Die Neutralisation von C5a schützte in diesen komplexen Tiermodellen der schweren Pneumonie und der Kombination von schwerer Pneumonie und VILI vor Lungen- und Leberschädigung. Diese protektiven Eigenschaften waren unabhängig von einer Modulation der lokalen oder systemischen Entzündungsreaktion nachweisbar.

Neutralizing Complement C5a Protects Mice with Pneumococcal Pulmonary Sepsis

Anesthesiology April 2020, Vol. 132, 795–807.

<https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000003149>

2.5. Die Verlängerung der Inspirationszeit bei maschineller Beatmung aggraviert

VILI

Increasing the inspiratory time and I:E ratio during mechanical ventilation aggravates ventilator-induced lung injury in mice.

Holger Christian Müller-Redetzky, Matthias Felten, Katharina Hellwig, Sahra Maia Wienhold, Jan Naujoks, Bastian Opitz, Olivia Kershaw, Achim D Gruber, Norbert Suttorp, Martin Witzentrath

Crit Care. 2015 Jan 28;19(1):23. doi: 10.1186/s13054-015-0759-2.

Lungenprotektive Beatmung mit niedrigen Tidalvolumina und einem adäquaten PEEP unter Vermeidung hoher inspiratorischer Plateaudrücke ist die zentrale Maßnahme in der Behandlung von ARDS Patient:innen durch die Minimierung von VILI. Aufgrund der feinen Regulation der dem Biotrauma unterliegenden Mechanotransduktion könnten weitere zu justierende Parameter der Beatmung Einfluss auf das Ausmaß von VILI haben. Hier wurde der Einfluss der Inspirationszeit und dem damit einhergehenden Verhältnis von Inspirationszeit zu Expirationszeit (I:E Verhältnis) auf VILI untersucht. VILI wurde in Mäusen durch Beatmung mit hohen Tidalvolumina von 34 ml/kgKG (HVT) über 4 Stunden ausgelöst. Kontrollgruppen wurden mit niedrigen Tidalvolumina von 9 ml/kgKG (LVT) beatmet. Eine HVT Gruppe wurde mit einem I:E Verhältnis von 1:2 und eine HVT Gruppe mit einem I:E Verhältnis von 1:1 beatmet. Analog wurden zwei LVT Gruppen mit einem I:E von 1 bzw. 1:2 untersucht. Es wurden Mortalität, Parameter der Lungenfunktion am Beatmungsgerät, pulmonale Permeabilität, Oxygenierung, Marker pulmonaler und systemischer Entzündungsreaktion und histologische Analysen durchgeführt. 4 Stunden Beatmung mit hohen Tidalvolumina und einem I:E Verhältnis lösen im Vergleich zu niedrigen Tidalvolumina einen relevanten beatmungsassoziierten Lungenschaden aus. Die Erhöhung des I:E Verhältnisses in HVT beatmeten Mäusen aggravierte die Lungenschädigung gemessen an pulmonaler Permeabilität, Oxygenierung, Lungenfunktionsparametern und histologischen Befunden signifikant.

Die Verlängerung der Inspirationszeit und die damit verbundene Erhöhung des I:E Verhältnisses könnte VILI aggravierend und sich nachteilig bei ARDS Patient:innen auswirken.

RESEARCH

Open Access

Increasing the inspiratory time and I:E ratio during mechanical ventilation aggravates ventilator-induced lung injury in mice

Holger C Müller-Redetzky^{1*}, Matthias Felten¹, Katharina Hellwig¹, Sandra-Maria Wienhold¹, Jan Naujoks¹, Bastian Opitz¹, Olivia Kershaw², Achim D Gruber², Norbert Suttorp¹ and Martin Witzentrath¹

Abstract

Introduction: Lung-protective ventilation reduced acute respiratory distress syndrome (ARDS) mortality. To minimize ventilator-induced lung injury (VILI), tidal volume is limited, high plateau pressures are avoided, and positive end-expiratory pressure (PEEP) is applied. However, the impact of specific ventilatory patterns on VILI is not well defined. Increasing inspiratory time and thereby the inspiratory/expiratory ratio (I:E ratio) may improve oxygenation, but may also be harmful as the absolute stress and strain over time increase. We thus hypothesized that increasing inspiratory time and I:E ratio aggravates VILI.

Methods: VILI was induced in mice by high tidal-volume ventilation (HV_T 34 ml/kg). Low tidal-volume ventilation (LV_T 9 ml/kg) was used in control groups. PEEP was set to 2 cm H₂O, FiO₂ was 0.5 in all groups. HV_T and LV_T mice were ventilated with either I:E of 1:2 (LV_T 1:2, HV_T 1:2) or 1:1 (LV_T 1:1, HV_T 1:1) for 4 hours or until an alternative end point, defined as mean arterial blood pressure below 40 mm Hg. Dynamic hyperinflation due to the increased I:E ratio was excluded in a separate group of animals. Survival, lung compliance, oxygenation, pulmonary permeability, markers of pulmonary and systemic inflammation (leukocyte differentiation in lung and blood, analyses of pulmonary interleukin-6, interleukin-1 β , keratinocyte-derived chemokine, monocyte chemoattractant protein-1), and histopathologic pulmonary changes were analyzed.

Results: LV_T 1:2 or LV_T 1:1 did not result in VILI, and all individuals survived the ventilation period. HV_T 1:2 decreased lung compliance, increased pulmonary neutrophils and cytokine expression, and evoked marked histologic signs of lung injury. All animals survived. HV_T 1:1 caused further significant worsening of oxygenation, compliance and increased pulmonary proinflammatory cytokine expression, and pulmonary and blood neutrophils. In the HV_T 1:1 group, significant mortality during mechanical ventilation was observed.

Conclusion: According to the “baby lung” concept, mechanical ventilation-associated stress and strain in overinflated regions of ARDS lungs was simulated by using high tidal-volume ventilation. Increase of inspiratory time and I:E ratio significantly aggravated VILI in mice, suggesting an impact of a “stress/strain \times time product” for the pathogenesis of VILI. Thus increasing the inspiratory time and I:E ratio should be critically considered.

* Correspondence: holger.mueller-redetzky@charite.de

¹Department of Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© 2015 Müller-Redetzky et al.; licensee BioMed Central. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly credited. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

Introduction

Mechanical ventilation is a life-saving intervention for patients with acute respiratory failure without alternative. However, mechanical ventilation itself can aggravate or even initiate lung injury, termed ventilator-induced lung injury (VILI) [1]. The impact of VILI on mortality and morbidity in acute respiratory distress syndrome (ARDS) patients is evident. Lung-protective ventilation strategies have been implemented to minimize VILI, consisting of limitation of tidal volumes (V_T) to 6 ml/kg body weight, use of positive end-expiratory pressure (PEEP), and avoidance of plateau pressures above 30 cmH₂O [2,3]. Further, even previously healthy lungs seem to benefit from lung-protective mechanical ventilation, and low tidal-volume ventilation causes an inflammatory response in healthy lungs [4]. Moreover, functional residual capacity is considerably reduced in ARDS (“baby lung concept”), and therefore, ventilated areas of the ARDS lung encounter dramatically increased transparenchymal forces, even under low tidal-volume ventilation. Thus, a certain safety threshold for VILI does not seem to exist, and any effort to minimize VILI further might be of relevance, particularly for the most severely ill ARDS patients [5].

Of note, little is known regarding the impact of ventilator adjustments on VILI. The absolute inspiratory lung strain, which is defined as the end-inspiratory transpulmonary pressure, and the absolute lung strain, defined as V_T /FRC, are central drivers of VILI [5]. We hypothesized that, in addition, the duration of lung stress and strain is relevant, proposing a Time \times Stress/strain product that affects VILI.

Increasing the inspiration-to- expiration ratio (I:E) and thereby the inspiratory time (t_i) of the respiratory cycle can improve oxygenation. The two main underlying mechanisms are probably prolonged gas exchange during inspiration in lung areas that do not take part in gas exchange during expiration, and recruitment of lung tissue due to increased intrinsic PEEP generated by dynamic hyperinflation [6,7]. It is tempting to use this intervention to improve oxygenation at bedside as, despite all efforts made to stabilize an appropriate residual volume by titrating PEEP, almost always, recruitable lung regions remain. Conversely, increasing I:E will result in an increased Time \times Stress/strain product that might aggravate VILI. A previous experimental study [8] and a recently published review of numerous animal models of VILI underscore this hypothesis [9].

In this study, we therefore investigated the impact of I:E on VILI in an experimental VILI mouse model and found that an increased I:E ratio significantly aggravates VILI in mice, suggesting the relevance of a role of a Stress/strain \times Time in the pathogenesis of VILI.

Material and methods

Ethics statement

All animal experiments were approved by institutional (Charité-Universitätsmedizin Berlin) and governmental (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin; G 0130/12) authorities.

Mice

Female C57BL/6 mice (8 to 10 weeks; 18 to 20 g; Charles River, Sulzfeld, Germany) were used.

Mechanical ventilation

Mice were anesthetized with intraperitoneal injections of fentanyl (75 μ g/kg), midazolam (1.5 mg/kg), and medetomidin (0.75 mg/kg). Repetitively, fentanyl (16 μ g/kg), midazolam (0.33 mg/kg), and medetomidin (0.16 mg/kg) were supplied via an intraperitoneal catheter, when required, to guarantee adequate anesthesia during the experiment. Body temperature was maintained at 37°C by a body temperature-controlled heating pad. Mice were tracheotomized, intubated, and ventilated with low tidal-volume (LV_T) respirator settings (tidal volume of 9 ml/kg, respiratory rate of 160 per min^{ute}, I:E ratio of 1:2, FiO₂ of 0.5). A carotid artery catheter was placed for blood pressure monitoring and infusion of a balanced electrolyte solution (Jonosteril; Fresenius Kabi, Bad Homburg Germany) containing 150 M trometamolhydrochloride (350 μ l/h).

A urinary catheter was inserted. Mean arterial blood pressure, heart rate, peripheral oxygen saturation (MouseOx; Starr Life Science Corp., Pittsburgh, PA, USA) and urine output were measured. Mice were ventilated by using a special rodent ventilation system, which continuously recorded airway pressure, respiratory rate, and tidal volume (flexiVent; Scireq, Montreal, QC, Canada). After preparation, a recruitment maneuver was performed (increasing of the airway pressure to 30 cmH₂O), and mice were ventilated for 4 hours with the following ventilator settings:

Low tidal-volume (LV_T) groups

Mice were ventilated with a tidal volume of 9 ml/kg, respiratory rate of 160 per minute, and I:E ratio of either 1:2 or 1:1 (LV_T 1:2; LV_T 1:1). A deep inspiration (30 cmH₂O for 1 second), was performed every 10 minutes, in addition to the applied positive end-expiratory pressure (PEEP) to avoid atelectasis. Notably, this protocol does not cause measurable lung injury in mice [10].

High tidal-volume (HV_T) groups

Mice were ventilated with a tidal volume of 34 ml/kg, respiratory rate of 70 per minute, and I:E ratio of 1:2 or 1:1, respectively (HV_T 1:2; HV_T 1:1).

In all I:E 1:1 groups, the inspiratory time was prolonged by adding an inspiratory hold after completion of lung

inflation, thereby leaving pressure and flow acceleration during inspiration identical between the corresponding LV_T and HV_T 1:2 groups, as schematically illustrated in Figure 1.

To generate baseline values at the beginning of mechanical ventilation, a group of mice referred to as nonventilated control (ctr) was anesthetized and operated as outlined earlier. After an identical recruitment maneuver, ctr mice were ventilated for 5 minutes with adjustments identical to those of the LV_T 1:2 mice. After measurement of baseline lung functions and hemodynamics, the experiment was terminated.

PEEP of 2 cmH_2O and an FiO_2 of 0.5 were applied throughout the experiments in all LV_T and HV_T groups. After 235 minutes of mechanical ventilation (MV), the I:E ratio was switched to 1:2 in all ventilated groups, and the inspired oxygen fraction was increased to an FiO_2 of 1.0. After 240 minutes of MV, mice were killed by rapid exsanguination via the carotid artery catheter.

An alternative end point was defined as decrease of mean arterial blood pressure below 40 mm Hg, as this safely predicts death in this model. The I:E ratio was then switched to 1:2, and the inspired oxygen fraction was increased to an FiO_2 of 1.0. After a further 5 minutes of MV, mice were killed by exsanguination via the carotid artery catheter.

To exclude dynamic hyperinflation in the HV_T 1:1 group, an additional set of animals was ventilated according to the HV_T 1:2 ventilation pattern for 30 minutes, and then the I:E ratio was increased to 1:1 for 30 minutes. This procedure was repeated. Mean airway pressure and dynamic compliance were recorded.

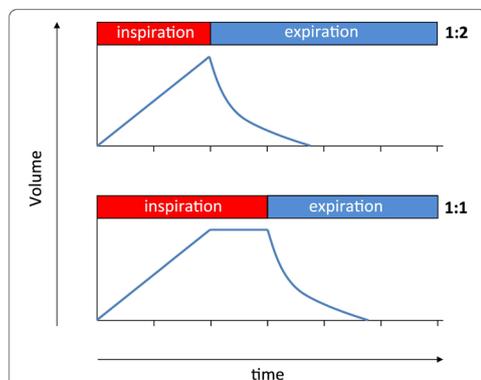


Figure 1 Schematic graphic of the respiratory cycle during I:E ratio of 1:2 and 1:1. In all I:E 1:1 groups, the inspiratory time was prolonged by adding an inspiratory hold after completion of lung inflation, thereby leaving pressure and flow acceleration during inspiration identical between the corresponding LV_T and HV_T 1:2 groups.

Lung function

After the initial recruitment maneuver, dynamic elastance, resistance, and compliance were measured by using a forced oscillation technique. Measurements were repeated every 10 minutes throughout the experiment. In addition, static-compliance values were determined after exsanguination.

Blood gas analyses

Blood samples were analyzed for p_aO_2 with a blood-gas analyzer (ABL-800; Radiometer, Copenhagen, Denmark). The P/F ratio was calculated as $P/F = p_aO_2/FiO_2$. Oxygenation Index was calculated as $OI = \text{mean airway pressure} \times FiO_2/p_aO_2$.

Lung permeability

After exsanguination, the left-stem bronchus was ligated, and bronchoalveolar lavage (BAL) of the right lung was performed twice with 400 μl PBS each. From each BAL fluid (BALF) portion, 250 μl was pooled, and BALF albumin concentration, as well as plasma albumin concentration, were determined with ELISA (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, AL, USA). Permeability was assessed by calculating the albumin BALF/plasma ratio.

qRT-PCR

Lungs were flushed. RNA was extracted with TRIzol (Ambion; Life Technologies, Darmstadt, Germany) treatment of lung homogenates and reverse-transcribed by using a high-capacity reverse transcription kit (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Germany). Quantitative PCR (qRT-PCR) was performed on ABI 7300 by using TaqMan gene-expression assays (Applied Biosystems). The PCR conditions included initial denaturation in one cycle of 2 minutes at 50°C and 10 minutes at 95°C, followed by 40 cycles of 15 seconds at 95°C, 20 seconds at 60°C, and 1 minute at 72°C. The input was normalized to the average expression of GAPDH. Primer and probe sequences are provided in Table S1 in Additional file 1.

Leukocytes in BAL fluid and blood

Leukocytes in BALF were differentiated with flow cytometry, according to their side-scatter/forward-scatter characteristics, and CD45, Gr-1, and F4-80 expression (FACSCalibur; BD, Heidelberg, Germany). Blood leukocytes were quantified and differentiated with flow cytometry by using TruCount-Tubes according to cellular side-scatter/forward-scatter characteristics and CD45, Gr-1, and CD3 expression.

Quantification of cytokines

Cytokines were quantified from total protein of flushed and homogenized left lungs and from plasma samples by

using the multiplex cytokine assay technique (BioRad, Hercules, CA, USA).

Histopathology

Lung samples were fixed in 4% formaldehyde solution and routinely embedded in paraffin. The 5- μ m-thick sections were cut, dewaxed, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) or periodic acid-Schiff (PAS). Histopathology was performed by two European College of Veterinary Pathologists (ECVP) board-certified pathologists, who were blinded to the study groups.

Data analyses

Data are expressed as box-and-whisker plots, or columns (mean \pm SEM). For comparison between groups, a Mann-Whitney *U* test was performed. *P* values <0.05 were considered statistically significant. For survival analyses, a log rank test was applied.

Results

Increasing inspiratory time and I:E ratio did not result in dynamic hyperinflation

To rule out relevant dynamic hyperinflation, HV_T animals were ventilated with an alternating I:E ratio (1:2 versus 1:1) in 30-minute intervals for 120 minutes, and mean airway pressure and dynamic compliance (*C*_{dyn}) were measured. Mean airway pressure remained stable during the specific interval of MV (see Figure S1A in Additional file 2). The higher but stable mean airway pressure during HV_T 1:1 is explained by the increased inspiratory time during HV_T 1:1 (see Figure S1A in Additional file 2). *C*_{dyn} remained stable during MV, irrespective of the adjusted I:E ratio (see Figure S1B in Additional file 2). Thus, HV_T 1:1 ventilation did not lead to relevant dynamic hyperinflation.

Increasing the inspiratory time and I:E ratio during MV increased mortality in VILI

All mice of the low tidal-volume groups ventilated with an I:E ratio of either 1:2 or 1:1 (LV_T 1:2; LV_T 1:1) and of the high tidal-volume group ventilated with an I:E ratio of 1:2 survived the procedures. Increasing the I:E ratio in the HV_T group to 1:1 resulted in premature termination of the experiment in 13 of 14 mice because of dropping of mean arterial blood pressure below 40 mm Hg (alternative end point), corresponding to a 92.1% mortality in the HV_T 1:1 group (Figure 2).

Increasing the inspiratory time and I:E ratio increased lung injury

Lungs from ctr, LV_T 1:2, and LV_T 1:1 showed no macroscopic or histologic signs of lung injury. HV_T 1:2 ventilated mice exhibited significant histopathologic signs of lung injury, whereas only distinct signs of injury were

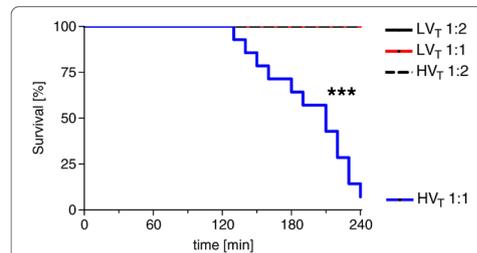


Figure 2 Increasing the inspiratory time and I:E ratio during MV increased mortality in VILI. Mice were mechanically ventilated for 4 hours with either low tidal volume (LV_T 9 ml/kg) or high tidal volume (HV_T 34 ml/kg) and an inspiratory/expiratory ratio of 1:2 or 1:1, respectively. If the mean arterial pressure decreased below 40 mm Hg, the experiment was prematurely terminated, as this predicts death with certainty in this model. *n* = 13-14 each group; ****P* < 0.001.

seen macroscopically. HV_T 1:1 led to dramatic macroscopic and histopathologic lesions. In both HV_T groups but not in the controls, the lung architecture was compromised by severe alveolar collapse and emphysema. Histopathology revealed severe perivascular edema, damage of the alveolar walls with desquamation of alveolar epithelial cells type I and formation of hyaline membranes, increasing numbers of intraalveolar cells (neutrophils and macrophages) and occasional necrosis of bronchiolar epithelium. Severe lung lesions were observed histologically on HE-stained tissues, with no differences seen between both groups (Figure 3 and Figure S2 in Additional file 3).

Periodic acid-Schiff (PAS) reaction clearly visualized hyaline membranes diffusely distributed throughout the lung parenchyma, indicative of marked damage of the alveolar membrane. However, in HV_T 1:2 lungs, hyaline membranes appeared only occasionally as continuous thin layers on the alveolar surface, while lungs of the HV_T 1:1 group had thicker hyaline membranes, which commonly completely covered the surface of dilated alveoli (Figure 4). Because pulmonary vascular leakage is a hallmark of ARDS and VILI, we quantified lung permeability by measuring the albumin concentration in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and plasma and by calculating the BALF/plasma albumin ratio. Compared with ctr mice, LV_T 1:2 and LV_T 1:1 did not result in increased permeability. In contrast, HV_T 1:2 mice showed a trend toward increased permeability compared with ctr and LV_T groups, whereas HV_T 1:1 evoked a dramatic increase in pulmonary vascular permeability (Figure 5).

Increasing the inspiratory time and I:E ratio reduced oxygenation capacity in VILI

Peripheral oxygen saturation was measured continuously throughout the experiment. Partial pressure of oxygen in

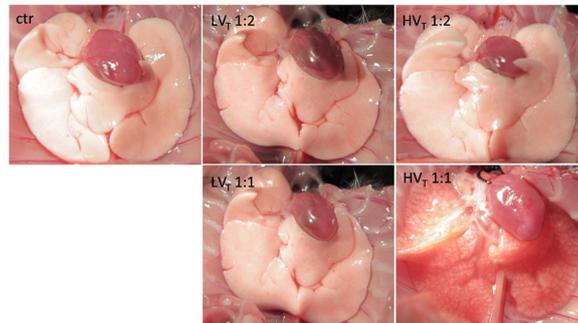


Figure 3 Increasing the inspiratory time and I:E ratio during MV increased VILI. Mice were mechanically ventilated for 4 hours with either low tidal volume (LV_T 9 ml/kg) or high tidal volume (HV_T 34 ml/kg) and an inspiratory/expiratory ratio of 1:2 or 1:1, respectively. An alternative end point was defined as decreasing of mean arterial blood pressure below 40 mm Hg, as this predicts death with certainty in this model. Controls (ctr) were subjected to LV_T 1:2 ventilation only during operation and were killed before the 4-hour ventilation protocol started. Ctr and LV_T groups showed no signs of lung injury macroscopically. HV_T 1:2 revealed only subtle macroscopic signs of injury, whereas the HV_T 1:1 group showed massive edema formation. Representative images from 13 to 14 animals per group are shown.

arterial blood and mean airway pressure were measured at the end of the experiment, and P/F ratio as well as oxygenation index (OI) were calculated. Whereas LV_T 1:2, LV_T 1:1, and HV_T 1:2 groups showed stable oxygenation regarding SpO_2 and P/F throughout the experiment (Figure 6A,B), the oxygenation index implied a reduced oxygenation capacity in HV_T 1:2 mice compared to ctr and LV_T groups (Figure 6C). HV_T 1:1

resulted in severe impairment of oxygenation compared with ctr, LV_T , and HV_T 1:2 groups (Figure 6A to C).

Increasing the inspiratory time and I:E ratio deteriorated lung function in VILI

Dynamic elastance was quantified every 10 minutes. While both LV_T groups showed stable elastance during the experiment, a slight increase over time in the HV_T

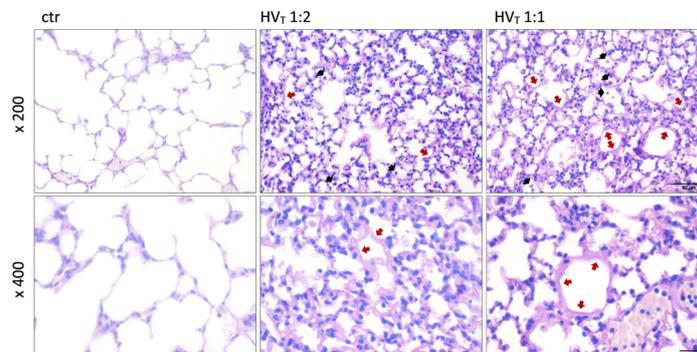
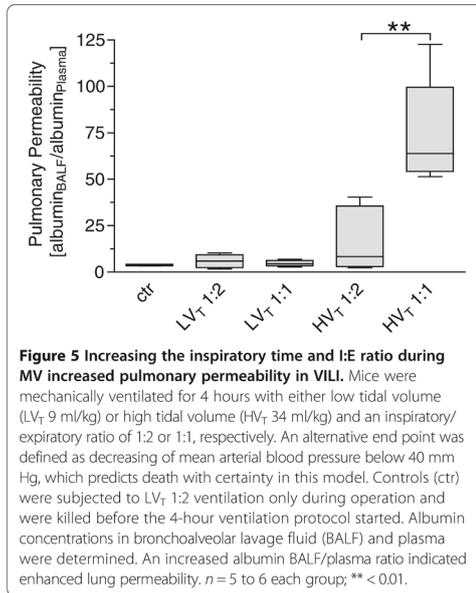


Figure 4 Increasing the inspiratory time and I:E ratio during MV increased histopathologic signs of lung injury. Mice were mechanically ventilated for 4 hours with either low tidal volume (LV_T 9 ml/kg) or high tidal volume (HV_T 34 ml/kg) and an inspiratory/expiratory ratio of 1:2 or 1:1, respectively. An alternative end point was defined as decreasing of mean arterial blood pressure below 40 mm Hg, which predicts death with certainty in this model. Controls (ctr) were subjected to LV_T 1:2 ventilation only during operation and were killed before the 4-hour ventilation protocol started. Histopathology of lungs from ctr, HV_T 1:2, and HV_T 1:1 groups, stained with the periodic acid-Schiff (PAS) reaction, are shown: In contrast to the ctr group, both ventilated groups had damage of the alveolar walls with septal thickening, necrosis, and desquamation of alveolar epithelial cells type I, formation of hyaline membranes (red arrows), and increased numbers of intraalveolar cells (predominantly neutrophils and macrophages, black arrows). PAS reaction highlighted the more severe and more continuous as well as thicker hyaline membranes along the alveolar surfaces of lungs from the HV_T 1:1 group. Top panel: magnification $\times 200$; Bottom panel: magnification $\times 400$. Representative images from each group ($n = 4$ each) are shown.



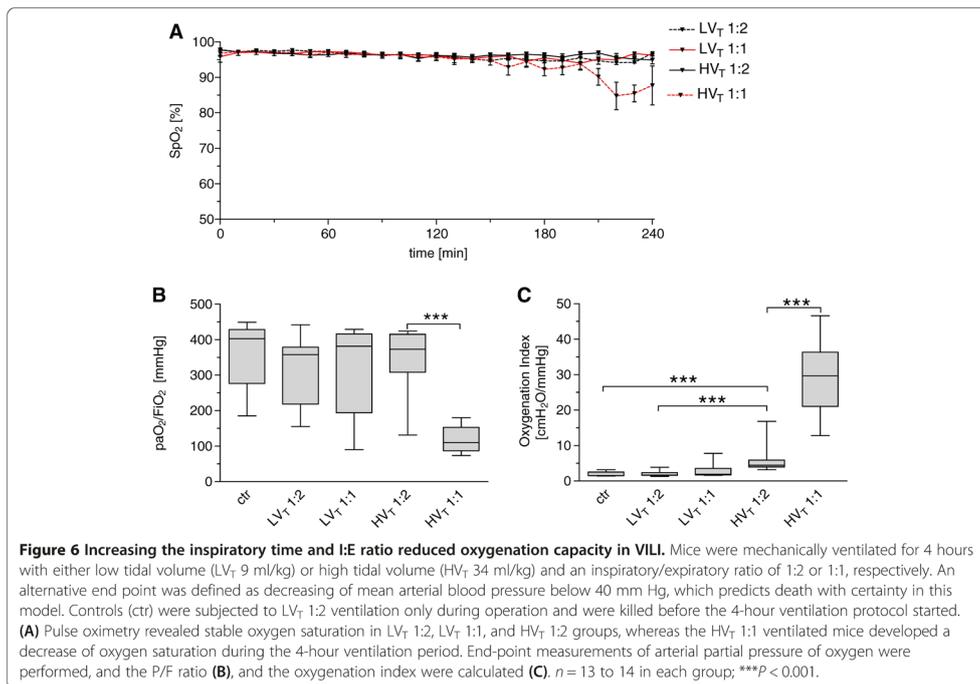
1:2 group, and a strong increase in the HV_T 1:1 group were observed (Figure 7A). Dynamic and static compliance at the respective end points of the experiment showed impaired compliance in the HV_T 1:2 compared with LV_T 1:2 mice. HV_T 1:1 led to a dramatic decrease in lung compliance (Figure 7B,C).

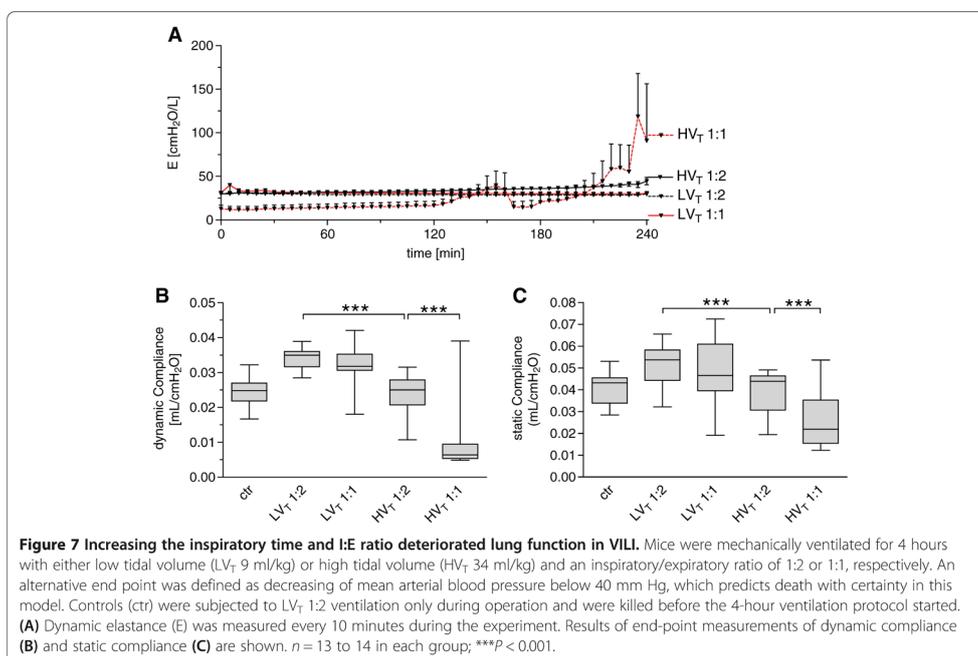
Increasing the inspiratory time and I:E ratio: impact on hemodynamics and markers of tissue perfusion

HV_T animals were ventilated with an alternating I:E ratio (1:2 versus 1:1) in 30-minute intervals for 120 minutes, and mean arterial blood pressure was measured. Changing of the I:E ratio had no impact on mean arterial blood pressure (see Figure S3A in Additional file 4). In animals ventilated for 4 hours (LV_T 1:2, LV_T 1:1, HV_T 1:2, and HV_T 1:1), cumulative urine output and blood lactate levels at the respective experimental end points were quantified. No difference in urine output between the groups was evident, whereas HV_T 1:1 revealed slightly higher lactate levels than the HV_T 1:2 group (see Figure S3 B, C in Additional file 4).

Increasing the inspiratory time and I:E ratio exacerbated the inflammatory response in VILI

We measured transcription of the proinflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, KC, and MCP-1 (Figure 8A) and protein





concentrations of IL-1 β , IL-6, KC, and MCP-1 in lung homogenates (Figure 8B). HV_T 1:2 increased IL-1 β , IL-6, KC, and MCP-1 mRNA expression compared with ctr and LV_T mice. Expression of most of these proinflammatory mediators was further increased in the HV_T 1:1.

LV_T 1:2 and LV_T 1:1 resulted in a certain increment of BALF neutrophils compared with ctr mice. In line with the elevation of proinflammatory cytokines in the lung, HV_T 1:2 led to a further increase of neutrophils, whereas HV_T 1:1 was associated with a significant neutrophil infiltration of the alveolar space (Figure 9A).

Furthermore, HV_T 1:1 exclusively resulted in an increased number of blood neutrophils, indicating a systemic inflammatory response (Figure 9B).

Discussion

We provide strong evidence that increasing the I:E ratio during mechanical ventilation can aggravate VILI, indicating that not only the absolute lung stress and strain but also the time in which the lung is exposed to stress and strain (the Time \times Stress and strain product) may affect the harm of mechanical ventilation.

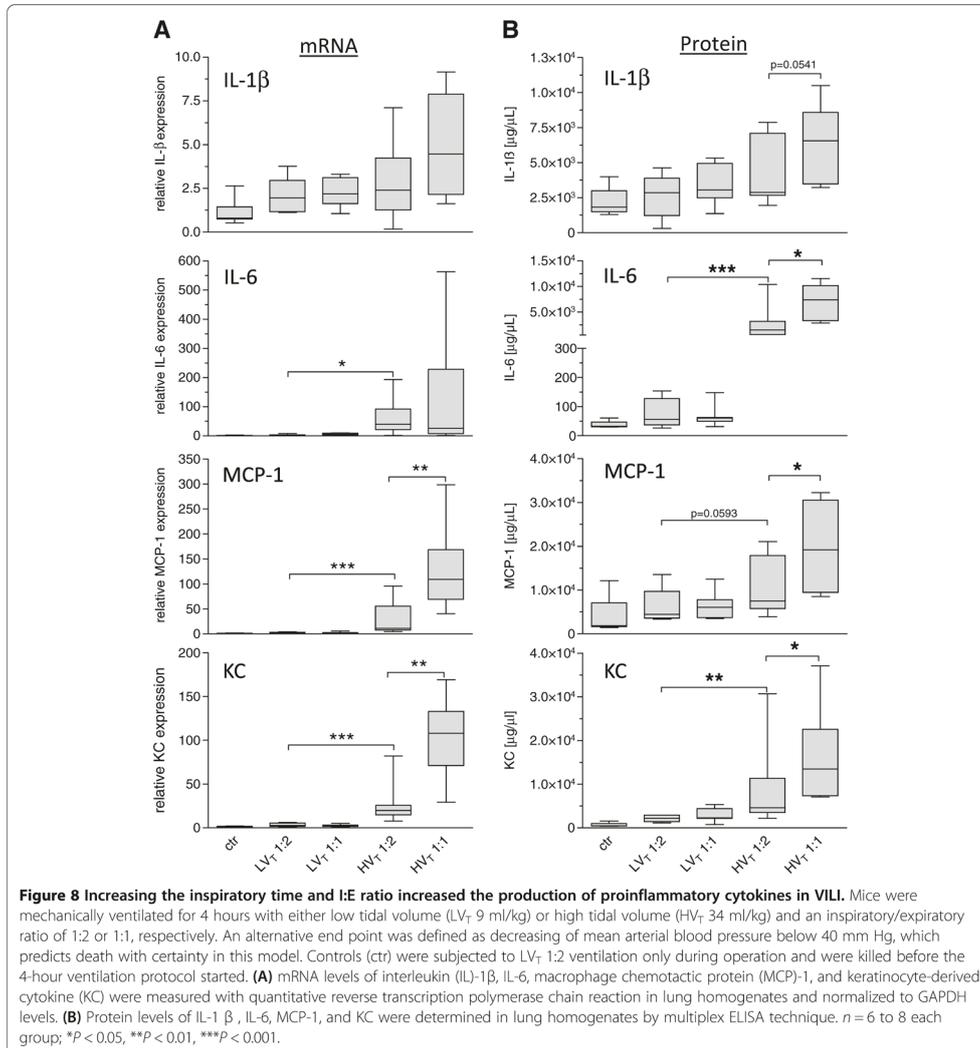
VILI impairs survival of ARDS patients [2,3]. Besides cyclic opening and closing of lung during tidal ventilation, high airway pressures and high tidal volumes have been identified as main drivers of VILI. More precisely,

not absolute airway pressure but the transpulmonary pressure termed lung stress, and not the absolute tidal volume, but its relation to the FRC, termed lung strain, are mechanical determinants of VILI [5]. Besides the amount of lung opening and closing that is correlated with ARDS mortality [11], the concept of intraparenchymal stress raisers during mechanical ventilation may have significant impact on the development of lung injury due to mechanical ventilation in the ARDS patient [5,12].

Recent clinical trials revealed that VILI is particularly relevant in patients with severe ARDS, and therefore, optimizing our ventilation strategies especially for those patients is desirable [13,14].

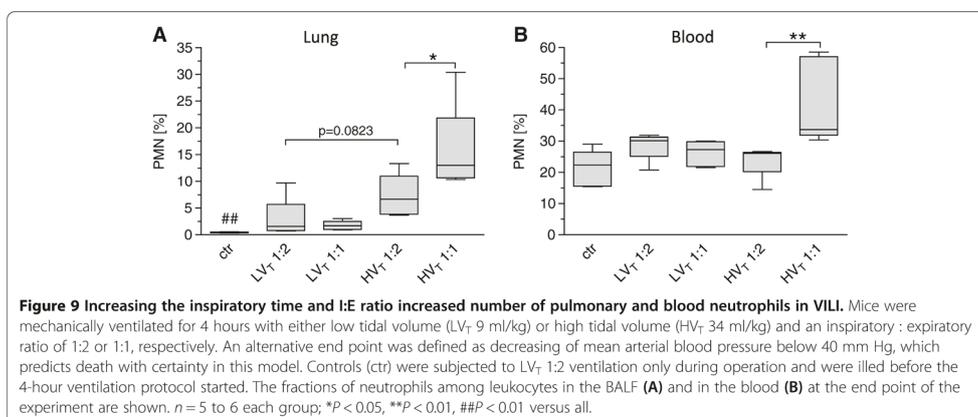
Lung stress and strain are not equally distributed throughout the respiratory cycle under MV, obviously being higher during inspiration than during expiration. The current study now provides evidence that not only absolute lung stress and strain but also increasing lung stress and strain in relation to the cycle time by prolonging the inspiratory time (t_i) and increasing the I:E ratio aggravate VILI. This is in line with the theory of weighted lung strain during MV by Caroni and colleagues [9].

Physical forces during mechanical ventilation are sensed by the lung and induce a biochemical response characterized by inflammation and endoepithelial permeability, referred to as biotrauma [1,15,16]. Therefore we assessed



lung permeability, detailed lung histology and markers of pulmonary inflammation. Even after the short observational time of 4 hours, we detected a significant impact of the increased t_i and I:E ratio on pulmonary cytokine levels, pulmonary neutrophil influx, systemic neutrophil counts, lung permeability, and histological signs of lung injury. KC and MCP-1 are chemotactic signals for neutrophils, which contribute to the development of VILI [17,18]. IL-1 β was shown to induce endothelial permeability and aggravate

VILI [19]. IL-6 is upregulated under mechanical ventilation and, although its exact role in VILI remains controversial, IL-6 levels are correlated with organ failure and outcome in ARDS [20-23]. Considering our findings, it is tempting to speculate that not only the absolute physical force or stretch but also its duration is sensed and responded to by the ventilated lung. This implies that mechanotransduction is increased, although the absolute amount of energy added to the system is kept constant, as



pressure and volume remain unchanged throughout the inspiratory hold in the HV_T 1:1 group.

To test the hypothesis of this study, we implemented severely injurious ventilation in mice. The tidal volume of 34 ml/kg was extraordinarily high compared with the standard of lung-protective ventilation with 6 ml/kg in humans with ARDS. At first view, this might outrange the stress and strain applied during MV in ARDS patients. However, residual capacity in ARDS lungs is severely reduced, which is referred to as the “baby lung” of ARDS patients [24]. Notably, the sicker the patient and the lower the oxygenation capacity becomes, the greater is the reduction of the residual capacity and the intention to increase the relative portion of inspiratory time to improve oxygenation. As intensivists do not routinely quantify residual capacity at the bedside, we do not know how much lung strain is generated during MV, despite limiting the tidal volume to 6 ml/kg, especially in very severe ARDS. Further, ARDS is characterized by a high grade of tissue inhomogeneity, in which open, atelectatic, and collapsed but recruitable lung areas coexist, which locally results in lung stress exceeding the measured airway pressure by far [5].

Loss and inactivation of surfactant, a hallmark in ARDS, further aggravate local trauma [1]. Thus, applying high tidal volumes in healthy mouse lungs constitutes a reasonable experimental approach. Further, the currently used model of VILI meets the ATS criteria on lung injury in animals, including the evidence of inflammation, microscopic tissue injury, alteration of alveolar barrier function, and impaired oxygenation [25]. Vice versa, the observation that prolonging *t_i* in the LV_T groups did not increase detectable lung injury in healthy mice does not argue for the safety of an I:E ratio increase in lung-protective ventilation of ARDS patients.

In this study, it was highly important to control properly factors that might significantly bias the results. (a) Dynamic hyperinflation would increase intrinsic PEEP, which consecutively enhances residual volume and shifts tidal volume upward on the pressure/volume curve, eventually above the upper inflection point, resulting in augmented absolute lung stress and strain. Thus, we adjusted respiratory rates in both HV_T groups to 70 per minute to exclude dynamic hyperinflation in the HV_T I:E 1:1 group. (b) To keep dynamics of lung inflation identical between 1:1 and 1:2 groups, we prolonged *t_i* by adding an inspiratory hold. This excluded that a difference in pressure acceleration during inspiration or a difference of the total inflation time biased the results of the study. (c) Expiration was most probably similar in the HV_T 1:1 and HV_T 1:2, and in the LV_T 1:1 and LV_T 1:2 groups, respectively. Expiration is a passive process starting after the opening of the expiratory valve with end-inspiratory pressure being the driving force, which was similar in the respective groups. As dynamic hyperinflation could be excluded, exhalation was complete. (d) Respiratory rate, PEEP and FiO₂ were identical in the HV_T and the LV_T groups, respectively and anesthesia and operation procedures were identical in all groups.

Intrathoracic pressure directly affects cardiac function (for an excellent review, see [26,27]), and increased intrathoracic pressure due to increased I:E ratio may decrease cardiac output [28,29]. Reduction of venous return seems to be the central mechanism reducing cardiac output by high intrathoracic pressure, which can be ameliorated by sufficient fluid support. In our study, mice received liberal fluid support to minimize reduction of cardiac output. Blood pressure and urine output were not affected by increased I:E ratio. Nevertheless, lactate levels were slightly elevated in HV_T 1:1 compared

with HV_T 1:2 mice. Thus a certain reduction of cardiac output cannot be excluded. However, circulatory failure and resultant shock as cause of the premature death of the HV_T 1:1 animals would have resulted in significantly higher lactate levels, lower blood pressure, and particularly in reduction of urine output.

Thus the data provided here exclude profound hemodynamic deterioration as the underlying mechanism for the devastating outcome of the HV_T 1:1 group.

Although the data are conclusive and the results are clear, one can only speculate whether the findings can be translated to patients with ARDS. However, the study clearly emphasizes that for further improvement of lung-protective ventilation strategies, a deeper understanding of central factors for VILI is mandatory. In this regard, experimental studies like the present one are essential.

Conclusion

The study design applied aimed to provide a proof of concept. The data show that beyond stress and strain, the time in which the lung is exposed to stress and strain (the Time × Stress and strain product) has dramatic impact on VILI. Therefore, it seems reasonable to minimize the Time × Strain product during MV. Particularly, increasing the I:E ratio should be critically revised in patients with ARDS.

Key messages

- Increasing inspiratory time und thereby the I:E ratio aggravates VILI.
- Beyond stress and strain, the time during which the lung is exposed to stress and strain (the Time × Stress and strain product) has dramatic impact on VILI.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Providing primer and probe sequences used for qRT-PCR.

Additional file 2: Figure S1. Giving mean airway pressure and dynamic compliance measurements under alternating I:E ratios (1:2 and 1:1) during HV_T ventilation.

Additional file 3: Figure S2. Providing HE images of all experimental groups.

Additional file 4: Figure S3. Providing hemodynamic data.

Abbreviations

ARDS: Acute respiratory distress syndrome; BAL: bronchoalveolar lavage; BALF: bronchoalveolar lavage fluid; C_{dyn}: dynamic compliance; Ctr: control; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; FIO₂: inspiratory fraction of oxygen; FRC: functional residual capacity; HV_T: high tidal volume; I:E ratio: inspiratory-to-expiratory ratio; IL-1β: interleukin-1 beta; IL-6: interleukin-6; KC: keratinocyte-derived chemokine; LV_T: low tidal volume; MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; MV: mechanical ventilation; OI: oxygenation index; p_aO₂: partial pressure of oxygen; PBS: phosphate-buffered saline; PEEP: positive end-expiratory pressure; qRT-PCR: quantitative

reverse transcription polymerase chain reaction; t: inspiratory time; VILI: ventilator-induced lung injury; V_T: tidal volume.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

HMR and MW planned and supervised the study, analyzed the data, and drafted the manuscript. MF and KH performed animal experiments, flow cytometry and cytokine assays, and critically revised the manuscript for important intellectual content. OK and ADG performed histology and critically revised the manuscript for important intellectual content. JN, SMW, and BO performed RT-qPCR analyses and critically revised the manuscript for important intellectual content. NS was involved in the study design and participated in drafting the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We thank Marfa Polikarpova for skillful technical assistance. The work is part of the doctoral thesis of Matthias Felten.

Funding

This study was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to HMR (SFB-TR84 C7), MW (SFB-TR84 C3, C6, and DFG OP 86/7-1), NS (SFB-TR84 B1), BO (SFB-TR84 A1, A5), ADG (SFB-TR84 Z1b). The funding sources had no influence on study design or publication.

Author details

¹Department of Infectious Diseases and Pulmonary Medicine, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. ²Department of Veterinary Pathology, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany.

Received: 6 October 2014 Accepted: 20 January 2015

Published online: 28 January 2015

References

1. Verbrugge SJC, Lachmann B, Kesecioglu J. Lung protective ventilatory strategies in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: from experimental findings to clinical application. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2007;27:67–90.
2. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, et al. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 1998;338:347–54.
3. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342:1301–8.
4. Wolthuis EK, Vlaar APJ, Choi G, Roelofs JJTH, Juffermans NP, Schultz MJ. Mechanical ventilation using non-injurious ventilation settings causes lung injury in the absence of pre-existing lung injury in healthy mice. *Crit Care*. 2009;13:R1.
5. Gattinoni L, Carlesso E, Caironi P. Stress and strain within the lung. *Curr Opin Crit Care*. 2012;18:42–7.
6. Kim WH, Hahn TS, Kim JA, Sim WS, Choi DH, Lee EK, et al. Prolonged inspiratory time produces better gas exchange in patients undergoing laparoscopic surgery: a randomised trial: inspiratory time and gas exchange. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2013;57:613–22.
7. Lee SM, Kim WH, Ahn HJ, Kim JA, Yang MK, Lee CH, et al. The effects of prolonged inspiratory time during one-lung ventilation: a randomised controlled trial. *Anaesthesia*. 2013;68:908–16.
8. Casetti AV, Bartlett RH, Hirschl RB. Increasing inspiratory time exacerbates ventilator-induced lung injury during high-pressure/high-volume mechanical ventilation. *Crit Care Med*. 2002;30:2295–9.
9. Caironi P, Langer T, Carlesso E, Protti A, Gattinoni L. Time to generate ventilator-induced lung injury among mammals with healthy lungs: a unifying hypothesis. *Intensive Care Med*. 2011;37:1913–20.
10. Reiss LK, Kowalik A, Uhlig S. Recurrent recruitment manoeuvres improve lung mechanics and minimize lung injury during mechanical ventilation of healthy mice. *PLoS One*. 2011;6:e24527.

11. Caironi P, Cressoni M, Chiumello D, Ranieri M, Quintel M, Russo SG, et al. Lung opening and closing during ventilation of acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181:578–86.
12. Mead J, Takishima T, Leith D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol*. 1970;28:596–608.
13. Papazian L, Forel J-M, Gacouin A, Penot-Ragon C, Perrin G, Loundou A, et al. Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2010;363:1107–16.
14. Guérin C, Reignier J, Richard J-C, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, et al. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2013;368:2159–68.
15. Han B. Ventilator-induced lung injury: role of protein-protein interaction in mechanosensation. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2:181–7.
16. Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced lung injury: from the bench to the bedside. *Intensive Care Med*. 2006;32:24–33.
17. Kawano T, Mori S, Cybulsky M, Burger R, Ballin A, Cutz E, et al. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol*. 1987;62:27–33.
18. Müller-Redetzky HC, Suttrop N, Witznath M. Dynamics of pulmonary endothelial barrier function in acute inflammation: mechanisms and therapeutic perspectives. *Cell Tissue Res*. 2014;355:657–73.
19. Frank JA, Pittet J-F, Wray C, Matthay MA. Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade. *Thorax*. 2008;63:147–53.
20. Wolters PJ, Wray C, Sutherland RE, Kim SS, Koff J, Mao Y, et al. Neutrophil-derived IL-6 limits alveolar barrier disruption in experimental ventilator-induced lung injury. *J Immunol*. 2009;182:8056–62.
21. Goldman JL, Sammani S, Kempf C, Saadat L, Letsiou E, Wang T, et al. Pleiotropic effects of interleukin-6 in a "two-hit" murine model of acute respiratory distress syndrome. *Pulm Circ*. 2014;4:280–8.
22. Gurkan OU, He C, Zielinski R, Rabb H, King LS, Dodd-o JM, et al. Interleukin-6 mediates pulmonary vascular permeability in a two-hit model of ventilator-associated lung injury. *Exp Lung Res*. 2011;37:575–84.
23. Meduri GU, Headley S, Kohler G, Stentz F, Tolley E, Umberger R, et al. Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS: plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest*. 1995;107:1062–73.
24. Gattinoni L, Pesenti A. The concept of "baby lung". *Intensive Care Med*. 2005;31:776–84.
25. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Goshong SD, Matthay MA, Slutsky AS, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44:725–38.
26. Feihl F, Broccard AF. Interactions between respiration and systemic hemodynamics, Part I: basic concepts. *Intensive Care Med*. 2009;35:45–54.
27. Feihl F, Broccard AF. Interactions between respiration and systemic hemodynamics, Part II: practical implications in critical care. *Intensive Care Med*. 2009;35:198–205.
28. Chan K, Abraham E. Effects of inverse ratio ventilation on cardiorespiratory parameters in severe respiratory failure. *Chest*. 1992;102:1556–61.
29. Meinhardt JP, Friess U, Bender HJ, Hirschl RB, Quintel M. Relationship among cardiac index, inspiration/expiration ratio, and perfluorocarbon dose during partial liquid ventilation in an oleic acid model of acute lung injury in sheep. *J Pediatr Surg*. 2005;40:1395–403.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



3. Diskussion

3.1. Verknüpfung von ARDS und VILI – Relevanz für experimentelle Studien

VILI trägt wahrscheinlich relevant zur Mortalität und Morbidität im ARDS bei. Dies lässt sich aus dem positiven Effekt des Einsatzes von lungenprotektiven Beatmungskonzepten - vornehmlich der Reduktion der Tidalvolumina unter invasiver Beatmung - auf die Sterblichkeit im ARDS ableiten (7). Darüber hinaus konnten Arbeiten von Ranieri et al. eindrucksvoll belegen, dass VILI auch extrapulmonale Organdysfunktion beeinflusst (12,13). Ein höheres Ausmaß an Organdysfunktion ist mit einer erhöhten Sterblichkeit bei kritisch Kranken assoziiert (67). Seit der Beschreibung des ARDS als eigenständiges Syndrom durch Ashbough 1967 konnte die Sterblichkeit des ARDS einzig durch Interventionen, die die Durchführung der Beatmungstherapie beinhalteten, positiv beeinflusst werden (68). Dazu zählen neben dem erwähnten Effekt der Reduktion von Tidalvolumina, die konsequente Bauchlagerungstherapie und der Einsatz eines hohen positiv endexpiratorischen Drucks (PEEP) beim schweren ARDS (7,69,70). Explorative Analysen legen darüber hinaus auch einen Einfluss eines hohen *Driving pressures*, des Druckes, der zusätzlich zum PEEP durch das Beatmungsgerät zur Insufflation eines ausreichend hohen Tidalvolumens aufgebaut werden muss, auf die Sterblichkeit des ARDS nahe (71).

Zusammenfassend belegt dies eindrücklich, dass die Pathologie des ARDS somit nur zu einem Teil von der auslösenden Grunderkrankung wie einer Pneumonie, einer Sepsis, einer Aspiration oder eines schweren Traumas abhängt. Zu einem relevanten Teil trägt auch die Überdruckbeatmung zur Pathologie des ARDS bei.

Dies mag unter anderem eine Erklärung dafür sein, warum bis dato alle Interventionen, wie z. B. die Beeinflussung der Entzündungsreaktion, die aus vielversprechenden tierexperimentellen Studien abgeleitet wurden, in denen der Effekt der Beatmung ignoriert wurde, in klinischen Studien letztlich erfolglos geblieben sind.

VILI ist wie einleitend beschrieben ebenfalls gut in Tiermodellen charakterisiert. In der überwiegenden Mehrheit der Studien erfolgten jedoch Untersuchungen in naivem gesunden Lungengewebe. Die hier unter Punkt 2.3. vorgestellte Arbeit, in der die Interaktion von Pneumokokkenpneumonie und VILI untersucht wurde, belegt aber eindrücklich, dass Beatmung einen deutlich stärkeren Effekt hinsichtlich des Auslösens bzw. Aggravierens einer Lungenschädigung hat, wenn es sich um vorgeschädigtes bzw. entzündlich aktiviertes Lungengewebe handelt. Dies steht im Einklang mit Arbeiten anderer Autoren,

die dies für entzündlich, infektiös oder durch einen hämorrhagischen Schock vorgeschädigtes Lungengewebe zeigen konnten (47–49).

In den eingangs genannten Arbeiten von Ranieri et al. wurde belegt, dass VILI Einfluss auf extrapulmonale Organdysfunktion hat, welche per se Einfluss auf das Outcome von kritisch kranken Patienten hat (13,67). Bestenfalls sollte dieser Effekt folglich ebenfalls in präklinischen Modellen simuliert sein, so dass potenzielle adjuvante Therapien auch hinsichtlich dieses wahrscheinlich prognoserelevanten Aspekts evaluiert werden können. In der unter Punkt 2.3. vorgestellten Arbeit wird eindrücklich der Effekt der Beatmung auf die Progression des septischen Organversagens bei Pneumokokkenpneumonie belegt.

Das hier diskutierte Modell qualifiziert sich somit in vielerlei Hinsicht zur präklinischen Evaluation von adjuvanten pharmakologischen Interventionen für Patienten mit akutem Lungenversagen: i) Die Pneumonie ist der häufigste Auslöser von ARDS und schwerer Sepsis und die Pneumokokkeninfektion der häufigste Auslöser einer schweren ambulant erworbenen bakteriellen Pneumonie. ii) Die Sequenz, die in dem Modell simuliert wird, nämlich der Beginn der Beatmung erst bei bereits vollständig etablierter schwerer Pneumonie (im Modell 24 Stunden nach der Infektion) entspricht grundsätzlich der Situation von Patientinnen und Patienten, die auch erst im fortgeschrittenen Stadium der Pneumonie beatmungspflichtig werden. iii) Es wird die Pneumonie als wichtigster Auslöser des ARDS mit Beatmung kombiniert und über den resultierenden Lungenschaden hinaus auch die Progression des septischen Organversagens durch Beatmung simuliert.

Vor dem Hintergrund der bereits sehr gut charakterisierten Pathophysiologie des ARDS sowie des VILI ist es weiterhin als realistisch anzunehmen, dass adjuvante pharmakologische Interventionen auch für Patienten mit ARDS Vorteile beinhalten könnten. Präklinische Modelle sollten aber berücksichtigen, dass beim ARDS grundsätzlich vorgeschädigtes bzw. entzündlich aktiviertes Lungengewebe beatmet wird und dass VILI auch Einfluss auf extrapulmonales Organversagen hat. Unter der Verwendung solcher komplexen experimentellen Modelle könnte die präklinische Evaluation der Effizienz von möglichen Interventionen zielgerichteter erfolgen und die Wahrscheinlichkeit einer erfolgreichen Translation in klinischen Studien erhöht werden.

3.2. Adjuvante Therapien für VILI und ARDS

Aus dem einleitend dargelegten Biotraumakzept von VILI, also dem Auslösen potenziell schädigender pro-inflammatorischer Signale im Lungengewebe durch die Dehnung des Lungengewebes unter Überdruckbeatmung, leitet sich ab, dass VILI durch pharmakologische

Intervention minimiert werden kann (3,9). Dies könnte insbesondere im sehr schwerem Lungenversagen von Relevanz sein, da in diesen Fällen das noch belüftete Lungenvolumen sehr klein ist, also auch niedrige Tidalvolumina in Relation zum ventilierbaren Lungenvolumen sehr groß und damit überproportional schädlich sein können (58). Man spricht hier von dem *baby lung concept* des ARDS. Vor diesem Hintergrund wurden in den hier zusammengefassten Arbeiten verschiedene solcher adjuvanten Therapien untersucht.

3.2.1. Der Sphingosin 1P Signalweg

Sphingosin 1 Phosphat (S1P) entsteht durch Phosphorylierung durch Sphingosinkinasen aus Sphingosin welches über katalytische Prozesse intrazellulär synthetisiert wird. S1P bindet an Sphingosin 1 Phosphat Rezeptoren, von den aktuell 5 Subtypen bekannt sind (S1PR1-5). Die Konzentration von S1P ist über die Aktivität der Sphingosinkinasen und der abbauenden Enzyme wie der S1P Phosphatase und S1P Lyase fein reguliert. S1P reguliert die endotheliale Barrierefunktion, was S1P Signalwege für das Verständnis der Pathophysiologie von endothelialer Barriestörung und für potentielle adjuvante pharmakologische Interventionen beim akuten Lungenversagen interessant machen (72). Für die protektive Wirkung von S1P auf endotheliale Barrierefunktion scheint die Bindung von S1P an S1PR1 verantwortlich zu sein während Interaktion mit S1PR3 zu einem Anstieg der endothelialen Permeabilität führen kann was noch einmal unterstreicht wie komplex die Wirkung von S1P ist, und dass auch die Regulation der Expression seiner Rezeptoren die biologische Wirkung von S1P maßgeblich beeinflussen kann (72,73).

Exogenes S1P schützt vor Störung der vaskulären Barrierefunktion in Zellmodellen wie auch in Klein- und Großtiermodellen des akuten Lungenversagens (44,74,75).

FTY720 ist ein synthetisches Analogon von S1P. FTY720 bindet primär an S1PR1,4,5 und wie auch S1P hat es immunmodulatorische Wirkung indem der Austritt von Lymphozyten aus den sekundären Lymphatischen Organen gehemmt wird (76). Aufgrund dieser Eigenschaften wurde FTY720 als immunmodulierendes Medikament entwickelt und ist in der Therapie der multiplen Sklerose etabliert (77,78). Wie S1P stabilisiert FTY720 auch sehr potent endotheliale Barrierefunktion in vitro und in vivo.

Obwohl S1P protektiv auf das Endothel wirkt, ist nachgewiesen, dass hohe Spiegel von S1P auch gegenteilige Effekte haben können und zu einer Destabilisierung von endothelialer Barrierefunktion führen können, was soweit bekannt durch die Bindung an S1PR2 und S1PR3 vermittelt wird (73,79). In der murinen Pneumokokkenpneumonie sind die in der Entzündung stark erhöhten S1P Spiegel ebenfalls ursächlich für die Entwicklung von pulmonalvaskulärer Permeabilität (80).

In der unter 2.1. zusammengefassten Arbeit wurde untersucht ob FTY720 analog zur S1P protektive Wirkung im VILI hat (81). FTY720 hat eine lange Halbwertszeit und sehr hohes Verteilungsvolumen und wird hepatisch metabolisiert (82–85). Einschränkung der Metabolisierung z.B. im Rahmen einer kritischen Erkrankung oder Medikamenteninteraktionen könnten so zu ungewollt hohen Spiegel von FTY720 führen. Vor diesem Hintergrund wurde auch untersucht welche Wirkung hohe Spiegel von FTY720 auf die endotheliale Barrierefunktion haben.

In der hier unter 2.1. aufgeführten Arbeit konnte dokumentiert werden, dass FTY720 in niedrigen Konzentrationen von 0.1 bis 1 μM in primären humanen Endothelzellen Barrierefunktion wie vorbeschrieben stabilisiert, und dass eine niedrige Dosis von 0.1 mg/KgKG in einem Mausmodell des VILI vor der Entwicklung von Permeabilität schützt (86). Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den untersuchten niedrigen Konzentrationen hohe Konzentrationen von 10 und 100 μM FTY720 in Endothelzellen zu einem starken Anstieg von Permeabilität führten, was mit einem irreversiblen Zellschaden einherging, vermittelt durch die Initiierung von Apoptose. Auch in Mäusen die mit einer hohen Dosierung von FTY720 (2mg/kgKG) behandelt worden waren, konnte im Lungengewebe vereinzelt das Auftreten von Apoptosen im pulmonalvaskulären Endothel nachgewiesen werden, was bei den mit niedrigen Dosierungen behandelten Versuchstieren nicht zu dokumentieren war. Dies bleibt ohne einen funktionellen Lungenschaden, gemessen an pulmonaler Permeabilität. Bemerkenswert war, dass Mäuse, die mit einer hohen Dosis FTY720 behandelt und beatmet worden waren deutlich ausgeprägter VILI entwickelten als unbehandelte oder mit niedriger Dosis behandelte Mäuse, was sich durch eine stark erhöhte pulmonale Permeabilität auszeichnete. Dies ging einher mit ausgeprägtem Untergang von Endothelzellen in der Lunge dieser Versuchstiere einher.

Zusammengefasst konnte somit eine protektive Wirkung von niedrigen Dosierungen von FTY720 auch im VILI nachgewiesen werden. Steigen die Spiegel von FTY720 in den Versuchstieren allerdings an, so kommt es unter Beatmung zu einer schwerwiegenden Exazerbation von Lungenschädigung.

Der unterliegende Mechanismus ist letztendlich noch nicht bis ins Detail aufgeklärt. Die Untersuchungen legen nahe, dass es über Apoptoseinduktion zu einem Verlust von Barrierefunktion kommt. Denkbar ist aber auch, dass FTY720 in hohen Konzentrationen über Bindung an S1PR2 und 3 Destabilisierung der Endothelien Barrierefunktion vermittelt.

Diese Ergebnisse aus Zellkultur und Tiermodell rechtfertigen die Übertragung auf den Menschen noch nicht. Sicher ist allerdings, dass die Wirkung von FTY720 dosisabhängig verschieden sein kann. Daraus

könnte man ableiten, dass bei Patient:innen, die mit FYT720 behandelt werden, eine Akkumulation der Substanz z.B. durch eingeschränkten Leberstoffwechsel oder Medikamenteninteraktionen insbesondere wenn Patient:innen beatmet werden müssen vermieden werden sollten.

Trotz der isoliert als sehr potent einzuschätzenden barriestabilisierenden Effekte von S1P scheint das S1P System aufgrund seiner pleiotropen komplexen Wirkungen vor dem Hintergrund des aktuellen Kenntnisstandes kein optimaler Angriffspunkt für pharmakologische Interventionen bei VILI und ARDS zu sein. Weitergehende klinische Studien bei ARDS Patient:innen laufen zum jetzigen Zeitpunkt nicht.

3.2.2. Adrenomedullin und Intermedin

Adrenomedullin und Intermedin (auch als Adrenomedullin-2 bezeichnet) sind strukturell sehr eng verwandte endogene Peptide, die eine Rolle in der Regulation der vaskulären Integrität spielen. Genetisch veränderte Mäuse, die kein Adrenomedullin bilden können, sterben bereits intrauterin an einem *Hydrops fetalis* als Resultat einer generalisierten Gefäßhyperpermeabilität. Auch die Deletion des gemeinsamen Rezeptors Calcitonin receptor like receptor (CLR) führt zu diesem letalen Phänotyp. Beide Peptide haben in diversen experimentellen Untersuchungen potente stabilisierende Effekte auf die endotheliale Barrierefunktion bewiesen (87,88).

So schützt Adrenomedullin vor einer Störung der endothelialen Barrierefunktion, ausgelöst durch *Staphylococcus aureus* α -Toxin in humanen primären Endothelzellen, am isoliert perfundierten Rattendarm und in einem Ganztiermodell α -Toxin vermittelten schweren Schocks, in dem es neben der protektiven Wirkung an der Lungengefäßstrombahn auch Permeabilität in Leber, Niere und Darm reduzierte (64,65,65,87,89). Auch in einem VILI Modell schützt ADM vor der Entwicklung von pulmonaler Permeabilität (45). Intermedin zeigt protektive Eigenschaften auf die vaskuläre Barrierefunktion *in vitro*, in der Ischämie/Reperfusionsschädigung der Lunge im Lungentransplantationsmodell der Ratte und Ischämie/Reperfusionsmodellen am Myokard der Ratte (90–92). Wie ausgeführt ist die Integritätsstörung der vaskulären und epithelialen Barrierefunktion der zentrale Mechanismus, der zur Entstehung des Lungenödems im ARDS führt. Die Verhinderung bzw. Verringerung des Ausmaßes des Lungenödems ist somit ein rationaler Angriffspunkt für adjuvante pharmakologische Interventionen in der akuten Lungenschädigung. Vor diesem Hintergrund wurden Adrenomedullin und Intermedin in verschiedenen VILI Modellen untersucht (93,94).

In einer Vorarbeit zu der hier unter 2.3. zusammengefassten Studie schützte Adrenomedullin vor der Entwicklung pulmonalvaskulärer Permeabilität in verschiedenen Modellen des VILI (45). Bemerkenswert war, dass auch eine verzögerte Gabe von Adrenomedullin noch effektiv die

Schrankenstörung reduzierte. In der unter Punkt 2.2. zusammengefassten Arbeit zeigte sich, dass auch Intermedin der Entstehung von pulmonaler Permeabilität im VILI vorbeugte. Im Vergleich beider Substanzen war Adrenomedullin aber potenter hinsichtlich der protektiven Wirkung vor pulmonalvaskulärer Hyperpermeabilität. Darüber hinaus ließ sich in einer vorangehenden Studie nachweisen, dass Adrenomedullin auch vor renaler Dysfunktion und durch VILI ausgelöster Mikrozirkulationsstörung schütze (45). Da Adrenomedullin in diesem Kontext Intermedin überlegen schien, wurde Adrenomedullin weiter in der unter Punkt 2.3. zusammengefassten Studie in dem bereits oben diskutierten komplexen Mausmodell der Kombination von schwerer Pneumokokkenpneumonie und Beatmungsschaden untersucht. Wie zuvor beschrieben kommt es durch die Beatmung zu einer dramatischen Exazerbation des Pneumonie-induzierten Lungenschadens, assoziiert mit einer schweren pulmonalen Schrankenstörung. Adrenomedullin schützte auch in diesem Kontext vor der Entwicklung der beatmungsassoziierten Aggravierung der pulmonalvaskulären Hyperpermeabilität. In dem Modell kam es auch in den Tieren mit Pneumonie nach der Beatmung zu einer relevanten extrapulmonalen Organschädigung, explizit von Leber, Darm und Niere. In den mit Adrenomedullin behandelten Tieren trat die Schädigung von Leber und Darm nicht bzw. in einem deutlich reduzierten Ausmaß auf.

Diesen beeindruckenden Effekten unterliegen mutmaßlich mehrere sich überlagernde Mechanismen. Die Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion ist sehr wahrscheinlich auf die Bindung von Adrenomedullin an seinen G Protein gekoppelten Rezeptor CRLR, der Erhöhung intrazellulärer cAMP Spiegel, was letztendlich zur Reduktion der Myosin Leichtkettenphosphorylierung führt, zurückzuführen (87,88,95). Die Hemmung der endothelialen Zellkontraktion bedingt die Verhinderung der interzellulären Porenbildung, dem ultrastrukturellen Korrelat der endothelialen Permeabilität. Auch die Zunahme von interzellulären Adhäsionsproteinen durch Adrenomedullinexposition ist beschrieben und könnte zur Reduktion der Permeabilität beigetragen haben (65). Permeabilität ausgelöst durch Injektion des *Staphylococcus aureus* α -Toxin in einem Schockmodell in Ratten wird auch in anderen Organen wie Leber, Niere und Darm durch Adrenomedullin reduziert, was auch in der aktuellen Untersuchung zum Schutz vor Organdysfunktion bei Pneumonie und Beatmung unter Adrenomedullintherapie beigetragen haben könnte (96). Ein weiterer diesbezüglich interessanter Effekt von Adrenomedullin ist der Einfluss von Adrenomedullin auf die Mikrozirkulation. Die Störung der Mikrozirkulation, aus der parenchymale Hypoperfusion resultiert, ist die Endstrecke der Organschädigung im Schock. Adrenomedullin stabilisiert die Mikrozirkulation im isolierten Rattendarm unter Stimulation mit *Staphylococcus aureus* α -Toxin(66). Analog dazu wurde bei den Versuchstieren

der Studie aus Punkt 2.3., die unter Adrenomedullin deutlich weniger Schädigung des Leber- und Darmparenchyms aufwiesen, in weiterführenden Analysen eine signifikant reduzierte Ablagerung von Fibrin im Gefäßsystem der Leber im Vergleich zu nicht behandelten Tieren mit Pneumonie und Beatmung nachgewiesen, was ebenfalls auf einen Effekt von Adrenomedullin auf die Stabilisierung der Mikrozirkulation hinweist.

Es ist zu erwähnen, dass in der hier vorgestellten Untersuchung die protektiven Eigenschaften von Adrenomedullin nicht auf die Modulation der pulmonalen oder systemischen zellulären oder humoralen Entzündungsantwort zurückzuführen waren. Dies könnte für die Weiterentwicklung von Adrenomedullin für klinische Studien ein relevanter Vorteil sein, denn Patientinnen und Patienten, die im Rahmen eines Lungenversagens auf die Intensivstation aufgenommen werden, haben zu diesem Zeitpunkt ein meist seit Tagen durch verschiedene Erreger und die Dauer der Erkrankung sehr unterschiedlich ausgeprägt und spezifisch aktiviertes Immunsystem. Diese Entzündungsreaktion für die Mehrheit der Betroffenen durch eine adjuvante Therapie relevant schützend modulieren zu können, ist zum aktuellen Zeitpunkt zumindest fragwürdig.

Vor dem Hintergrund der konsistenten präklinischen Studien zur protektiven Wirkung von Adrenomedullin im Lungenversagen und septischem Schock werden mittlerweile klinische Studien in diesem Indikationsgebiet durchgeführt. Zum einen wird in der Phase II die Sicherheit des nicht neutralisierenden Anti-Adrenomedullinantikörpers Adrezicumab bei Patienten im septischen Schock geprüft (NCT03085758). Durch die Bindung an die nicht neutralisierenden Antikörper soll der Abbau von endogenem Adrenomedullin gehemmt und die Adrenomedullinspiegel in der akuten Erkrankung stabilisiert werden (97). Dadurch steigt die Wirkung des Adrenomedullins auf das Endothel, während die Extravasation und potenzielle relaxierende Wirkung auf die Gefäßmuskulatur verhindert wird. Die Studie ist abgeschlossen, die Daten aber noch nicht publiziert. Die präklinischen Daten zu Adrezicumab zeigen ähnlich wie die exogene Zufuhr von Adrenomedullin einen protektiven Effekt auf die vaskuläre Barrierefunktion (96,98).

In einer Phase 2 Studie (NCT04417036) wird aktuell der Effekt von inhalativem pegyliertem Adrenomedullin bei moderatem bis schwerem ARDS geprüft. Die Studie ist aktuell noch aktiv rekrutierend und Ergebnisse somit noch nicht verfügbar.

Zusammengefasst scheint Adrenomedullin ein vielversprechendes Peptid für die adjuvante Therapie des ARDS und septischen Schocks zu sein.

3.2.3. Neutralisation von C5a

C5a ist ein Spaltprodukt des Komplementfaktors C5. Während das Spaltprodukt C5b an der Bildung des *Membrane Attack Complex* (MAC) beteiligt ist, durch den das Komplementsystem Erreger bzw. Zielzellen lysieren kann, stellt C5a einen potenten pro-inflammatorischen Mediator dar. C5a ist chemotaktisch wirksam und induziert die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in entzündlich aktivierte Gewebe. Exposition von C5a gegenüber Immunzellen führt zur Freisetzung proentzündlicher Mediatoren. C5a kann auch direkt die endotheliale Barrierefunktion schädigen, und aktiviert das Gerinnungssystem (99–102). Durch die Instillation von C5a in die Lunge kann in Versuchstieren das Vollbild eines akuten Lungenversagens ausgelöst werden (103). In der Sepsis hat C5a neben wie zuvor beschrieben frühen entzündlichen Wirkungen im weiteren Verlauf bei prolongierter Exposition Effekte, die zu einer Anergie von zirkulierenden Granulozyten führen und somit im weitesten Sinne zur Immunparalyse des kritisch kranken Patienten beitragen können (102). Die Antagonisierung von C5a durch Antikörper oder Unterbinden der C5a Bindung an die Rezeptoren C5aR1 und C5aR2 zeigte protektive Wirkung in diversen Tiermodellen des akuten Lungenversagens und der Sepsis (104–107). Diese Daten weisen auf eine potenzielle zentrale Rolle von C5a in der Genese des Lungenversagens und der septischen Organschädigung hin. Die Rolle von C5a bei schwerer Pneumokokkenpneumonie und VILI hinsichtlich Lungenschädigung und extrapulmonaler Organschädigung war bis dato nicht untersucht worden.

Die Neutralisation von C5a kann prinzipiell durch Antikörper erfolgen. Der bereits klinisch zugelassene Antikörper Eculizumab, der C5 bindet, wird eingesetzt zur Therapie der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie und des atypischen hämolytisch-urämischen Syndroms. Allerdings wird durch die Neutralisation von C5 auch die Bildung des antibakteriell wirksamen MAC inhibiert, so dass eine Therapie mit Eculizumab mit einem erhöhtem Risiko für die Infektion mit bekapselten Erregern wie Meningokokken einhergeht (108).

Daraus lässt sich ableiten, dass eine spezifische C5a Neutralisation, die nicht mit der Funktion des MAC interferiert, zu bevorzugen wäre. Um dies zu eruieren, wurde in der unter Punkt 2.4. zusammengefassten Arbeit ein neu entwickelter L-RNA Aptamer (Spiegelmer), der C5a potent neutralisiert, angewandt. L-RNA Aptamere sind aufgrund ihrer Chiralität biologisch sehr gut tolerabel und man vermeidet das Risiko anaphylaktischer Reaktionen, die bei der Infusion von Antikörpern, die letztendlich immer immunogene Fremdprotein darstellen, auftreten können (109,110).

Mittels dieses L-RNA Aptamers wurde die Rolle von C5a im Pneumonieassoziierten Lungenversagen, auch unter Einbeziehung von VILI untersucht.

In der unter Punkt 2.4. zusammengefassten Studie wurde nachgewiesen, dass C5a sowohl bei Menschen als auch in den Versuchstieren mit schwerer ambulant erworbener Pneumonie erhöht ist.

Die Neutralisation von C5a in Mausmodellen der schweren Pneumokokkenpneumonie und auch in dem oben diskutierten Kombinationsmodell von schwerer Pneumokokkenpneumonie und Beatmung schützte eindrücklich vor endothelialer Barriervedysfunktion und septischer Leberschädigung (111).

Trotz der beschriebenen pro-inflammatorischen Eigenschaften von C5a hatte dessen Neutralisierung keinen Effekt auf die lokale und systemische Entzündungsreaktion. Daraus lässt sich folgern, dass die Neutralisation von C5a direkt schädigende Wirkungen von C5a z. B. am Endothel unterbunden haben könnte, und somit zur Stabilisierung der endothelialen Barrierefunktion beigetragen hat. Allerdings war die hier unter Punkt 2.4. zusammengefasste Studie explizit nicht darauf ausgelegt, die exakten Mechanismen der protektiven Effekte zu eruieren, so dass dies im Detail erst in weiterführenden Untersuchungen zu klären ist.

In der Arbeit wurde darüber hinaus geprüft, ob C5a eine Rolle als Biomarker zur Risikostratifizierung und Prognose von Patienten mit schwerer ambulant erworbener Pneumonie haben könnte. Dafür wurden aus einer longitudinalen Registerstudie klinische Daten von Patientinnen und Patienten mit Pneumonie mit deren Plasma C5a Spiegel korreliert. Es ergab sich zwar eine positive Korrelation zwischen C5a Spiegel und CRP sowie IL-6 Spiegel bei Hospitalisierung der Betroffenen, dies erlaubte jedoch keine Diskrimination zwischen Schweregraden der Pneumonie oder Markern für Organdysfunktion. Somit muss vor dem Hintergrund der aktuell vorliegenden Daten und Studien geschlossen werden, dass C5a keinen praktischen Wert als Biomarker bei der ambulant erworbenen Pneumonie hat.

Aktuell wird der spezifische, C5a neutralisierende Antikörper Vilobelimab in einer klinischen Phase 3 Studie auf seine Wirksamkeit beim COVID-19 assoziierten Lungenversagen untersucht. Präklinische Daten und Ergebnisse der Phase 2 Studie sind vielversprechend. So zeigt sich ein Trend zur Reduktion der Mortalität im COVID-19 assoziierten Lungenversagen unter Therapie mit Vilobelimab und Vilobelimab zeigte protektive Wirkung in Primaten mit Influenza assoziierter sowie toxischer Lungenschädigung (106,112–114).

Vor dem Hintergrund der aktuell vorliegenden präklinischen und klinischen Daten aus der hier zusammengefassten Studie und anderen Untersuchungen könnte die Neutralisation von C5a ein interessantes neues adjuvantes Therapiekonzept des ARDS und ggf. auch der schweren Sepsis sein.

3.2.4. Einfluss des I:E Verhältnisses bei maschineller Beatmung auf die Entwicklung von VILI

Wie bereits ausgeführt ist die lungenprotektive Beatmung das Fundament der Therapie von ARDS Patient:innen. Die Eckpfeiler lungenprotektiver Beatmung stellen die Limitation von Tidalvolumina auf maximal 6 ml/kg Körpergewicht, die Vermeidung von inspiratorischen Plateaudrücken > 30 cmH₂O und bei schwerem Lungenversagen die Anwendung hoher positiver endexpiratorischer Drücke (PEEP) dar.

Experimentelle Studien legen nahe, dass nicht die absoluten Beatmungsdrücke, sondern die dabei entstehenden transpulmonalen Drücke und die Verformung des Organs relevant sind (5). Der transpulmonale Druck wird in der Literatur auch als Lung Stress bezeichnet. Auch das Tidalvolumen scheint in seinem Verhältnis zur aktuellen funktionellen Residualkapazität besser beurteilt zu sein als das absolute Tidalvolumen. Das Verhältnis von Tidalvolumen zur funktionellen Residualkapazität wird abgeleitet aus der Materialforschung als Verformung - Lung Strain bezeichnet (115).

Beim ARDS kommt es zu einem Abfall der funktionellen Residualkapazität durch Konsolidierungen und Atelektasen, die sich aufgrund hoher Oberflächenspannungen in den Alveolen unter Beatmung teilweise nicht eröffnen lassen. Mit zunehmender Schwere des ARDS sinkt die FRC ab. Es verbleibt also nur ein im Verhältnis zum Gesunden kleiner Anteil ventilierbaren Lungenvolumens. Man spricht auch von der Baby Lung des ARDS. Folglich kann also auch bei der Beatmung mit einem niedrigen Tidalvolumen von 6 ml/kg der Lung Strain bei abfallender FRC in einen kritischen Bereich ansteigen – auch niedrige Tidalvolumina das ARDS durch VILI aggravieren (58).

Vor diesem Hintergrund ist es von Interesse, ob über die bekannten Parameter Tidalvolumen, Plateaudruck und PEEP hinaus weitere Parameter der Beatmung Einfluss auf VILI haben könnten. Diese könnten aufgrund nach dem Baby Lung Konzepts insbesondere im schweren ARDS Relevanz haben.

In der hier unter 2.5. zusammengefassten Arbeit wurde der Einfluss der Inspirationszeit und damit verbunden des I:E Verhältnis und VILI untersucht. In einem ausgesprochen gut standardisierten Mausmodell des VILI wurde in Mäusen durch die Beatmung mit hohen Tidalvolumina VILI in moderatem Ausmaß ausgelöst. Mäuse wurden dabei mit einem I:E Verhältnis von 1:2 beatmet. In einer

Vergleichsgruppe wurde das I:E Verhältnis auf 1:1 eingestellt, woraus eine längere inspiratorische Plateauzeit bei identischem inspiratorischem Atemgasfluss und Atemfrequenz resultierte. In der Gruppe mit einem I:E Verhältnis von 1:2 kam es zu einem signifikant schwereren Lungenschaden im Vergleich zu den Tieren die mit einem I:E von 1:2 beatmet wurden. Tiere der 1:1 Gruppe wiesen eine signifikant schlechtere Oxygenierungsfähigkeit, eine verschlechterte Lungenmechanik, sehr viel höhere pulmonale Permeabilität, mehr pulmonale und systemische Entzündungsreaktion und histologisch ausgeprägteren diffusen alveolären Schaden auf.

Diese Ergebnisse belegen einen potentiellen Einfluss des I:E Verhältnis auf die Entwicklung von VILI. Bemerkenswert ist, dass in diesem Experiment das Tidalvolumen und der maximale Beatmungsdruck in beiden Gruppen identisch war. Somit sind auch Lung Stress und Strain in den Gruppen als identisch anzunehmen. Unterschiedlich war aber die Zeit, in der die Lunge dem maximalen Lung Stress/Strain ausgesetzt war. Daraus ließe sich ableiten, dass neben absoluten Werten auch das Produkt von Stress bzw. Strain und der Zeit in der diese wirken Relevanz für die Genese von VILI haben.

Diese Hypothese gilt es in weitergehenden Untersuchungen zu prüfen. Andere Autoren postulieren das mechanischen Energie durch Beatmung in die ebenfalls das I:E Verhältnis eingeht als zentrale Determinante für VILI. Auch dies ist aktuell noch eine Hypothese, die aber ebenfalls weiter untersucht wird (116).

Zu aktuellem Zeitpunkt kann aber festgehalten werden, dass über Tidalvolmen und Beatmungsdruck hinaus weitere Beatmungsparameter wie die Inspirationszeit Einfluss auf VILI und somit auf das Outcome von ARDS Patient:innen haben könnten. Insbesondere relevant ist dies beim schweren ARDS zu erwarten und stellt eine Möglichkeit dar die Therapie von ARDS Patient:innen zu verbessern.

4. Zusammenfassung

Die Mortalität des akuten Lungenversagens ist auch nach vielen Dekaden experimenteller und klinischer Forschung weiterhin hoch. Auch in der aktuellen COVID-19 Pandemie wird deutlich, dass derzeit keine potenten adjuvanten Therapien neben der protektiven Beatmungstherapie verfügbar sind, die den Behandlungserfolg bei Patienten mit Akutem Respiratorischem Distress Syndrom (ARDS) verbessern. Die Beatmungsassoziierte Lungenschädigung (VILI; ventilator-induced lung injury) ist ein integraler Bestandteil des ARDS mit relevanten Einfluss auf Morbidität und Mortalität. Sowohl die Mechanismen des ARDS als auch des VILI sind mittlerweile sehr gut charakterisiert und die bekannten molekularen Mechanismen legen nahe, dass pharmakologische adjuvante Therapien im ARDS/VILI

wirksam sein können. In der Entwicklung potenzieller pharmakologischer adjuvanter Therapien sollte aber die komplexe Pathophysiologie des ARDS, einschließlich seiner Komponente VILI berücksichtigt werden. Explizit würde dies bedeuten, dass potenzielle pharmakologische Strategien in komplexen und möglichst realitätsnahen präklinischen Modellen getestet werden müssen. Diese Modelle sollten einen realistischen Auslöser für ein ARDS beinhalten, wie z. B. schwere Infektionen, und zum anderen auch den Einfluss von Beatmung auf die Lungenschädigung integrieren. Therapiestrategien, die in solchen Modellen noch protektive Effekte zeigen, haben mutmaßlich eine höhere Wahrscheinlichkeit, auch in weiterführenden klinischen Studien Effekte zu zeigen. In hier diskutierten Arbeiten wurde ein solches Modell exemplarisch vorgestellt, das bei allen Limitationen eines Kleintiermodells der komplexen Situation des ARDS nahekommt, indem eine etablierte schwere Pneumokokkenpneumonie mit einer Beatmungstherapie kombiniert wird. In dieser Arbeit wurden exemplarisch drei pharmakologische Therapiestrategien für das akute Lungenversagen vorgestellt von denen zwei im Tiermodell effektiv waren: Adrenomedullin und die Neutralisation von C5a. Adrenomedullin und die Neutralisation von C5a wurden auch in diesem Modell der durch Pneumonie und nachfolgendes VILI induzierten Lungenschädigung mit guter Effektivität getestet.

Sowohl Adrenomedullin, als auch die C5a Neutralisation werden derzeit in klinischen Studien bei ARDS und Sepsis untersucht.

Neben adjuvanten pharmakologischen Interventionen könnten vor dem Hintergrund der Mechanismen der Mechanotransduktion auch subtile Veränderungen von Beatmungsparametern Einfluss auf den Krankheitsverlauf von ARDS Patient:innen haben. Hier wurde diesbezüglich eine Arbeit diskutiert, in der die Verlängerung der Inspirationszeit bei gleicher Atemfrequenz, Plateaudrücken, PEEP und Tidalvolumen zur Aggravierung von VILI führt. Dies legt nahe, dass nicht nur die absolute Höhe der Beatmungsdrücke im VILI und der damit verbundene Lung Stress und Lung Strain sondern auch die zeitliche Dauer der Exposition des Organs demgegenüber relevant sein könnte. Obwohl daraus noch keine definitiven Schlüsse auf die Auswirkung bei Patienten gezogen werden können, rechtfertigen die Ergebnisse weitergehende Untersuchungen.

5. Literaturangaben

1. Matthay MA, Zemans RL, Zimmerman GA, Arabi YM, Beitler JR, Mercat A, u. a. Acute respiratory distress syndrome. *Nat Rev Dis Primer*. 14. März 2019;5(1):18.
2. ARDS Definition Task Force, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, u. a. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*. 20. Juni 2012;307(23):2526–33.
3. Slutsky AS, Ranieri VM. Ventilator-induced lung injury. *N Engl J Med*. 28. November 2013;369(22):2126–36.
4. Webb HH, Tierney DF. Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. November 1974;110(5):556–65.
5. Dreyfuss D, Soler P, Basset G, Saumon G. High inflation pressure pulmonary edema. Respective effects of high airway pressure, high tidal volume, and positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*. Mai 1988;137(5):1159–64.
6. Amato MB, Barbas CS, Medeiros DM, Magaldi RB, Schettino GP, Lorenzi-Filho G, u. a. Effect of a protective-ventilation strategy on mortality in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 5. Februar 1998;338(6):347–54.
7. 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*. 4. Mai 2000;342(18):1301–8.
8. Fan E, Del Sorbo L, Goligher EC, Hodgson CL, Munshi L, Walkey AJ, u. a. An Official American Thoracic Society/European Society of Intensive Care Medicine/Society of Critical Care Medicine Clinical Practice Guideline: Mechanical Ventilation in Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 1. Mai 2017;195(9):1253–63.
9. Tremblay LN, Slutsky AS. Ventilator-induced injury: from barotrauma to biotrauma. *Proc Assoc Am Physicians*. Dezember 1998;110(6):482–8.
10. Cabrera-Benitez NE, Laffey JG, Parotto M, Spieth PM, Villar J, Zhang H, u. a. Mechanical Ventilation–associated Lung Fibrosis in Acute Respiratory Distress Syndrome: A Significant Contributor to Poor Outcome. *Anesthesiology*. Juli 2014;121(1):189–98.
11. Imai Y, Parodo J, Kajikawa O, de Perrot M, Fischer S, Edwards V, u. a. Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome. *JAMA*. 23. April 2003;289(16):2104–12.
12. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, u. a. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA*. 7. Juli 1999;282(1):54–61.
13. Ranieri VM, Giunta F, Suter PM, Slutsky AS. Mechanical ventilation as a mediator of multisystem organ failure in acute respiratory distress syndrome. *JAMA*. 5. Juli 2000;284(1):43–4.

14. Pugin J. Molecular mechanisms of lung cell activation induced by cyclic stretch. *Crit Care Med.* April 2003;31(4 Suppl):S200-206.
15. Damarla M, Hasan E, Boueiz A, Le A, Pae HH, Montouchet C, u. a. Mitogen activated protein kinase activated protein kinase 2 regulates actin polymerization and vascular leak in ventilator associated lung injury. *PLoS One.* 2009;4(2):e4600.
16. Dolinay T, Wu W, Kaminski N, Ifedigbo E, Kaynar AM, Szilasi M, u. a. Mitogen-activated protein kinases regulate susceptibility to ventilator-induced lung injury. *PLoS One.* 2008;3(2):e1601.
17. Li L-F, Liao S-K, Ko Y-S, Lee C-H, Quinn DA. Hyperoxia increases ventilator-induced lung injury via mitogen-activated protein kinases: a prospective, controlled animal experiment. *Crit Care Lond Engl.* 2007;11(1):R25.
18. Iwaki M, Ito S, Morioka M, Iwata S, Numaguchi Y, Ishii M, u. a. Mechanical stretch enhances IL-8 production in pulmonary microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 20. November 2009;389(3):531–6.
19. Copland IB, Post M. Stretch-activated signaling pathways responsible for early response gene expression in fetal lung epithelial cells. *J Cell Physiol.* Januar 2007;210(1):133–43.
20. Hamanaka K, Jian M-Y, Weber DS, Alvarez DF, Townsley MI, Al-Mehdi AB, u. a. TRPV4 initiates the acute calcium-dependent permeability increase during ventilator-induced lung injury in isolated mouse lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Oktober 2007;293(4):L923-932.
21. Hamanaka K, Jian M-Y, Townsley MI, King JA, Liedtke W, Weber DS, u. a. TRPV4 channels augment macrophage activation and ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* September 2010;299(3):L353-362.
22. Jurek SC, Hirano-Kobayashi M, Chiang H, Kohane DS, Matthews BD. Prevention of ventilator-induced lung edema by inhalation of nanoparticles releasing ruthenium red. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Juni 2014;50(6):1107–17.
23. Woods SJ, Waite AAC, O’Dea KP, Halford P, Takata M, Wilson MR. Kinetic profiling of in vivo lung cellular inflammatory responses to mechanical ventilation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1. Mai 2015;308(9):L912-921.
24. Verbrugge SJC, Lachmann B, Kesecioglu J. Lung protective ventilatory strategies in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: from experimental findings to clinical application. *Clin Physiol Funct Imaging.* März 2007;27(2):67–90.
25. Seybold J, Thomas D, Witzernath M, Boral S, Hocke AC, Bürger A, u. a. Tumor necrosis factor-alpha-dependent expression of phosphodiesterase 2: role in endothelial hyperpermeability. *Blood.* 1. Mai 2005;105(9):3569–76.
26. Frank JA, Pittet J-F, Wray C, Matthay MA. Protection from experimental ventilator-induced acute lung injury by IL-1 receptor blockade. *Thorax.* Februar 2008;63(2):147–53.

27. Bertok S, Wilson MR, Morley PJ, de Wildt R, Bayliffe A, Takata M. Selective inhibition of intra-alveolar p55 TNF receptor attenuates ventilator-induced lung injury. *Thorax*. März 2012;67(3):244–51.
28. Wilson MR, Goddard ME, O’Dea KP, Choudhury S, Takata M. Differential roles of p55 and p75 tumor necrosis factor receptors on stretch-induced pulmonary edema in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. Juli 2007;293(1):L60-68.
29. Wilson MR, Choudhury S, Takata M. Pulmonary inflammation induced by high-stretch ventilation is mediated by tumor necrosis factor signaling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. April 2005;288(4):L599-607.
30. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Londhe V, Xue YY, Li K, u. a. Critical role for CXCR2 and CXCR2 ligands during the pathogenesis of ventilator-induced lung injury. *J Clin Invest*. Dezember 2002;110(11):1703–16.
31. Tolle LB, Standiford TJ. Danger-associated molecular patterns (DAMPs) in acute lung injury. *J Pathol*. Januar 2013;229(2):145–56.
32. Kuipers MT, van der Poll T, Schultz MJ, Wieland CW. Bench-to-bedside review: Damage-associated molecular patterns in the onset of ventilator-induced lung injury. *Crit Care Lond Engl*. 2011;15(6):235.
33. Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 15. Juni 2010;181(12):1294–309.
34. Kuipers MT, Aslami H, Vlaar APJ, Juffermans NP, Tuip-de Boer AM, Hegeman MA, u. a. Pre-treatment with allopurinol or uricase attenuates barrier dysfunction but not inflammation during murine ventilator-induced lung injury. *PloS One*. 2012;7(11):e50559.
35. Ogawa EN, Ishizaka A, Tasaka S, Koh H, Ueno H, Amaya F, u. a. Contribution of high-mobility group box-1 to the development of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 15. August 2006;174(4):400–7.
36. Imai Y, Kuba K, Neely GG, Yaghubian-Malhami R, Perkmann T, van Loo G, u. a. Identification of oxidative stress and Toll-like receptor 4 signaling as a key pathway of acute lung injury. *Cell*. 18. April 2008;133(2):235–49.
37. Kawano T, Mori S, Cybulsky M, Burger R, Ballin A, Cutz E, u. a. Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *J Appl Physiol Bethesda Md* 1985. Januar 1987;62(1):27–33.
38. Choudhury S, Wilson MR, Goddard ME, O’Dea KP, Takata M. Mechanisms of early pulmonary neutrophil sequestration in ventilator-induced lung injury in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. November 2004;287(5):L902-910.
39. Wilson MR, O’Dea KP, Zhang D, Shearman AD, van Rooijen N, Takata M. Role of lung-margined monocytes in an in vivo mouse model of ventilator-induced lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 15. Mai 2009;179(10):914–22.

40. Eyal FG, Hamm CR, Parker JC. Reduction in alveolar macrophages attenuates acute ventilator induced lung injury in rats. *Intensive Care Med.* Juli 2007;33(7):1212–8.
41. Frank JA, Wray CM, McAuley DF, Schwendener R, Matthay MA. Alveolar macrophages contribute to alveolar barrier dysfunction in ventilator-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Dezember 2006;291(6):L1191-1198.
42. Matthay MA, Zemans RL. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:147–63.
43. Müller-Redetzky HC, Suttorp N, Witzenrath M. Dynamics of pulmonary endothelial barrier function in acute inflammation: mechanisms and therapeutic perspectives. *Cell Tissue Res.* März 2014;355(3):657–73.
44. McVerry BJ, Peng X, Hassoun PM, Sammani S, Simon BA, Garcia JGN. Sphingosine 1-phosphate reduces vascular leak in murine and canine models of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1. November 2004;170(9):987–93.
45. Müller HC, Witzenrath M, Tschernig T, Gutbier B, Hippenstiel S, Santel A, u. a. Adrenomedullin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Thorax.* Dezember 2010;65(12):1077–84.
46. Müller HC, Hellwig K, Rosseau S, Tschernig T, Schmiedl A, Gutbier B, u. a. Simvastatin attenuates ventilator-induced lung injury in mice. *Crit Care Lond Engl.* 2010;14(4):R143.
47. Dhanireddy S, Altemeier WA, Matute-Bello G, O’Mahony DS, Glenn RW, Martin TR, u. a. Mechanical ventilation induces inflammation, lung injury, and extra-pulmonary organ dysfunction in experimental pneumonia. *Lab Invest J Tech Methods Pathol.* August 2006;86(8):790–9.
48. O’Mahony DS, Liles WC, Altemeier WA, Dhanireddy S, Frevert CW, Liggitt D, u. a. Mechanical ventilation interacts with endotoxemia to induce extrapulmonary organ dysfunction. *Crit Care Lond Engl.* 2006;10(5):R136.
49. Crimi E, Zhang H, Han RNN, Del Sorbo L, Ranieri VM, Slutsky AS. Ischemia and reperfusion increases susceptibility to ventilator-induced lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 15. Juli 2006;174(2):178–86.
50. Sinclair SE, Altemeier WA, Matute-Bello G, Chi EY. Augmented lung injury due to interaction between hyperoxia and mechanical ventilation. *Crit Care Med.* Dezember 2004;32(12):2496–501.
51. Martin C, Papazian L, Payan MJ, Saux P, Gouin F. Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. *Chest.* Januar 1995;107(1):196–200.
52. Cabrera-Benítez NE, Parotto M, Post M, Han B, Spieth PM, Cheng W-E, u. a. Mechanical stress induces lung fibrosis by epithelial–mesenchymal transition*: *Crit Care Med.* Februar 2012;40(2):510–7.
53. Villar J, Cabrera NE, Valladares F, Casula M, Flores C, Blanch L, u. a. Activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway by mechanical ventilation is associated with ventilator-induced pulmonary fibrosis in healthy lungs. *PloS One.* 2011;6(9):e23914.

54. Villar J, Cabrera NE, Casula M, Valladares F, Flores C, López-Aguilar J, u. a. WNT/ β -catenin signaling is modulated by mechanical ventilation in an experimental model of acute lung injury. *Intensive Care Med.* Juli 2011;37(7):1201–9.
55. Villar J, Cabrera-Benítez NE, Valladares F, García-Hernández S, Ramos-Nuez Á, Martín-Barrasa J, u. a. Tryptase is involved in the development of early ventilator-induced pulmonary fibrosis in sepsis-induced lung injury. *Crit Care Lond Engl.* 2015;19:138.
56. Wilcox ME, Patsios D, Murphy G, Kudlow P, Paul N, Tansey CM, u. a. Radiologic Outcomes at 5 Years After Severe ARDS. *CHEST J.* 1. April 2013;143(4):920.
57. Herridge MS, Tansey CM, Matté A, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Cooper A, u. a. Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 7. April 2011;364(14):1293–304.
58. Gattinoni L, Pesenti A. The concept of “baby lung”. *Intensive Care Med.* Juni 2005;31(6):776–84.
59. Hegeman MA, Hennis MP, Cobelens PM, Kavelaars A, Jansen NJG, Schultz MJ, u. a. Dexamethasone Attenuates VEGF Expression and Inflammation but Not Barrier Dysfunction in a Murine Model of Ventilator–Induced Lung Injury. *Gaggar A, Herausgeber. PLoS ONE.* 25. Februar 2013;8(2):e57374.
60. Ward NS, Casserly B, Ayala A. The compensatory anti-inflammatory response syndrome (CARS) in critically ill patients. *Clin Chest Med.* Dezember 2008;29(4):617–25, viii.
61. Frazier WJ, Hall MW. Immunoparalysis and adverse outcomes from critical illness. *Pediatr Clin North Am.* Juni 2008;55(3):647–68, xi.
62. Matthay MA, Zimmerman GA. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Oktober 2005;33(4):319–27.
63. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest.* August 2012;122(8):2731–40.
64. Brell B, Temmesfeld-Wollbrück B, Altschner I, Frisch E, Schmeck B, Hocke AC, u. a. Adrenomedullin reduces Staphylococcus aureus alpha-toxin-induced rat ileum microcirculatory damage. *Crit Care Med.* April 2005;33(4):819–26.
65. Hocke AC, Temmesfeld-Wollbrueck B, Schmeck B, Berger K, Frisch EM, Witzenrath M, u. a. Perturbation of endothelial junction proteins by Staphylococcus aureus alpha-toxin: inhibition of endothelial gap formation by adrenomedullin. *Histochem Cell Biol.* September 2006;126(3):305–16.
66. Brell B, Hippenstiel S, Dávid I, Pries AR, Habazettl H, Schmeck B, u. a. Adrenomedullin treatment abolishes ileal mucosal hypoperfusion induced by Staphylococcus aureus alpha-toxin--an intravital microscopic study on an isolated rat ileum. *Crit Care Med.* Dezember 2005;33(12):2810–2016.
67. Vincent JL, Moreno R, Takala J, Willatts S, De Mendonça A, Bruining H, u. a. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the

Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.* Juli 1996;22(7):707–10.

68. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet Lond Engl.* 12. August 1967;2(7511):319–23.
69. Briel M, Meade M, Mercat A, Brower RG, Talmor D, Walter SD, u. a. Higher vs lower positive end-expiratory pressure in patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis. *JAMA.* 3. März 2010;303(9):865–73.
70. Guérin C, Reignier J, Richard J-C, Beuret P, Gacouin A, Boulain T, u. a. Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 6. Juni 2013;368(23):2159–68.
71. Amato MBP, Meade MO, Slutsky AS, Brochard L, Costa ELV, Schoenfeld DA, u. a. Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 19. Februar 2015;372(8):747–55.
72. Natarajan V, Dudek SM, Jacobson JR, Moreno-Vinasco L, Huang LS, Abassi T, u. a. Sphingosine-1-phosphate, FTY720, and sphingosine-1-phosphate receptors in the pathobiology of acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* Juli 2013;49(1):6–17.
73. Wang L, Dudek SM. Regulation of vascular permeability by sphingosine 1-phosphate. *Microvasc Res.* Januar 2009;77(1):39–45.
74. Peng X, Hassoun PM, Sammani S, McVerry BJ, Burne MJ, Rabb H, u. a. Protective effects of sphingosine 1-phosphate in murine endotoxin-induced inflammatory lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 1. Juni 2004;169(11):1245–51.
75. Liu H-B, Cui N-Q, Wang Q, Li D-H, Xue X-P. Sphingosine-1-phosphate and its analogue FTY720 diminish acute pulmonary injury in rats with acute necrotizing pancreatitis. *Pancreas.* April 2008;36(3):e10-15.
76. Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology. *Pharmacol Ther.* Juli 2007;115(1):84–105.
77. Khatri B, Barkhof F, Comi G, Hartung H-P, Kappos L, Montalban X, u. a. Comparison of fingolimod with interferon beta-1a in relapsing-remitting multiple sclerosis: a randomised extension of the TRANSFORMS study. *Lancet Neurol.* Juni 2011;10(6):520–9.
78. Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, u. a. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 14. September 2006;355(11):1124–40.
79. Sanchez T, Skoura A, Wu MT, Casserly B, Harrington EO, Hla T. Induction of vascular permeability by the sphingosine-1-phosphate receptor-2 (S1P2R) and its downstream effectors ROCK and PTEN. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Juni 2007;27(6):1312–8.
80. Gutbier B, Schönrock SM, Ehrler C, Haberberger R, Dietert K, Gruber AD, u. a. Sphingosine Kinase 1 Regulates Inflammation and Contributes to Acute Lung Injury in Pneumococcal Pneumonia via the Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2. *Crit Care Med.* März 2018;46(3):e258–67.

81. Müller HC, Hocke AC, Hellwig K, Gutbier B, Peters H, Schönrock SM, u. a. The Sphingosine-1 Phosphate receptor agonist FTY720 dose dependently affected endothelial integrity in vitro and aggravated ventilator-induced lung injury in mice. *Pulm Pharmacol Ther.* August 2011;24(4):377–85.
82. Kovarik JM, Schmouder R, Barilla D, Riviere G-J, Wang Y, Hunt T. Multiple-dose FTY720: tolerability, pharmacokinetics, and lymphocyte responses in healthy subjects. *J Clin Pharmacol.* Mai 2004;44(5):532–7.
83. Kovarik JM, Schmouder RL, Serra D, Wang Y, Wiegand H, Dilzer SC, u. a. FTY720 pharmacokinetics in mild to moderate hepatic impairment. *J Clin Pharmacol.* April 2005;45(4):446–52.
84. Kovarik JM, Schmouder RL, Hartmann S, Riviere G-J, Picard F, Voss B, u. a. Fingolimod (FTY720) in severe hepatic impairment: pharmacokinetics and relationship to markers of liver function. *J Clin Pharmacol.* Februar 2006;46(2):149–56.
85. Kovarik JM, Dole K, Riviere G-J, Pommier F, Maton S, Jin Y, u. a. Ketoconazole increases fingolimod blood levels in a drug interaction via CYP4F2 inhibition. *J Clin Pharmacol.* Februar 2009;49(2):212–8.
86. Dudek SM, Camp SM, Chiang ET, Singleton PA, Usatyuk PV, Zhao Y, u. a. Pulmonary endothelial cell barrier enhancement by FTY720 does not require the S1P1 receptor. *Cell Signal.* August 2007;19(8):1754–64.
87. Temmesfeld-Wollbrück B, Hocke AC, Suttorp N, Hippenstiel S. Adrenomedullin and endothelial barrier function. *Thromb Haemost.* November 2007;98(5):944–51.
88. García-Ponce A, Chánez Paredes S, Castro Ochoa KF, Schnoor M. Regulation of endothelial and epithelial barrier functions by peptide hormones of the adrenomedullin family. *Tissue Barriers.* 2016;4(4):e1228439.
89. Temmesfeld-Wollbrück B, Brell B, zu Dohna C, Dorenberg M, Hocke AC, Martens H, u. a. Adrenomedullin reduces intestinal epithelial permeability in vivo and in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Juli 2009;297(1):G43-51.
90. Pfeil U, Aslam M, Paddenberg R, Quanz K, Chang CL, Park J-I, u. a. Intermedin/adrenomedullin-2 is a hypoxia-induced endothelial peptide that stabilizes pulmonary microvascular permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* November 2009;297(5):L837-845.
91. Körner C, Kuchenbuch T, Pfeil U, Jung K, Padberg W, Kummer W, u. a. Low-dose adrenomedullin-2/intermedin(8-47) reduces pulmonary ischemia/reperfusion injury. *Peptides.* Dezember 2014;62:49–54.
92. Yang J-H, Jia Y-X, Pan C-S, Zhao J, Ouyang M, Yang J, u. a. Effects of intermedin(1-53) on cardiac function and ischemia/reperfusion injury in isolated rat hearts. *Biochem Biophys Res Commun.* 18. Februar 2005;327(3):713–9.
93. Müller-Redetzky HC, Kummer W, Pfeil U, Hellwig K, Will D, Paddenberg R, u. a. Intermedin stabilized endothelial barrier function and attenuated ventilator-induced lung injury in mice. *PLoS One.* 2012;7(5):e35832.

94. Müller-Redetzky HC, Will D, Hellwig K, Kummer W, Tschernig T, Pfeil U, u. a. Mechanical ventilation drives pneumococcal pneumonia into lung injury and sepsis in mice: protection by adrenomedullin. *Crit Care Lond Engl.* 14. April 2014;18(2):R73.
95. Müller-Redetzky HC, Suttorp N, Witzenrath M. Dynamics of pulmonary endothelial barrier function in acute inflammation: mechanisms and therapeutic perspectives. *Cell Tissue Res.* März 2014;355(3):657–73.
96. Temmesfeld-Wollbrück B, Brell B, Dávid I, Dorenberg M, Adolphs J, Schmeck B, u. a. Adrenomedullin reduces vascular hyperpermeability and improves survival in rat septic shock. *Intensive Care Med.* April 2007;33(4):703–10.
97. Geven C, Bergmann A, Kox M, Pickkers P. Vascular Effects of Adrenomedullin and the Anti-Adrenomedullin Antibody Adrecizumab in Sepsis. *Shock Augusta Ga.* August 2018;50(2):132–40.
98. Blet A, Deniau B, Geven C, Sadoune M, Caillard A, Kounde P-R, u. a. Adrecizumab, a non-neutralizing anti-adrenomedullin antibody, improves haemodynamics and attenuates myocardial oxidative stress in septic rats. *Intensive Care Med Exp.* 15. Mai 2019;7(1):25.
99. Mollnes TE, Huber-Lang M. Complement in sepsis-when science meets clinics. *FEBS Lett.* August 2020;594(16):2621–32.
100. Rittirsch D, Flierl MA, Nadeau BA, Day DE, Huber-Lang M, Mackay CR, u. a. Functional roles for C5a receptors in sepsis. *Nat Med.* Mai 2008;14(5):551–7.
101. Laudes IJ, Chu JC, Sikranth S, Huber-Lang M, Guo R-F, Riedemann N, u. a. Anti-c5a ameliorates coagulation/fibrinolytic protein changes in a rat model of sepsis. *Am J Pathol.* Mai 2002;160(5):1867–75.
102. Halbgebauer R, Schmidt CQ, Karsten CM, Ignatius A, Huber-Lang M. Janus face of complement-driven neutrophil activation during sepsis. *Semin Immunol.* 14. Februar 2018;
103. Russkamp NF, Ruemmler R, Roewe J, Moore BB, Ward PA, Bosmann M. Experimental design of complement component 5a-induced acute lung injury (C5a-ALI): a role of CC-chemokine receptor type 5 during immune activation by anaphylatoxin. *FASEB J.* September 2015;29(9):3762–72.
104. Bosmann M, Haggadone MD, Zetoune FS, Sarma JV, Ward PA. The interaction between C5a and both C5aR and C5L2 receptors is required for production of G-CSF during acute inflammation: Molecular immunology. *Eur J Immunol.* Juli 2013;43(7):1907–13.
105. Jiang Y, Zhao G, Song N, Li P, Chen Y, Guo Y, u. a. Blockade of the C5a–C5aR axis alleviates lung damage in hDPP4-transgenic mice infected with MERS-CoV. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. Dezember 2018 [zitiert 16. Mai 2018];7(1). Verfügbar unter: <http://www.nature.com/articles/s41426-018-0063-8>
106. Sun S, Zhao G, Liu C, Fan W, Zhou X, Zeng L, u. a. Treatment With Anti-C5a Antibody Improves the Outcome of H7N9 Virus Infection in African Green Monkeys. *Clin Infect Dis.* 15. Februar 2015;60(4):586–95.

107. Yan C, Gao H. New insights for C5a and C5a receptors in sepsis. *Front Immunol.* 2012;3:368.
108. Matsumura Y. Risk Analysis of Eculizumab-Related Meningococcal Disease in Japan Using the Japanese Adverse Drug Event Report Database. *Drug Healthc Patient Saf.* 2020;12:207–15.
109. Vater A, Klussmann S. Turning mirror-image oligonucleotides into drugs: the evolution of Spiegelmer® therapeutics. *Drug Discov Today.* Januar 2015;20(1):147–55.
110. Yatime L, Maasch C, Hoehlig K, Klussmann S, Andersen GR, Vater A. Structural basis for the targeting of complement anaphylatoxin C5a using a mixed L-RNA/L-DNA aptamer. *Nat Commun.* 22. April 2015;6:6481.
111. Müller-Redetzky H, Kellermann U, Wienhold S-M, Gutbier B, Lienau J, Hellwig K, u. a. Neutralizing Complement C5a Protects Mice with Pneumococcal Pulmonary Sepsis. *Anesthesiology.* April 2020;132(4):795–807.
112. Vlaar APJ, de Bruin S, Busch M, Timmermans SAMEG, van Zeggeren IE, Koning R, u. a. Anti-C5a antibody IFX-1 (vilobelimab) treatment versus best supportive care for patients with severe COVID-19 (PANAMO): an exploratory, open-label, phase 2 randomised controlled trial. *Lancet Rheumatol.* Dezember 2020;2(12):e764–73.
113. Sun S, Zhao G, Liu C, Wu X, Guo Y, Yu H, u. a. Inhibition of complement activation alleviates acute lung injury induced by highly pathogenic avian influenza H5N1 virus infection. *Am J Respir Cell Mol Biol.* August 2013;49(2):221–30.
114. Sun S, Jiang Y, Wang R, Liu C, Liu X, Song N, u. a. Treatment of Paraquat-Induced Lung Injury With an Anti-C5a Antibody: Potential Clinical Application. *Crit Care Med.* Mai 2018;46(5):e419–25.
115. Chiumello D, Carlesso E, Cadringer P, Caironi P, Valenza F, Polli F, u. a. Lung Stress and Strain during Mechanical Ventilation for Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 15. August 2008;178(4):346–55.
116. Silva PL, Ball L, Rocco PRM, Pelosi P. Power to mechanical power to minimize ventilator-induced lung injury? *Intensive Care Med Exp.* 25. Juli 2019;7(Suppl 1):38.

6. Danksagung

So viele von Euch haben mich auf diesem Weg begleitet. Ihr habt mich motiviert, hattet Verständnis, habt mich angetrieben und Euch mit mir gefreut. Ohne Euch hätte ich diesen Weg nicht gehen wollen und auch schlicht nicht können. Danke Euch allen! Einigen von Euch möchte ich hier noch einmal persönlich danken.

Allen voran gilt mein Dank meiner wunderbaren Frau Claudia. Ohne Dein Verständnis, Deine bedingungslose Unterstützung und Dein Durchhaltevermögen wäre es schlichtweg nicht möglich gewesen, diese Aufgabe zum Abschluss zu bringen.

Aber sei gewiss Du, Lilly und Mattis seid das, was eigentlich wichtig ist.

Meinen Eltern und meinem Bruder Volker. Ihr seid mein Fundament, ohne Euch wäre ich nicht hier und das Leben nicht das was es ist! Ich hoffe es haben viele Menschen solche Eltern und Brüder!

Meinem Freund, Mentor und Chef Prof. Dr. Martin Witzernath gebührt ebenfalls mein großer Dank. Deine Begeisterung und Deine Kraft sind ansteckend und inspirierend! Danke für unseren gemeinsamen Weg!

Meinem ersten Chef Prof. Suttorp möchte ich für ein außerordentliches und unkonventionelles Umfeld danken, in dem ich mich wissenschaftlich und klinisch entwickeln durfte. Lieber Norbert – vielen Dank!

Bettina Temmesfeld-Wollbrück meiner wichtigsten Klinischen Lehrerin möchte ich ebenfalls von Herzen hier danken. Bettina, Du hast mir vorgelebt was Haltung in der Medizin heißt und ich hoffe, dass ich als Arzt und Lehrer diese Haltung weiterzugeben vermag.

Liebe Sandra, Jasmin, Katharina, Birgitt und Alexander, vielen Dank für Eure Unterstützung im Labor und in meinem klinischen Alltag. Vielen Dank für Eure Geduld und Euer Verständnis! Schön, dass es Euch gibt!

7. Erklärung

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

14.2.2022

Datum

Unterschrift