

**Aus dem Institut der Physiologie
des Fachbereichs Humanmedizin
der Charité Berlin**

Neue Therapiekonzepte bei der Behandlung des akuten Lungenschadens

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
am Fachbereich Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Nadine Klein geb. Zenner

Tierärztin

aus Köln

Berlin 2015

Journal-Nr.: 3788

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.- Prof. Dr. Jürgen Zentek
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Salah Amasheh
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang M. Kübler
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Babara Kohn

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus)

rats,
animal models,
lungs,
acute respiratory distress syndrome,
oleic acid

Tag der Promotion: 26-08-2015

I. Abkürzungsverzeichnis

A779	: D-Ala-Angiotensin-(1-7)
ACE	: Angiotensin-Konversionsenzym
ACE 2	: Angiotensin-Konversionsenzym 2
Ang-(1-7)	: Angiotensin-(1 – 7)
Ang I	: Angiotensin I
Ang II	: Angiotensin II
Agt	: Angiotensinogen
ALI	: <i>acute lung injury</i> , akuter Lungenschaden
AP	: <i>arterial pressure</i> , arterieller Druck
ARDS	: <i>acute respiratory distress syndrome</i> , akutes Atemnotsyndrom
AWP	: <i>airway pressure</i> , Atemwegsdruck
AT ₁	: Angiotensinrezeptor 1
AT _{1a}	: Angiotensinrezeptor 1a
AT ₂	: Angiotensinrezeptor 2
AT _{1b}	: Angiotensinrezeptor 1b
BAL	: bronchoalveoläre Lavage
D-Pro	: D-Pro ⁷ -Angiotensin-(1-7)
G	: Gramm
KG	: Körpergewicht
MOF	: <i>multi organ failure</i> , Multiorganversagen
paO ₂ /FiO ₂	: alveoläre Sauerstoffspannung/Sauerstoffanteil des eingeatmeten Gases
PAP	: pulmonary arterial pressure, Pulmonalarterieller Druck
PEEP	: <i>positive end-expiratory pressure</i> , positiv endexpiratorischer Druck
pCO ₂	: Kohlendioxidpartialdruck
PCWP	: pulmonary capillary wedge pressure, pulmonal-kapillärer Wedgedruck
PVR	: <i>pulmonary vascular resistance</i> , pulmonalvaskulärer Widerstand
TNF-α	: Tumornekrosefaktor-α
mmHg	: Statischer Druck, den 1 Millimeter einer Quecksilbersäule ausübt (133,322 Pa)
VILI	: <i>ventilator induced lung injury</i> , beatmungsinduzierter Lungenschaden

II. Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis	3
II.	Inhaltsverzeichnis	4
1	Einleitung	6
1.1	Der akute Lungenschaden	8
1.2	Das Akute Atemnotsyndrom.....	8
1.2.1	Ursachen und Risikofaktoren	9
1.2.2	Pathologie	10
1.2.3	Therapie des ARDS	11
1.3	Das „klassische“ Renin-Angiotensin-System.....	12
1.3.1	Von Angiotensinogen zu Angiotensin II	12
1.4	Das „neue“ Renin-Angiotensin-System	13
1.4.1	Die ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Achse	14
1.5	Ziel der Studie.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
2	Material und Methoden	18
2.1	Arbeitsgeräte.....	18
2.2	Verbrauchsmaterialien/Chemikalien.....	20
2.3	Präparationsbesteck	22
2.4	Versuchstiere	22
2.5	Narkose und Präparation der Versuchstiere.....	22
2.6	Versuchsgruppen.....	25
2.7	Versuchsprotokoll	29
2.8	Probenentnahme	29
2.8.1	Blutprobenentnahme	29
2.8.2	Bronchoalveoläre Lavage (BAL).....	29
2.8.3	Entnahme der Organe.....	30
2.9	Weiterverarbeitung der Proben	30
2.9.1	Bestimmung des Feucht /Trockengewichtsverhältnisses.....	30
2.9.2	Myeloperoxidasebestimmung.....	30
2.9.3	Proteinbestimmung aus der Lavageflüssigkeit.....	32
2.9.4	Statistik	32
3	Ergebnisse.....	33
3.1	Effekte von Angiotensin (1-7) und dem nichtpeptidischen Agonisten AVE0991 im Ölsäure-induzierten Lungenschaden.....	33
3.2	Mechanismus der von Ang-(1-7) vermittelten Regulation des Lungenschadens – Inhibition des Ang(1-7) Rezeptors Mas mit A779 und D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)	36

3.3	Blockade des AT ₁ -Rezeptors mit Irbesartan als alternativer Weg zur Verbesserung des ALI.....	39
4	Diskussion	41
4.1	Methodische Erwägungen.....	48
4.2	Veterinärmedizinische Relevanz	49
5	Zusammenfassung	51
6	Summary	53
7	Literatur.....	55
8	Publikationsliste	69
9	Danksagungen.....	70
10	Selbstständigkeitserklärung	71

1 Einleitung

1.1 *Ziele der Arbeit*

Die offensichtliche Diskrepanz zwischen der hohen Inzidenz und erheblichen Mortalität des ARDS einerseits, und des kompletten Fehlens pharmakologischer Interventionen mit nachgewiesenem Benefit andererseits beschäftigt seit Jahren die intensive Forschung mit der Suche nach neuen Therapieoptionen in diesem Bereich. In einer 2005 in *Nature* veröffentlichten Arbeit konnten Yumiko Imai und Mitarbeiter erstmals zeigen, dass das Angiotensin-Konversionsenzym, ACE2, welches Angiotensin II (Ang II) durch die Abspaltung einer Aminosäure in Angiotensin 1-7 (Ang-(1-7)) metabolisiert, Mäuse vor Säure-Aspirations- oder Sepsis-induziertem ALI zu schützen vermag (Imai et al., 2005). ACE2-defiziente Tiere wiesen einen stärkeren Lungenschaden auf, welcher durch rekombinantes ACE2 abgeschwächt werden konnte. Die Autoren führten diese Effekte auf die Tatsache zurück, dass ACE2 die Ang II-Konzentration reduziert und so die Aktivierung des Angiotensin-Typ1-Rezeptor (AT₁) vermindern könnte, weil ACE^{-/-} oder Angiotensin II Typ 1a Rezeptor (AT_{1a})-defiziente Tiere ebenfalls eine reduzierte Lungenschädigung aufwiesen. Somit scheint der AT_{1a}-Rezeptor in der Pathogenese des ALI eine entscheidende Rolle zu spielen. Alternativ lässt sich allerdings auch postulieren, dass die positiven Effekte von ACE2 (und gleichermaßen die einer AT_{1a}-Defizienz) auf eine vermehrte Bildung von Ang-(1-7) und die nachfolgende Aktivierung des MAS-Rezeptors zurückzuführen sein könnten. Zudem wurden in dieser Studie zum einen D-Pro⁷-Ang-(1-7) als MAS-Antagonist und zum anderen der Antagonist A779 verabreicht, da diese unterschiedliche Auswirkungen in der Blockade des MAS-Rezeptor aufwiesen und somit von Interesse war über welchen Mechanismus Ang-(1-7) protektiv wirkt beziehungsweise ob noch weitere Ang-(1-7) Rezeptoren existieren könnten. In einer Studie von Lautner et al. wurden ebenfalls unterschiedliche antagonistische Eigenschaften dieser beiden Inhibitoren beobachtet (Lautner et al., 2012).

In der vorliegenden Studie sollte deshalb am Rattenmodell des Ölsäure-induzierten akuten Lungenschadens untersucht werden, inwiefern das Heptapeptid Ang-(1-7) mögliche protektive Effekte im experimentellen Modell des akuten Lungenschadens aufweist, ob diese Effekte durch den Mas-Rezeptor oder alternative, postulierte Rezeptoren für Ang-(1-7) vermittelt werden, und inwieweit die von der Arbeitsgruppe Penninger berichteten positiven

Effekte einer Blockade des AT₁ Rezeptors mit Irbesartan möglicherweise auf eine vermehrte Aktivierung der Ang-(1-7)/Mas Achse zurückzuführen sein könnten (Penninger et al., 2008). Irbesartan ist ein Angiotensin-Rezeptor-Blocker und bewirkt ein Verdrängen von Ang II am AT₁ Rezeptor und besitzt ähnliche Wirkung wie ACE-Hemmer, die das Konversionsenzym hemmen aus Ang I AngII zu bilden.

(www.akdae.de/Stellungnahmen/weitere/20100802.pdf; Arzneimittelkommission der dt. Ärzteschaft (Fachausschuss der Bundesärztekammer))

Die Experimente sollten zeigen, ob durch die Applikation von exogenem Ang-(1-7) und AVE0991 die durch Ölsäure bedingte Entzündungsreaktion abgeschwächt wird und diese somit eine neue Therapieoption für die Behandlung des akuten Lungenschadens darstellt.

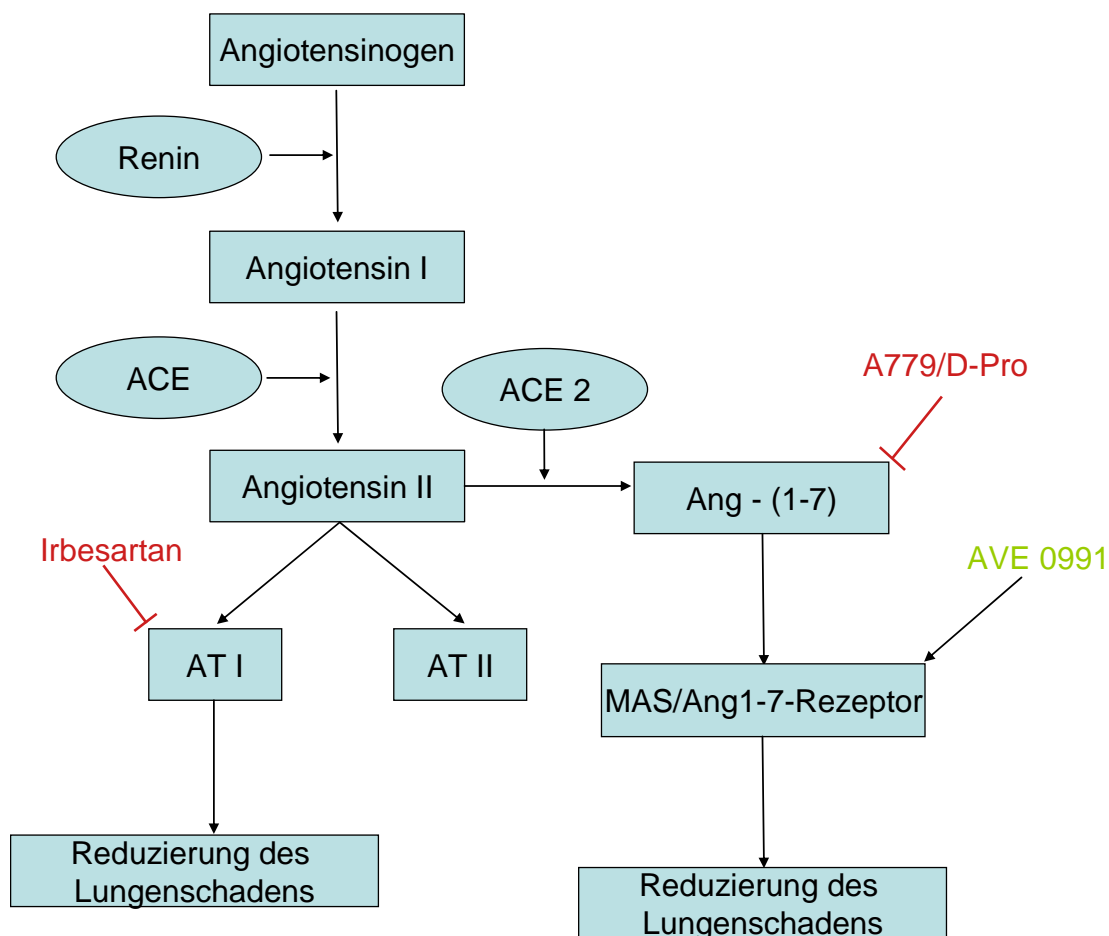


Abbildung 1: Die Abbildung zeigt die beiden Achsen des Renin-Angiotensin-Systems und in diesem Zusammenhang, wie eine Blockade des AT₁ Rezeptors durch Irbesartan zu einer Reduzierung des akuten Lungenschadens führt. Des Weiteren zeigt die Abbildung, dass eine Blockade durch die Angiotensin (1-7) Antagonisten A779 und D-Pro⁷-Ang-(1-7) zu einer verminderten Angiotensin (1-7) Produktion führt und dass AVE0991 an den MAS Rezeptor bindet und auf diesem Weg den akuten Lungenschaden reduziert.

2 Literaturübersicht

2.1 *Der akute Lungenschaden*

Die Definition des akuten Lungenversagens wurde auf der amerikanisch-europäischen Konsensuskonferenz 1994 festgelegt (Bernard et al., 1994). 2012 entwickelte eine Reihe von Experten die sogenannte Berlin-Definition, die sich nach Wahrscheinlichkeit, Validität und objektiver Einschätzung des Auftretens des ARDS richten (Ranieri et al., 2012). Eine Definition des akuten Atemnotsyndroms (ARDS) ist für die klinische Praxis notwendig, um die Prognose des Patienten möglichst realistisch einschätzen und ihn optimal therapieren zu können.

Sie unterscheidet nicht mehr zwei, sondern drei Schweregrade des ARDS, abhängig von der Schwere der Hypoxämie und unter Berücksichtigung der Respiratoreinstellung:

- schweres ARDS bei einem Quotienten von arteriellem Sauerstoffpartialdruck (PaO_2)/inspiratorischer Sauerstoffkonzentration (FIO_2) ≤ 100 mmHg, bei einem positiven endexpiratorischen Druck (PEEP) ≥ 5 cm H_2O ,
- moderates ARDS bei $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 = 101\text{--}200$ mmHg, bei PEEP ≥ 5 cm H_2O und
- mildes ARDS bei $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 = 201\text{--}300$ mmHg, bei PEEP ≥ 5 cm H_2O .

Die Bezeichnung akute Lungenschädigung (Acute Lung Injury, ALI) für die mildere Verlaufsform mit einem Oxygenierungsindex ≤ 300 mmHg entfällt in der neuen Definition (Ranieri et al., 2012).

2.2 *Das akute Atemnotsyndrom*

Der 1967 erstmalig von Ashbaugh et al. beschriebene Begriff ARDS beschreibt ein Syndrom bestehend aus charakteristischen klinischen Symptomen und pathophysiologischen Veränderungen, die den Eindruck eines uniformen Krankheitsgeschehens vermitteln. Neben dem Auftreten einer schweren Dyspnoe, Tachypnoe, generalisierter pulmonaler Inflammation und therapieresistenter Hypoxämie, ist der akute Lungenschaden radiologisch durch bilaterale, diffuse alveoläre Infiltrate gekennzeichnet. Die pathophysiologischen Merkmale des ARDS sind ein vergrößerter intrapulmonaler Rechts-Links-Shunt, ein Permeabilitätslungenödem, eine verminderte pulmonale *Compliance* und die pulmonalarterielle Hypertonie (Bernard et al., 1994).

Die angegebene Inzidenz des ARDS variiert je nach Studie. *Johnson et al.* beschrieben, dass die Inzidenz in den USA bei 200.000 Personen pro Jahr liegt. (Johnson et al., 2010) Meist tritt das akute Lungenversagen als Folge von oder in Zusammenhang mit begleitenden akuten Erkrankungen wie schwerer Malaria, Lungenembolie, Verbrauchskoagulopathie oder HELLP-Syndrom auf. Diese akuten Erkrankungen werden meist für die Entstehung des Lungenversagens verantwortlich gemacht. Die Letalität ist zwar auf Grund von Fortschritten der unterstützenden Therapie in den letzten Jahrzehnten gesunken, sie beträgt jedoch immer noch etwa 40 % und stellt somit ein persistierendes intensivmedizinisches Problem in der Humanmedizin dar (Johnson et al., 2010)

2.2.1 Ursachen und Risikofaktoren

Beim ARDS wird zwischen zwei verschiedenen Formen der Lungenschädigung unterschieden:

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Formen der Lungenschädigung

pulmonale, direkte Lungenschädigung	extrapulmonale, indirekte Lungenschädigung
<ul style="list-style-type: none"> - Inhalation toxischer Gase (Bsp. Rauchgas) und dadurch bedingtes Inhalationstrauma, toxisches Lungenödem - Inhalation von hyperbarem Sauerstoff - Pneumonie - Aspiration von Mageninhalt oder Salz- oder Süßwasser (Beinahe-Ertrinken) - Lungenkontusion - Fettembolie - Fruchtwasserembolie 	<ul style="list-style-type: none"> - Sepsis - schweres Trauma mit Schock („Schocklunge“) und mehrfache Bluttransfusion - Verbrennungen - akute Pankreatitis - Medikamente <p>sekundäre Faktoren wie:</p> <ul style="list-style-type: none"> - chronischer Alkoholabusus - chronische Lungenkrankheiten

(Internistische Intensivmedizin und Notfallmedizin; Weilemann, L.S.; Lorenz,J.; Voigtländer,Th. (Hrsg), 2011, XIV, 456 S.72 Abb., Hardcover, ISBN978-3642-1696-4)

Unter den oben aufgeführten Faktoren ist die Letalität der Patienten im Falle einer Sepsis aufgrund eines Multiorganversagens am häufigsten. Diese resultiert meist aus einer Pneumonie. Über den Blutkreislauf kommt es zur systemischen Ausbreitung. Proinflammatorische Zytokine wie beispielsweise Tumornekrosefaktor α (TNF α), sowie Interleukine triggern die Entzündungsreaktionen. Die Sterberate ist jedoch aufgrund von

verbesserten Behandlungsmöglichkeiten auf dem Gebiet der Sepsis und verbesserter Beatmungsstrategien gesunken (Abel et al., 1998).

2.2.2 Pathologie

Die pathologischen Konsequenzen von ALI und ARDS als gemeinsame Kennzeichen sind diffuse endotheliale und epitheliale Schäden, die zu einer zerstörten Lungenbarriere und einem proteinreichen alveolären Lungenödem führen (Ware et al., 2000).

Es kommt zu einer starken Entzündungsreaktion, die durch die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine sowie einer Ansammlung von Granulozyten, Monozyten und Thrombozyten im Lungeninterstitium und Alveolarraum gekennzeichnet ist.

Die Pathophysiologie des ARDS lässt sich in drei Phasen einteilen.

Die erste Phase lässt sich als exsudative Phase beschreiben, in der es innerhalb kürzester Zeit (Stunden) zur Schädigung des lungeneigenen Gefäßendothels und der Alveolarepithelzellen des Typs I kommt. Sie machen 90 Prozent der Oberfläche aber nur ca. 50 Prozent der Zellen aus. Durch das geschädigte Endothel wird die Wand zwischen den Alveolen und Blutbahn durchgängig für Makromoleküle wie z.B. Proteine und zellreiche Flüssigkeit tritt vermehrt aus den Kapillaren in das Interstitium. Es entwickelt sich ein proteinreiches interstitielles Ödem (zwischen Alveolar- und Kapillarwand). Klinisch erleidet der Patient in diesem Stadium eine Hyperventilation als Folge der Hypoxämie.

Die sich anschließende proliferative Phase lässt sich in eine frühe und späte Phase einteilen.

In der frühen Phase gehen Alveolarzellen des Typs II zugrunde, wodurch weniger Surfactant gebildet wird. Es kommt zum Alveolarödem und dann zur Verdünnung von Surfactant. Somit wird dieser inaktiv und es erfolgt ein Flüssigkeitsübertritt in die Alveolen (alveoläres Lungenödem). Die Lunge ist nicht in der Lage, die Flüssigkeit zu resorbieren, und die flüssigkeitsgefüllten Lungenbereiche vergrößern sich. Es kommt innerhalb der Alveolen und Alveolargänge zur Ausbildung hyaliner Membranen und in den Kapillaren finden sich Mikrothromben. Eine respiratorische Verschlechterung mit zunehmender Atemnot und einer nachvollziehbaren radiologischen Veränderung der Lunge (beidseitige fleckige, streifige Verdichtung) folgt.

Die Entzündung schreitet fort und es kommt in der späten proliferativen Phase zur Zerstörung von Pneumozyten. Es findet eine Proliferation von Fibroblasten statt und hyaline Membranen bilden sich aus, was letztendlich zur Lungenfibrose führt. Die Membran zwischen Alveole und Kapillare ist bis zum 5fachen verdickt. Diese fibrosierende Alveolitis kann schon in fünf Tagen nach der anfänglichen Verletzung durch klinische Untersuchungen nachweisbar werden. Es kommt zum Kollaps der Alveolen und somit zur Atelektasenbildung. Das Lungenvolumen wird dadurch reduziert und die Compliance herabgesetzt. Das aus dem

regionalen Alveolarkollaps resultierende Ungleichgewicht zwischen Ventilation und Perfusion erschwert die Atmung und führt zu einem intrapulmonalen Rechts-Links-Shunt. Dieses Stadium ist in der Regel irreversibel und hat oft einen tödlichen Verlauf. Wenn eine nachfolgende Wiederherstellung gelingt, kann die nun entstandene reduzierte physiologische Reserve zu einer höheren Empfänglichkeit für weitere Lungenverletzung führen. Es kommt zur Fibrose des geschädigten Lungengewebes. Eine pulmonale Hypertonie kann durch umfassende Mikrogefäßthrombosen entstehen. Klinisch besteht eine Globalinsuffizienz (Hypoxämie und Hyperkapnie, PaO_2 sinkt, PaCO_2 steigt, respiratorische Azidose) und es kommt zu einer weiteren radiologischen Veränderung in Form von beidseitigen Verschattungen.

(Intensive care unit, ARDS, <http://www.intesivcareunit.de/ards.html>)

2.2.3 Therapie des ARDS

Bisher ist nur eine symptomatische Therapie des ARDS möglich. Das Ziel einer ARDS Therapie sollte eine Aufrechterhaltung der suffizienten Oxygenierung sein und ein Fortschreiten der Lungenschädigung sollte vermieden werden. Zudem sollte der Schadensauslöser wie Pneumonie oder Sepsis behandelt werden.

Trotz einer großen Anzahl multizentrischer klinischer Studien zur Untersuchung pharmakologischer Behandlungsstrategien bei akutem Lungenschaden (ALI) und Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)-Patienten, einschließlich der Anwendung von Glukokortikoiden (Ware et al., 2000), Thromboxan-Synthetase Inhibitoren, Phosphodiesteraseinhibitoren (McAuley et al., 2005), Prostaglandin, inhaliertem Stickstoffmonoxid (NO) oder Surfactant (Ware et al., 2000; McAuley et al., 2005; Steinberg et al., 2006), konnte bisher keine der untersuchten pharmakologischen Interventionen in randomisierten, multizentrischen klinischen Doppelblindstudien eine Reduktion der Mortalität erzielen.

Lediglich die Implementierung lungenprotektiver Beatmungsstrategien mit kleinen Tidalvolumina von 6 ml/kg Körpergewicht (verglichen mit traditionell 12 ml/kg) konnte bislang eine Verbesserung des Überlebens von ARDS-Patienten erreichen (The Acute Respiratory Distress Syndrome Network (2000)).

2.3 **Das „klassische“ Renin-Angiotensin-System**

Erstmals wurde Renin durch Tigerstedt und Bergmann beschrieben (Tigerstedt & Bergmann, 1898) und von dieser Zeit an wurde das Renin-Angiotensin System (RAS) umfassend studiert. Viele Studien demonstrierten die Wichtigkeit des RAS für die Regulation von zentralen physiologischen Prozessen. Zu den wichtigsten Aufgaben gehören sowohl die Kurzzeit- als auch die Langzeitregulation des Blutdrucks und die Regulation des Salz- und Wasserhaushalts. Des Weiteren ist das RAS auch an der Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen und der endothelialen Reaktivität beteiligt (Peiró et al., 2007).

2.3.1 **Von Angiotensinogen zu Angiotensin II**

Das 'klassische' Renin Angiotensin System (Abb. 2) ist die Kaskade, die mit der Spaltung von Angiotensinogen (Agt), dem einzigen bekannten Ausgangsstoff für Angiotensinpeptide (Campbell et al., 2003), beginnt. Humanes Agt ist ein aus 452 Aminosäuren zusammengesetztes Glycoprotein, (Tewksbury et al., 1983) welches hauptsächlich in der Leber gebildet und in den Blutkreislauf sezerniert wird. (Abb. 2)

Das Renin wird im juxtaglomerulären Apparat der Niere und auch lokal in anderen Organen in niedriger Konzentration gebildet und spaltet das Prä-Prohormon Agt zum Decapeptid Angiotensin I. AngI wird durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) durch Abspalten der beiden C-terminalen Aminosäuren zu Angiotensin II (AngII) umgewandelt, (Corvol et al., 1997) welches dann mit den beiden Angiotensin II-Rezeptorsubtypen AT₁ (AT₁) und AT₂ (AT₂) interagiert.

Bei ACE handelt es sich um eine Zinkmetallopeptidase, welche außer AngI eine große Auswahl an Peptiden katalysiert wie z. B. auch den Vasodilatator Bradykinin (Skidgel et al., 1985; Turner et al., 2002; Yang et al., 1970).

AngII kann auch unabhängig von ACE gebildet werden; die Chymotrypsin-ähnliche Serinprotease Chymase kann AngII aus AngI generieren (Bacani et al., 2006). Bis heute ist die physiologische Rolle der chymaseabhängigen AngII-Produktion unklar, aber unter pathophysiologischen Bedingungen scheint die Chymase eine wichtige Rolle zu spielen (Doggrell et al., 2004).

AngII reguliert hauptsächlich den Blutdruck und den Wasserhaushalt (Timmermans et al., 1993) und stimuliert außerdem das Zellwachstum und die Proliferation (Huckle et al., 1994).

Die beiden bekannten Rezeptoren für Ang II sind wie oben bereits erwähnt der AT₁ und der AT₂ Rezeptor. In Nagetieren kommt der AT₁-Rezeptor in zwei verschiedenen Subtypen (AT_{1a} und AT_{1b}) vor. (Premer et al., 2013). Die meisten bekannten physiologischen Effekte von AngII werden durch AT₁ vermittelt wie z.B. die Regulation des Blutdrucks, des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes und die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion.

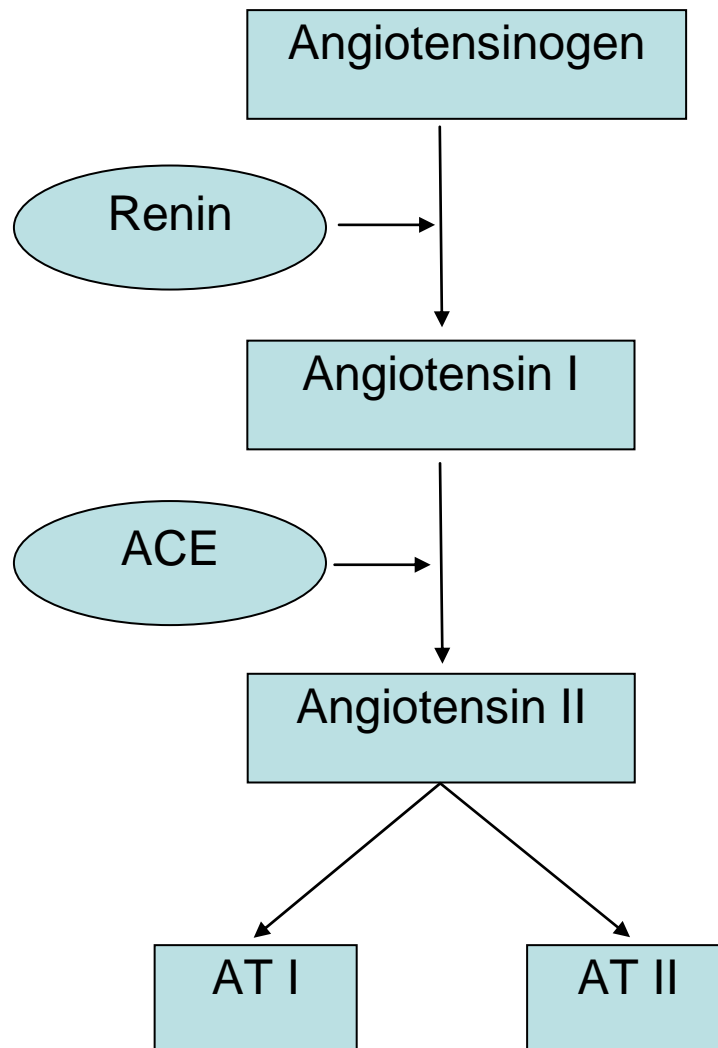


Abbildung 2: Angiotensinogen wird durch die Protease Renin zu Angiotensin abgebaut. Das Enzym (ACE) wandelt Angiotensin I in Angiotensin II um. Angiotensin II bindet an die zwei Rezeptortypen AT₁ und AT₂.

2.4 Das „neue“ Renin-Angiotensin-System

Aufgrund einiger später entdeckter wissenschaftlicher Erkenntnisse ist das „klassische“ Konzept des RAS erweitert worden. Der Fokus wurde zusätzlich auf ein organspezifisches RAS gelenkt (Danser et al., 2003; Goossens et al., 2007; Haller et al., 2006; Leung et al., 2005; Paul et al., 2006; Sakai et al., 2005). Es gibt außerdem Erkenntnisse über ein intrazelluläres RAS, welches somit nicht nur endokrin, sondern auch parakrin und intrakrin existiert (Kumar et al., 2007).

Neue Untersuchungen haben gezeigt, dass das RAS komplexer ist, als angenommen wurde. Neben Ang II zeigen kürzere Abschnitte von Ang II, nämlich Ang III, (Zini et al., 1996) Ang IV, (Chai et al., 2004; Kerins et al., 1995) und Ang-(1-7) (Ardaillou et al., 1997; Ferrario et al., 2004; Ferrario et al., 1998) ebenfalls eine starke biologische Aktivität.

Angiotensin III

Das Heptapeptid Ang III wird durch die Spaltung von Ang II durch die Aminopeptidase A (APA) erzeugt. Es bindet und erzeugt seine Effekte wie Ang II über AT₁ und AT₂ (Wright et al., 1997). Während Ang II das wichtigste Peptid des RAS ist, wird diskutiert, dass Ang III der Haupteffektor des RAS im Gehirn (Wright et al., 1997; Wright et al., 2003) sein könnte.

Angiotensin IV

Aus Ang III wird durch die Aminopeptidase N (APN) das Hexapeptid Ang IV (Ardaillou et al., 1997) gebildet. Ang IV kann AT₁ stimulieren und führt zur Vasokonstriktion durch denselben Mechanismus wie Ang II, (Lochard et al., 2004), allerdings in einem kleineren Ausmaß (Gembardt et al., 2008). Außer diesen AT₁-abhängigen Effekten konnte gezeigt werden, dass AngIV auch unabhängig von AT₁ und AT₂ Effekte vermitteln kann (Stragier et al., 2008). Die *Insulin responsive Aminopeptidase* (IRAP) ist als potentieller AngIV-Rezeptor (Albiston et al., 2001) identifiziert worden und hemmt die enzymatische Tätigkeit von IRAP. Die Hemmung von IRAP durch AngIV kann zur Anhäufung anderer Substrate von IRAP führen, wie z.B. Vasopressin, Substanz P, und Somatostatin. Diese Peptide spielen eine wichtige Rolle in kognitiven Prozessen (Alescio-Lautier et al., 2000; Matsouko et al., 1995) und könnten der Grund für die starken Effekten des Ang IV im Zentralnervensystem, wie z.B. Gedächtnisspeicherungs- und antiepileptische Effekte sein, die sich nach der Applikation von AngIV intracerebroventrikulär (i.c.v.) beobachten lassen (Stragier et al., 2008).

2.4.1 Die ACE2/Angiotensin-(1-7)/Mas Achse

In dieser Forschungsarbeit lag das Hauptaugenmerk auf dieser Achse des Ang-(1-7) Mas Systems. Neben seiner Rolle als Enzym zur Erzeugung verschiedener Angiotensinpeptide hat ACE2 einen starken Einfluss auf die Entwicklung des ARDS (Imai et al., 2005) und in diesem Zusammenhang war es von besonderem Interesse, über welche Rezeptorinteraktionen dies geschieht (Abb.3).

Das Heptapeptid Ang-(1-7) kann durch die Spaltung von Ang I oder Ang II mit Hilfe einer Vielzahl von Enzymen generiert werden (Donoghue et al., 2000; Rice et al., 2004; Santos et al., 1992; Tan et al., 1993; Tipnis et al., 2000; Vickers et al., 2002; Yamamoto et al., 1992;

Trask et al., 2007). Bis heute wird von zwei Hauptwegen für die Ang-(1-7) Bildung ausgegangen:

- 1) die Spaltung von Ang I durch die neutrale Endopeptidase (NEP, neprilysin) (Ardaillou et al., 1997) und
- 2) die Spaltung von Ang II durch das ACE-Homolog ACE2 (Trask et al., 2007).

NEP ist ein membrangebundenes (Typ-II) Metalloenzym und im Körper weit verbreitet. Anhand von spezifischen Inhibitoren (Bevan et al., 1992) und mit Hilfe von gendefizienten Mäusen (Lu et al., 1995) konnten schon viele biochemische und physiologische Eigenschaften dieser Peptidase im Detail beschrieben werden, wie zum Beispiel die Abspaltung des Ang-(1-7) von Ang I. Das kürzlich entdeckte ACE Homolog ACE2 (Donoghue et al., 2000; Tipnis et al., 2000) ist ein wichtiger Teil des RAS, der der Funktion des ACE entgegenwirken kann, indem es eine Aminosäure von Ang II abspaltet und somit Ang-(1-7) entsteht. (Vickers et al., 2002; Trask et al., 2007). ACE2 ist ebenso in der Lage, aus Ang I Ang-(1-9) zu generieren (Vickers et al., 2002). Weiterhin kann aus Ang-(1-9) durch das Abspalten von den zwei C-terminalen Aminosäuren durch ACE Ang-(1-7) entstehen (Rice et al., 2004). Neue Untersuchungen haben ergeben, dass ACE2 ein funktioneller Rezeptor für das Coronavirus ist, welches das Schwere Akute Atemnotsyndrom (SARS) (Li et al., 2004) verursacht.

Zuerst wurde vermutet Ang-(1-7) wäre ein biologisch inaktives Abbauprodukt von Ang II (Ferrario et al., 1988). Im Jahr 1988 wurde erstmals bemerkt, dass Ang-(1-7) eine biologische Aktivität aufweist indem gezeigt wurde, dass Ang-(1-7) im Vergleich zu Ang II gleichermaßen Vasopressin aus neurohypophysären Gewebestücken freisetzen konnte. (Schiavone et al., 1988). In den letzten Jahren ist der Ang II Metabolit Ang-(1-7) in den Vordergrund gerückt da er oft den unerwünschten Effekten von Ang II entgegenwirkt, wie z.B. der Vasokonstriktion und den proliferativen Eigenschaften (Ferrario et al., 1988; Santos et al., 2000).

Das Heptapeptid fördert die Freisetzung von vasodilatierenden Prostaglandinen (Jaiswal et al., 1992; Muthalif et al., 1998) und NO (Nitric Oxide) (Li et al., 1997). Neben den Gefäßeffekten konnte gezeigt werden, dass Ang-(1-7) auch positive Effekte auf die Herzfunktion hat (Ferrario et al., 2002; Loot et al., 2002) und die wachstumsfördernden Effekte von Ang II in den Zellen der glatten Gefäßmuskulatur (Strawn et al., 1999) und Kardiomyozyten (Tallant et al., 2005) antagonisiert. Ang-(1-7) ist ebenfalls an der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes der Nieren beteiligt (Santos et al., 1996). Der Einfluss von Ang-(1 - 7) ist jedoch nicht nur auf die kardiovaskuläre und renale Funktion beschränkt sondern erstreckt sich auch auf Wundheilung (Rodgers et al., 2006), Karzinome (Gallagher

et al., 2004; Menon et al., 2007; Rodgers et al., 2006) und die frühen Stammzellen (Heringer-Walther et al., 2009).

In einer 2003 publizierten Arbeit von Santos et al. wurde erstmals der Mas-Rezeptor mit den Effekten von Ang-(1-7) in Verbindung gebracht (Santos et al., 2003). Der Mas-Rezeptor wird durch das Mas-Protoonkogen kodiert, welches erstmals durch seine kanzerogenen Aktivitäten in *in vivo* Tumorproben auffiel (Young et al., 1986). Es wurde vermutet, dass Mas ein Rezeptor für Ang II ist (Jackson et al., 1988), aber weitere Untersuchungen ergaben, dass eine Ang II-induzierte Erhöhung von intrazellulärem Ca^{2+} in Mas-transfizierten Zellen nur in AT_1 exprimierenden Zellen vorkommt (Ambroz et al., 1991; Ardaillou et al., 1999). Es gibt jedoch klare Anzeichen dafür, dass Mas eine physiologische Rolle in der Ang II-Funktion spielt. So wurde gezeigt, dass ein Mas-Defizit zu Störungen der AT_1 Signalwirkung in neuronalen Zellen führt (Von Bohlen & Halbach et al., 2000). In den Untersuchungen von Santos et al. (Santos et al., 2003) konnte schließlich Ang-(1-7) als natürlicher Ligand des Mas-Rezeptors identifiziert werden. Entsprechend fokussierten nachfolgende Arbeiten darauf, die durch Mas stimulierten Signaltransduktionswege zu erforschen. Untersuchungen von Zohn et al. wiesen auf eine Mas-vermittelte Aktivierung der kleinen GTPase Rac1 hin, (Zohn et al., 1998) während nachfolgende Untersuchungen eine Aktivierung der GTPase RhoA über die G-Proteine $\text{G}_{\alpha_q/11}$ nachweisen konnten (Canals et al., 2006). Es wurde außerdem gezeigt, dass Ang-(1-7) die Aktivierung von MAPKs in Cardiomyozyten durch die Aktivierung von Mas hemmen kann (Tallant et al., 2005).

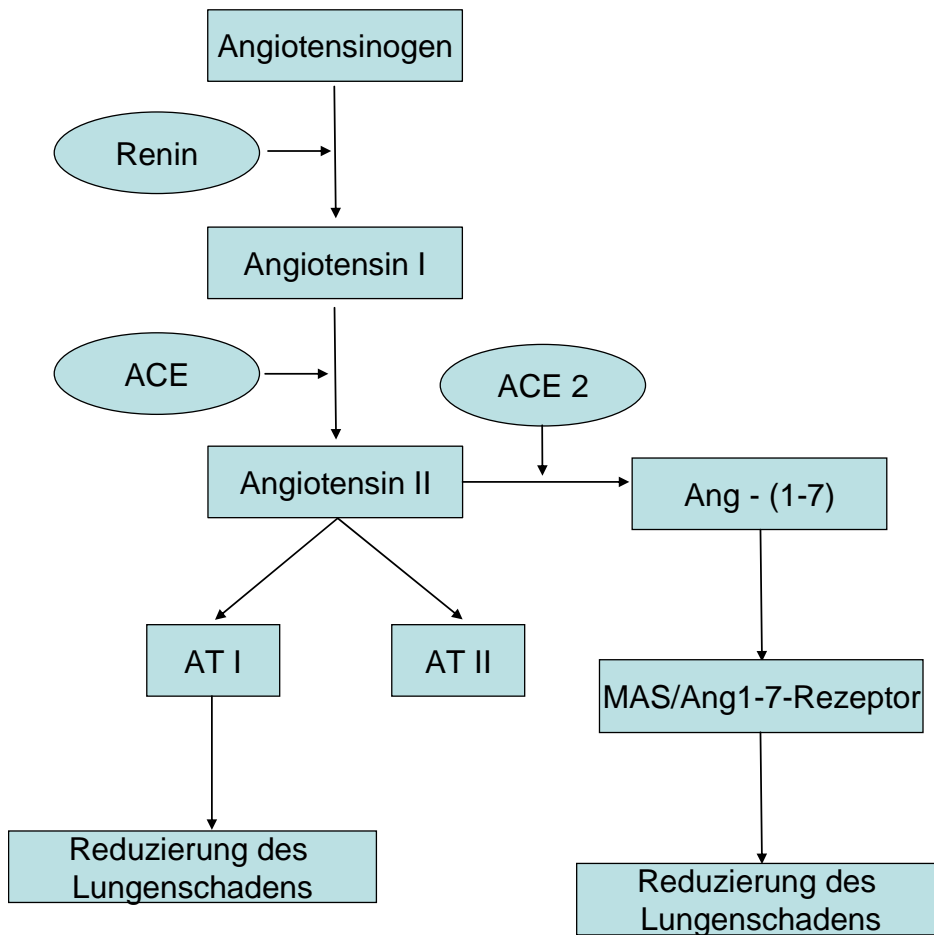


Abbildung 3: Signalkaskade vom Angiotensinogen bis zum Angiotensin II: Von Angiotensin II wird durch ACE 2 eine Aminosäure des Angiotensin II abgespalten und somit entsteht Angiotensin (1-7). Dieses bindet an den MAS/Ang-(1-7)-Rezeptor und es wird eine Reduzierung des Lungenschadens erreicht. Die Bindung des Angiotensin II an die Rezeptoren AT1 und AT2 führt zu einer Begünstigung des akuten Lungenschadens.

3 Material und Methoden

3.1 Arbeitsgeräte

Bezeichnung/ Handelsname		Hersteller/ Bezugsquelle
Schermaschine	Arco-Rasierapparat	Harotec GmbH, Berlin, Deutschland
Spritzenpumpe	Perfusor (Typ 8713820)	Braun, Melsungen, Deutschland
Infusionspumpe	Injectomat cp-PS Fresenius	Fresenius AG, Schweinfurt, Deutschland
Elektrokauter	Engel-Löter 100 S Typ 474/1	
Beatmungsgerät	Animal-Respirator Advanced 4601-1	TSE Systems GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Infusionspumpe	Syringe Pump	Hugo Sachs, March- Hugstetten, Deutschland
Signalanschlussbox		Bedo Elektronik GmbH, Krefeld, Deutschland
Mikroskop		Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Ultraschall-Flowprobe	Transonic Flowprobe Serial Nr. 2.5SB1115	Hugo Sachs Elektronik HAVARD APPARATUS GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
Mikrowellenherd		Severin, Sundern, Deutschland
Zentrifuge	Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Waage		OHAUS, Nänikon, Schweiz
Feinwaage	Elektronische Analysewaage 1801	Sartorius GmbH, Göttingen,

Blutgasanalysegerät	MP8	Deutschland Rapidlab Chiron Diagnostics, Emeryville, CA, USA
Coulter Counter	Coulter AC.T diffTM analysator	Coulter Corporation, Miami, Florida, USA
Wärmeplatte und Magnetrührer pH-Messgerät		IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland Schott Geräte, Hofheim i.T., Deutschland
Gefrierschrank	Herafreeze -80°C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Objektträger	Menzel Gläser Super Frost Plus	Menzel GmbH & CO KG, Braunschweig, Deutschland
pH-Messgerät	pH-meter pH 510	Eutech Instruments
Ultraschall-Homogenisierer	Sonifier Cell Disrupter B-12 + Sonifier Converter	Branson sonic power company, Danbury, USA
Homogenisierer	Ultra Turrax	IKA – WERKE, Staufen, Deutschland
Elisa Reader	Elisa Reader	Tecan Spectra, Männedorf, Schweiz
Zentrifuge	Ultrospec 2100 pro	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Digitalthermometer	DigitalthermometerTyp Pt1000	Greisinger electronic, Regenstauf, Deutschland

3.2 Verbrauchsmaterialien/Chemikalien

Bezeichnung/ Handelsname	Hersteller/ Bezugsquelle
Fentanyl-Janssen [®] 0,1 mg – Wirkstoff: Fentanylcitrat	JANSSEN Pharmaceutica, Neuss, Deutschland
Dormicum 15 mg/3 ml, Wirkstoff: Midazolam	Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, Schweiz
Domitor (Wirkstoff: Medetomidinhydrochlorid)	Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Rotex medica 25000 I.E. / 5 ml	FROTEX MEDICA GmbH, Trittau, Deutschland
NaCl 0,9 % Fresenius	Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg
Oleic acid Sigma-Aldrich	Sigma-Aldrich Chemie GmbH P.O.1120, Steinheim, Deutschland
Angiotensin I/II (1–7) trifluoracetate salt	Bachem Bubendorf, Schweiz
(D-Ala ⁷)-Angiotensin I/II (1-7)	Bachem Bubendorf, Schweiz
D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. Walther, Leipzig, Deutschland
AVE0991	Zur Verfügung gestellt von Prof. T. Walther, Leipzig, Deutschland
Irbesartan	Zur Verfügung gestellt von Dr. C. Tschoepe, Charité Berlin, Deutschland
Polyethylenglycol 400 (PEG400)	Rotipuran PH. Eur., Roth, Karlsruhe, Deutschland
Reinstwasser	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dulbecco-modifiziertes PBS (Phosphate Buffered Saline)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Natriumphosphatpuffer 0,08M (pH 5,4)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumphosphatpuffer 0,02M (pH 7,4)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumphosphatpuffer 0,05M (pH 6) mit 0,5 % HTAB Hexa-1,6-bis- decyltrimethylammonium Bromid)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Natriumphosphatpuffer 0,08M (pH 5,4)	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

Wasserstoffperoxid (30 %)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Meerrettichperoxidase (10mg)	Fluka (Sigma), München, Deutschland
Schwefelsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
N-Ethylamid, Sigma Ultra	Sigma Aldrich, München, Deutschland
3,3'-5,5'-tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma Chemie, München, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, München, Deutschland
Quick Start Bradford Protein Assay Kit 1 Nr. 500-0201 Enthält 1 Liter Farbreagenz und 5x2 ml bovines Serumalbumin bis 2mg/ml	Bio-Rad, München, Deutschland
Formaldehydlösung 4 % gepuffert (pH 6,9)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Alleinfutter (V1535-000ssniff R/M-H, 15mm)	Sniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Pipettenspitzen (gelb, blau, weiss) (200, 100 - 1000, 1 – 10 µl)	Sorenson, Utah, USA
Eppendorf-Reagenzgefäß <i>Safe Seal</i> (1, 2 und 5 ml)	Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, Nürnbrecht, Deutschland
50 ml Zentrifugenröhrchen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Plastikküvetten	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Probenboxen für -80° Gefrierschrank	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Sterile Spritzen-Plastipak (1, 2, 5, 10, 20 ml)	Becton-Dickinson S.A., FRAGA, Spain
50 ml-Spritzen BD Perfusion	BD Drogheda, Levante, Spanien
Kanülen-Microlane 3 0,6 x 30 mm	
Multi Cap Kapillarröhrchen (Vol. 100 µl) zur Blutentnahme	Bayer Health Care LLC, Tarrytown, NY 10591-5097
3 DTX Druckwandler	Becton Dickinson Infusion Therapy Systems Inc., Utah, USA
Falcon [®] -Röhrchen	BD, Levante, Spanien
96-well Platten	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Prolene -6.0	Ethicon GmbH & CO KG, Norderstedt, Deutschland

Trachealtubus	Infusionsbesteck, Fa- Braun, Melsungen, Deutschland
Einmalhandschuhe rotiprotect Nitril	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, Deutschland
Katheter für GefäÙe-Portex Fine Bore Polythene Tubing 30 m (ID 0,58 mm, OD 0,96 mm)	SMITHS Medical ASD, Inc. Keene, NH 03431, USA

3.3 *Präparationsbesteck*

Das Präparationsbesteck wurde von der Firma FST (Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland) bzw. Aesculap (Aesculap AG & CO KG, Tuttlingen, Deutschland, Arterienklemme) bezogen.

3.4 *Versuchstiere*

Für die Untersuchungen am Modell der Induktion eines akuten Lungenschadens durch Infusion von Ölsäure wurden männliche Sprague Dawley (SD) Ratten (360 ± 30g Körpergewicht, KG) verwendet. Alle Tiere wurden von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) bezogen. Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend der Richtlinien des Deutschen Tierschutzgesetzes in einem 12:12 h Rhythmus in Käfigen mit Zugang zu Wasser und Trockenfutter (V1535-000ssniff R/M-H, 15 mm; ssniff Spezialdiäten GmbH, D-59494 Soest) *ad libitum* im Tierstall des Instituts für Physiologie der Charité Universitätsmedizin Berlin – Campus Benjamin Franklin. Den Tieren wurde eine Äquilibrationsphase von drei Tagen gewährt. Die der Promotion zugrunde liegenden Studien wurden von der Landesbehörde (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin, Deutschland) genehmigt.

3.5 *Narkose und Präparation der Versuchstiere*

Die Tiere wurden initial mit einer intramuskulären Injektion einer Kombinationsnarkose aus Fentanyl (0,05 mg/kg KG), Medetomidin (1 mg/kg KG) und Midazolam (5 mg/kg KG) narkotisiert (Buelmann et al. 2009). Zeigte das Versuchstier keinen Lidreflex und reagierte nicht mehr auf Manipulationen an den Ohren oder auf das Kneifen der Zwischenzehenhaut, so wurde es in Rückenlage auf den OP-Tisch gelagert. Zum späteren Anschluss an das Beatmungsgerät wurden die Versuchstiere tracheotomiert. Nach longitudinaler Hautinzision in der Regio cervicalis anterior entlang der Medianlinie wurde die Trachea unter Schonung des umliegenden Gewebes freipräpariert.

Die freigelegte Trachea wurde zum Anschlingen mit chirurgischem Nahtmaterial angehoben und dann zwischen zwei Knorpelspangen eröffnet. In diese Öffnung wurde ein Trachealtubus

(15 mm Länge, 3 mm innerer Durchmesser), eingeführt und mit einer Ligatur fixiert. Neben der Freihaltung der Atemwege wurde über den Trachealtubus auch ein endotracheales Absaugen mit einem dünnen Plastikschlauch ermöglicht.

Je nach Versuchsgruppe wurden die rechte oder beide (rechte und linke) subkutan liegenden Venae jugulares externae vom umliegenden Bindegewebe befreit und über eine Pinzette gespannt. Anschließend wurde an der präparierten Vena jugularis proximal eine Ligatur vorgelegt und distal ligiert. Mit der Gefäßschere wurde das Lumen der Vene vorsichtig eröffnet und ein spitz zugeschnittener Polyethylenkatheter (Außendurchmesser: 0,96 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm) ca. 5-7 mm weit vorgeschoben. Der Katheter wurde proximal und distal fixiert und die Pinzette entfernt.

Über den venösen Katheter wurde die Narkosemischung zur Aufrechterhaltung der Narkose (Fentanyl, Midazolam, Medetomidin in 0,9 % isotoner NaCl-Lösung (1:5)) mittels eines Perfusors mit einer Infusionsrate von 4 ml/h fortgeführt, wodurch auch gleichzeitig eine kontinuierliche perioperative Flüssigkeitssubstitution gewährleistet wurde. Des Weiteren wurde der zentralvenöse Druck mittels eines DTX Plus Drucksensors mit entsprechendem Druckwandler kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet.

Je nach Versuchsgruppe erfolgte die Medikation durch Infusion über die rechte oder/und die linke Vena jugularis, was abhängig war von der Versuchsgruppe und der Medikation, die appliziert wurde. Für die arterielle Kanülierung wurde die rechte Arteria carotis communis unterhalb des rechten Musculus sternocleidomastoideus unter Schonung des rechten Nervus vagus und Nervus phrenicus freipräpariert und über eine Pinzette gespannt. Um den Blutfluss vorübergehend zu unterbrechen, wurde von proximal die Arterie mit Hilfe eines Biemer Clips abgeklemmt. Das weitere Vorgehen entsprach der venösen Katheterisierung. Der arterielle Katheter wurde circa 5 mm nach proximal vorgeschoben.

Der Katheter in der Arteria carotis communis diente einerseits der kontinuierlichen Blutdruckmessung mittels eines DTX Plus Drucksensor, andererseits wurden darüber die arteriellen Blutproben zur nachfolgenden Blutgasanalyse entnommen.

Um eine Thrombosierung zu vermeiden, wurden alle Katheter vor der Punktion mit durch isotonische Kochsalzlösung verdünntem Heparin gespült.

Um die Körpertemperatur während des Versuches konstant auf 37°C zu halten, wurde das Versuchstier auf einer Wärmematte gelagert. Die Kontrolle der Körpertemperatur erfolgte durch rektale Messungen mit einem Digitalthermometer.

Vor der Eröffnung des Thorax wurde das Tier an ein Kleintierbeatmungsgerät angeschlossen und volumenkontrolliert mit einem Atemzugvolumen von 6 mL/kg KG bei einer Atemfrequenz von 65 - 80/min, abhängig vom Körpergewicht der Tiere, und positiven inspiratorischen und end-expiratorischen Drücken (PEEP) von 14 und 3 cm H₂O mit Raumluft beatmet.

Nach Anschluss an die Messgeräte und der Beendigung der Präparation wurde eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt, auf deren Ergebnis hin die Beatmungsparameter in Abhängigkeit vom CO₂-Gehalt noch einmal optimiert wurden zum Beispiel um den basalen CO₂ im Bereich von 35 – 45 mmHg einzustellen. Nach Entfernung des Fells im Bereich des Thorax wurde ein medianer, ca. 7 cm langer vertikaler Hautschnitt von der Halsregion bis zur Regio xiphoidea durchgeführt. Nach sorgfältiger Präparation der Haut wurden die darunterliegende Muskulatur und das Bindegewebe durch einen Schnitt gespalten. Der Processus xiphoideus wurde mit einer Klemme fixiert und das Abdomen im epigastrischen Winkel eröffnet. Anschließend wurde die Thoraxhöhle durch Durchtrennung des Diaphragmas eröffnet und das Sternum mit Hilfe einer Präparierschere in der Medianlinie durchtrennt. Nun folgte das Auseinanderspreizen der Rippenbögen unter Einbringen eines Wundspreizers. Mit einem Elektrokauter wurde die durch die Schnitfführung entstandene Blutung der verletzten Gefäße gestillt.

Um die Aorta freizulegen, wurde als erstes der Thymus abgeklemmt, vorgelagert, abgebunden und dann abgetrennt. Die Aorta wurde von rechts durch Widerstand eines Wattestäbchens linksseitig aufgelagert und vorsichtig separiert. Ein über der ascendierenden Aorta platzierter Ultraschall-Flussmesskopf ermöglichte die kontinuierliche Messung des Aortenflusses.

Zur Messung des pulmonalarteriellen Drucks (PAP) wurde nach Eröffnen des Perikards eine Tabaksbeutelnaht am rechten Ventrikel mit einem 6-0 Prolene Faden vorgelegt. In der Mitte dieser Tabaksbeutelnaht wurde der rechte Ventrikel mit einer Kanüle (26 G) punktiert und ein Polyethylenkatheter (Außendurchmesser: 0,96 mm, Innendurchmesser: 0,58 mm) ca. 5 -7 mm in die Arteria pulmonalis vorgeschoben. Der PAP konnte somit ebenfalls über einen DTX Plus Drucksensor/wandler gemessen und aufgezeichnet werden. Der pulmonalvaskuläre Widerstand (PVR) wurde als Quotient der transpulmonalen Druckdifferenz pro Flussrate als $PVR = -(PAP - \text{linksatrialer Druck, LAP}) / \text{Blutfluss durch die Aorta (in mL/min)}$ errechnet, wobei auf der Basis umfangreicher Vorversuche ein linksatrialer Druck von 2 cmH₂O als Konstante angenommen wurde (Buelmann et al., 2009).

3.6 Versuchsgruppen

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit 11 Versuchsgruppen untersucht. Die Tiere wurden randomisiert in die Versuchsgruppen eingeteilt, jede Gruppe bestand aus jeweils n=8 Tieren. Die Versuchsdauer betrug in allen Gruppen vier Stunden. Die erste Hypothese war, dass Ang-(1-7) einen durch Ölsäure induzierten Lungenschaden verbessern kann. Dazu wurde eine Kontrollgruppe benötigt, in der die Tiere die Versuchsdauer ohne eine Applikation von Pharmaka durchlaufen. Diese Tiere erhielten lediglich eine adäquate Menge an NaCl. Um das Ausmaß eines ALI zu erfassen, wurde in der zweiten Gruppe ein Lungenschaden intravenös mittels Ölsäure induziert und die dritte Gruppe diente dazu die positive Wirkung von Ang-(1-7) im Hinblick auf ALI zu verdeutlichen. Um einen Ausblick auf eine Behandlung in der Klinik zu schaffen, wurde überprüft, ob die hier erreichten Effekte von Ang-(1-7) auch durch den nichtpeptidischen Ang-(1-7) Agonist AVE0991 zu erreichen wären (Gruppe 4). Die zweite Hypothese, dass diese Auswirkungen von Ang-(1-7) über den MAS-Rezeptor vermittelt werden, sollte abgeklärt werden, indem zwei unterschiedliche Rezeptorblocker allein mit einer Ölsäureapplikation oder zusätzlich einer Applikation von Ang-(1-7) verabreicht wurden (Gruppen 4 -8).

Zuletzt sollten die Ergebnisse von Penniger et al (2008) bestätigt und unterstrichen werden. Es wurde untersucht, inwiefern eine Blockade des AT₁ Rezeptors zu positiven Effekten führt, die möglicherweise auf eine vermehrte Aktivierung der Ang-(1-7)/Mas Achse zurückzuführen sein könnten. Hierzu wurden eine Gruppe mit ölsäureinduziertem Lungenschaden mit einem AT₁ Rezeptorblocker und eine weitere mit zusätzlichem Ang-(1-7) Antagonisten untersucht (Gruppen 10 und 11).

Tabelle 2: Übersicht der Versuchsgruppen

Gruppe	NaCl	Öl- säure	Rezeptor Agonist	Rezeptor- Antagonist(en)
1 Kontrolle	+	-	-	-
2 Ölsäure+Placebo	-	+	-	-
3 Ölsäure+Angiotensin (1 -7)	-	+	Ang-(1-7)	-
4 Ölsäure+AVE0991				
5 Ölsäure+D-Ala-Ang-(1-7)	-	+	-	A779
6 Ölsäure+D-Ala-Ang-(1-7)+Angiotensin (1-7)	-	+	Ang-(1-7)	A779
7 Ölsäure+D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)	-	+	-	D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)
8 Ölsäure+D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)+Angiotensin (1-7)	-	+	Ang-(1-7)	D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)

9	Ölsäure+D-Ala-Ang-(1-7)+D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)+Angiotensin (1-7)	-	+	Ang-(1-7)	A779, D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)
10	Ölsäure+Irbesartan	-	+	-	-
11	Ölsäure+Irbesartan+A779	-	+	-	A779

- Gruppe 1: Kontrollgruppe

Tiere, bei denen als Kontrollgruppe kein Lungenschaden induziert wurde.

Die Versuchstiere erhielten über den zentralvenösen Katheter anstelle der Ölsäureinjektion eine gleichvolumige Injektion einer 0.9%igen NaCl-Lösung.

- Gruppe 2: Ölsäure-Placebo-Gruppe

In dieser Gruppe wurde nach der Messung der Ausgangswerte ein Lungenschaden induziert. Hierzu wurde Ölsäure in einer 0,1 % Lösung BSA (Bovines Serum Albumin) suspendiert und in einer Dosierung von 0,2 g/kg KG intravenös über einen Zeitraum von 30 min infundiert (Buelmann et. al, 2009). Das Volumen wurde dazu in drei Portionen aufgeteilt und die Infusion in einem jeweils zehnminütigen Abstand vorgenommen, da eine einmalige Applikation der gesamt vorgesehenen Dosis der Ölsäure zum sofortigen Exitus geführt hätte. Diese Versuchsgruppe diente als Lungenschadensgruppe für die Therapieversuche und wird im Folgenden als Ölsäure-Placebo Gruppe bezeichnet.

In den folgenden Versuchsgruppen werden die jeweiligen Pharmaka über einen Zeitraum von dreieinhalb Stunden mit einer Perfusionsrate von 0,5 ml/h infundiert. Die Applikation beginnt dabei jeweils nach der 30-minütigen Induktion des Lungenschadens durch Ölsäure.

- Gruppe 3: Ölsäure und Ang-(1-7)

In dieser Versuchsgruppe wurde nach Infusion von Ölsäure Angiotensin (1-7) in einer 0,9%igen Kochsalzlösung mit einer Dosis von 50 pmol•kg•min (Wiemer et al., 2002; Walters et al., 2005) verabreicht. Diese Gruppe wird im Folgenden als OA-Ang-(1-7) bezeichnet.

- Gruppe 4: Ölsäure und AVE0991

Für diese Gruppe wurde der nichtpeptidische Ang-(1-7) Agonist AVE0991 in 1:1 PEG400:H₂O gelöst und in einer Dosierung von 500 pmol•kg•min (Wiemer et al., 2002) in physiologischer Kochsalzlösung appliziert. Diese Gruppe wird im Folgenden als OA-AVE0991 bezeichnet.

- Gruppe 5: Ölsäure und A779

Hier wurde nach Induktion des Lungenschadens der Ang-(1–7)-Antagonist D-Ala-Ang-(1–7) (A779) in 0.9%igem NaCl in einer Dosierung von 100 pmol•kg•min (Walters et al., 2005) infundiert.

- Gruppe 6: Ölsäure und Ang-(1–7) und A779

Hierbei wurden die Gaben von Angiotensin (1–7) und dem Ang-(1-7)-Antagonisten A779 kombiniert. Beide Pharmaka wurden in den oben genannten Konzentrationen appliziert.

Die Infusion von A779 wurde mit einer Vorlaufzeit von 5 Minuten vor Ang-(1-7) gestartet, um den Rezeptor mit dem Antagonisten zu besetzen. Im Anschluss an diese Vorlaufzeit wurde das Ang (1-7) über dieselbe Perfusionspritze infundiert. Diese Gruppe wird im Folgenden als OA-Ang(1-7)-A779 bezeichnet.

- Gruppe 7: Ölsäure und D-Pro⁷-Ang-(1-7)

D-Pro⁷-Ang-(1-7) ist der zweite verwendete Ang-(1–7)-Antagonist, da A779 nicht alle protektiven Eigenschaften von Ang-(1-7) blockieren konnte. Dies wurde beispielsweise auch in einer Studie von Lautner et al. (2013) beobachtet. Die beiden Inhibitoren verhalten sich unterschiedlich. D-Pro⁷-Ang-(1-7) wurde in einer Dosierung von 100 pmol•kg•min (Santos et al., 2003), gelöst in 0,9 %iger NaCl, infundiert. Nachfolgend wird diese Gruppe als OA-D-Pro bezeichnet.

- Gruppe 8: Ölsäure und D-Pro⁷-Ang-(1-7) und Ang-(1–7)

Analog der Gruppe 5 wurde in dieser Versuchsreihe die Applikation von Ang-(1-7) mit dem Ang (1-7)-Antagonisten D-Pro⁷-Ang-(1-7) kombiniert. Auch hier wurde der Antagonist mit einer Vorlaufzeit von fünf Minuten appliziert und anschließend gleichzeitig Angiotensin (1–7) infundiert. Im Folgenden lautet die Bezeichnung für diese Gruppe OA-D-Pro-Ang-(1-7).

- Gruppe 9: Ölsäure und Irbesartan

Irbesartan wurde in PBS gelöst und in einer Dosierung von 10 mg/kg (Penninger et al., 2008) infundiert und als Gruppe OA-Irbesartan in der weiteren Bezeichnung geführt.

- Gruppe 10: Ölsäure und Irbesartan und A779

Irbesartan wird hier wie Ang-(1-7) in Gruppe 5 zusammen mit dem Antagonisten A779 und Ölsäure appliziert. Der Ang-(1–7)-Inhibitor A779 wurde, zusammen mit der Narkose, über einen zweiten Perfusor infundiert. Dieser zweite Perfusor war nötig, da A779 nicht zusammen mit KOH verabreicht werden konnte. Dies geschah aufgrund eventueller Aufhebungswirkung durch inkompatible pH-Werte.

- Gruppe 11: Ölsäure und A779 und D-Pro⁷-Ang-(1-7) und Ang-(1-7)

In dieser Gruppe wurden beide Ang-(1-7) Antagonisten A779 und D-Pro⁷-Ang-(1-7) in Kombination mit Ang-(1-7) verwendet, um zu klären inwieweit der Effekt durch gleichzeitige Applikation beider Antagonisten verstärkt wird und ob damit eine vollständige Blockade des Rezeptors Mas erreicht werden kann. Wie auch in den vorangegangenen Kombinationsgruppen wurden die Antagonisten A779 und D-Pro⁷-Ang-(1-7) mit fünfminütiger Vorlaufzeit vor Ang-(1-7) infundiert. Im Folgenden wird diese Gruppe als OA-Ang-(1-7)-A779-D-Pro bezeichnet.

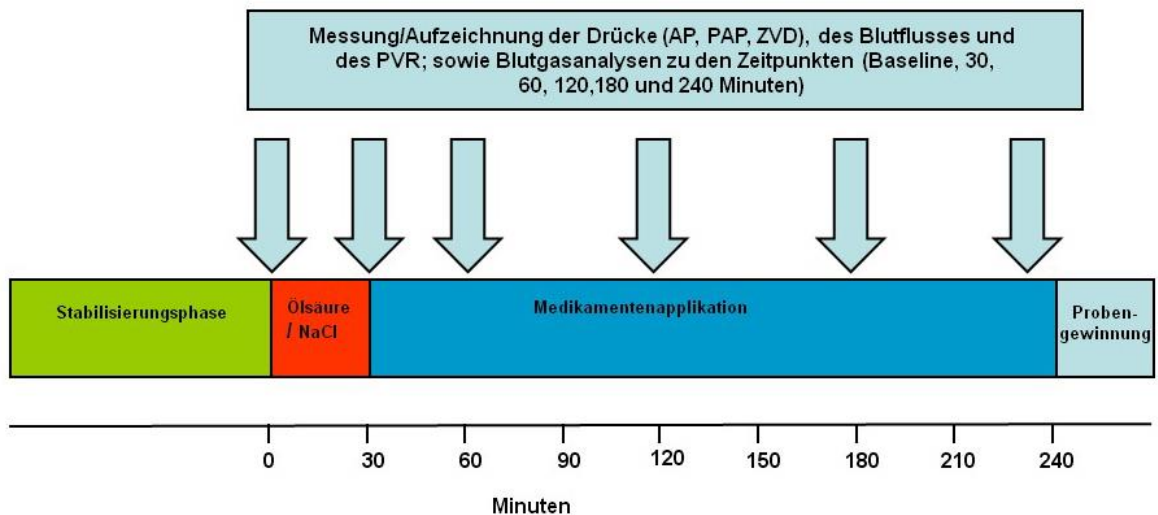
Tabelle 3: Übersicht der Wirkstoffe, der Arbeitslösung und der verwendeten Dosierung.

Wirkstoff	Arbeitslösung	Dosierung
Ölsäure	0,1 % in BSA	0,2 g/kg KG i.v. über 30 min
Ang (1-7)	0,9 %ige NaCl Lösung	50 pmol·kg·min i.v.
AVE0991	1:1 PEG400:H ₂ O	500 pmol·kg·min i.v.
A779	0,9 %ige NaCl Lösung	100 pmol·kg·min i.v.
D-Pro ⁷ -Ang-(1-7)	0,9 %ige NaCl Lösung	100 pmol·kg·min i.v.
Irbesartan	0,9 %ige NaCl Lösung + Kaliumhydrochlorid	10 mg/kg

3.7 *Versuchsprotokoll*

Alle Tiere durchliefen die in der Abbildung beschriebenen Versuchsabschnitte.

Abb. Versuchsprotokoll mit Beschriftung



3.8 *Probenentnahme*

3.8.1 **Blutprobenentnahme**

Die Blutproben wurden zu den Zeitpunkten: Baseline (0 min), 30, 60, 120, 180 und 240 Minuten (jeweils nach der Gabe von Ölsäure) entnommen. Bei jeder Messung wurden der pH-Wert, pCO₂, pO₂ und der Hämatokrit mittels Blutgasanalyse bestimmt.

Nach der Anfangsmessung (erste Messung der Blutgaswerte nach Präparation) wurden zur Plasmagewinnung 0,5 ml und nach der Abschlussmessung (240 min) 1 ml Blut über den Zugang der Arteria Carotis abgenommen. Das Blut wurde jeweils zentrifugiert (4°C, 20000g, 20 min), das Plasma wurde abpipettiert und zur späteren Ermittlung der Zytokinmenge in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

3.8.2 **Bronchoalveoläre Lavage (BAL)**

Nach Beendigung des Versuches wurde der rechte Lungenflügel abgebunden, das Tier von der Beatmung getrennt und eine Lavage des linken Lungenflügels vorgenommen.

Hierzu wurde zwei Mal ein Volumen von 2,5 ml gekühlter 0.9% NaCl-Lösung in jeweils drei Wiederholungen über den Tubus in die Lunge gespritzt und zurückaspiriert.

Die so gewonnene Lavageflüssigkeit hatte ein Volumen von ca. 2,5 – 3 ml (d.h. ein *recovery* von 50-60%). Ein Teil der Lavageflüssigkeit diente zur Bestimmung der alveolären Infiltration weißer Blutzellen (WBC) mittels eines Coulter Counters. Anschließend wurde die Lavageflüssigkeit bei 4° zentrifugiert (800 g, 10 min), und der Überstand in drei Portionen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und zur späteren Proteinbestimmung bei -80° aufbewahrt. Ein Teil des Überstandes wurde später zur Proteinbestimmung in der Lavageflüssigkeit verwendet.

3.8.3 Entnahme der Organe

Nach der BAL erfolgte die Euthanasie des Tieres durch intravenöse Gabe von Narcoren. Der abgebundene nicht-lavagierte Teil und der lavagierte Lungenflügel wurden entnommen. Der Mittellappen des rechten Lungenflügels wurde in drei Stücke geteilt, die jeweils gewogen, in ein Cryogefäß verbracht, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80° gelagert wurden. Mit diesen Lungenstücken wurde später die Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe bestimmt.

Die verbleibenden zwei Lungenlappen dienten zur Bestimmung des Wassergehaltes in der Lunge durch Messung des Feucht-/Trockengewichtsverhältnisses.

3.9 Weiterverarbeitung der Proben

3.9.1 Bestimmung des Feucht /Trockengewichtsverhältnisses

Die Quantifizierung des relativen Lungenwassers erfolgte aus den verbliebenen zwei Lungenlappen des rechten Lungenflügels als Feucht-/Trockengewichtsverhältnis mittels Mikrowellentechnik (Peterson et al., 1982). Diese Bestimmung dient dazu das Lungenödem zu messen. Es handelt sich im Falle des Akuten Atemnotsyndroms um ein Permeabilitätsödem und erklärt die Proteine in der Lavageflüssigkeit.

3.9.2 Myeloperoxidasebestimmung

Zur Bestimmung der Myeloperoxidaseaktivität als Index für die Gewebeeinfiltration von neutrophilen Granulozyten wurde der Mittellappen des rechten Lungenflügels verwendet. Vor der Aufarbeitung der Gewebeproben wurden diese gewogen, um später die gemessene Myeloperoxidasetätigkeit gewichtsbezogen beurteilen zu können.

Jede Probe wurde mit jeweils einem Milliliter eines Homogenisierungspuffers (0,02 M Kaliumphosphatpuffer mit einem pH von 7,4) versetzt und mit einem Homogenisator zerkleinert. Danach wurde nochmals ein Milliliter dieses Puffers hinzugefügt und dann bei 40° mit 12000 rpm zwanzig Minuten lang zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das verbleibende Zelldebris wiederum in einem Milliliter eines Lösungspuffers (0,05 M Kaliumphosphatpuffer mit 0,5 % HTAB (Hexadecyltrimethylammonium Bromid) und einem pH von 6) resuspendiert. Diese Suspension wurde für 10 Sekunden soniziert, bei flüssigem Stickstoff schockgefroren, aufgetaut und dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Eine abschließende Zentrifugation bei 8000 rpm, 4° für 20 Minuten ergab einen Überstand, der gewonnen und bei -80° bis zur Myeloperoxidasebestimmung asserviert wurde.

In vivo katalysiert Myeloperoxidase (MPO) die Bildung von Hypochlorit (Salz der hyperchlorigen Säure (HClO)). Es enthält das Ion ClO^- . Hypochlorit entsteht neben Chlorid, wenn man Chlor in Laugen einleitet. ($\text{Cl}_2 + 2\text{OH}^- \rightarrow \text{Cl}^- + \text{ClO}^- + \text{H}_2\text{O}$) und anderen Oxidationsprodukten des Chloridions aus Wasserstoffperoxid und Chlorid. Die in vitro MPO-Bestimmung nützt die Wasserstoffperoxid-abhängige Oxidation von 3,3'-5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB). Dadurch wird das ursprünglich farblose TMB in seinen blaugrünen Oxidationsstatus überführt. Dazu mischt man in einem Reagenzglas folgende Reagenzien 16 mg 1,6 mM gelöstes TMB in 10 ml Dimethylsulfoxid (DMSO), außerdem 2,5 µl gelöstes H_2O_2 in 9 ml 0,08 M Natriumphosphatpuffer (pH 5,4; 0,6 mM) und 30 µl des davor abzentrifugierten Probenüberstandes. Die Reaktion startet bei 25° C in je einem Well pro Probe einer 96 Well-Platte durch Hinzufügen des kurz vorher gut gemischten TMB und Wasserstoffperoxid zu dem Gewebeprobenüberstand. Die kinetische Reaktion wurde als Extinktionsänderung bei 623 nm über einen Zeitraum von 5 min in einem ELISA-Reader gemessen, danach mit je 30 µl einer 2 M H_2SO_4 gestoppt, und dann bei 450 nm erneut im ELISA-Reader gemessen.

Um die Datenreproduzierbarkeit und Validität zu gewährleisten, wurden bei jeder Messung gleichzeitig die Leerwerte, bestehend aus 15 µl H_2O_2 , 15 µl TMB und 30 µl 0,05 M Kalium-Phosphat-Puffer pH 6 mit HTAB, und die kommerziell erhältliche Horseradish Peroxidase 2500 (U/ml) in verschiedenen Konzentrationen mitbestimmt. Es wurde eine Standardkurve mit bestimmten Proteinmengen erstellt. Für jede Größe auf der Kurve hat man einen vorgegebenen Wert und kann somit den Proteinwert in der Probe ermitteln.

Die Werte der Standard- und Probenmessungen wurden in eine Exceldatei zur Umrechnung der Myeloperoxidaseaktivität anhand des Gewichtes der jeweiligen Probe eingegeben und in Abhängigkeit der kinetischen Reaktion und der Standardkurve wurde ein Wert in U/g ermittelt, der für die Aktivität der MPO steht, die wiederum ein Maß für die Akkumulation der neutrophilen Granulozyten ist.

3.9.3 Proteinbestimmung aus der Lavageflüssigkeit

Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des Bradford Assays durchgeführt. Dieser nutzt die Eigenschaft des Farbstoffs Coomassie Brilliant Blue G-250, der abhängig von den seinem Bindungszustand in verschiedenen Formen vorliegt (BRADFORD 1976). Unter sauren Bedingungen liegt der Farbstoff überwiegend als protoniertes Kation mit braunroter Farbe und einem Absorptionsmaximum bei 470 nm vor. Durch Bindung an Proteine nimmt der Farbstoff eine stabile, unprotonierte Form ein. Diese Reaktion führt zu einem blauen Farbumschlag und damit zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums zu 595 nm. Die Absorption bei 595 nm korreliert dabei direkt mit der Proteinmenge und ermöglicht somit eine Quantifizierung der Proteinkonzentration in der Testflüssigkeit, in unserem Fall der BAL Flüssigkeit. Hierzu wurde der Quick Start™ Bradford Protein Assay (BIORAD) entsprechend den Herstellerangaben für den 1 ml-Küvettenansatz durchgeführt. Mittels des zum Kit gehörigen BSA (Bovine Serum Albumin)-Standards wurde eine Standardverdünnungsreihe erstellt, anhand derer die Proteinmenge in unseren Lavageproben bestimmt wurde.

3.9.4 Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden durch den Mann-Whitney Rank Sum, One Way ANOVA, T-Test und die Holm-Sidak Methode ermittelt; ein p-Wert $< 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Effekte von Angiotensin (1-7) und dem nichtpeptidischen Agonisten AVE0991 im Ölsäure-induzierten Lungenschaden

Zum Vergleich und zur Veranschaulichung wurden zu Anfang die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt (je n=8). In Tieren der Kontrollgruppe (kein Lungenschaden, NaCl-Behandlung) wurde kein akuter Lungenschaden (ALI) induziert, der Ölsäure-Placebo-Gruppe wurde er durch intravenöse Infusion von 0,2 g/kg KG Ölsäure induziert, sie erhielten jedoch keine weiteren pharmakologischen Interventionen.

In einem ersten Versuchsansatz wurden potentielle protektive Effekte einer Gabe von exogenem Ang-(1-7) bzw. alternativ von dem nicht-peptidischen Ang-(1-7) Rezeptor Agonisten AVE 0991 untersucht, um das therapeutische Potenzial von Ang-(1-7) und verwandten Rezeptoragonisten im ALI zu testen.

Vier Stunden nach der Ölsäureinfusion hatten die Versuchstiere ein deutliches Lungenödem, gemessen als Anstieg des Lungenfeucht-/Trockengewichtsverhältnisses, entwickelt. Sowohl durch die Behandlung mit Ang-(1-7) wie auch durch Applikation des nicht-peptidischen Agonisten AVE0991 konnte das Ölsäure-induzierte Lungenödem hingegen vollständig aufgehoben werden (Abb.5)

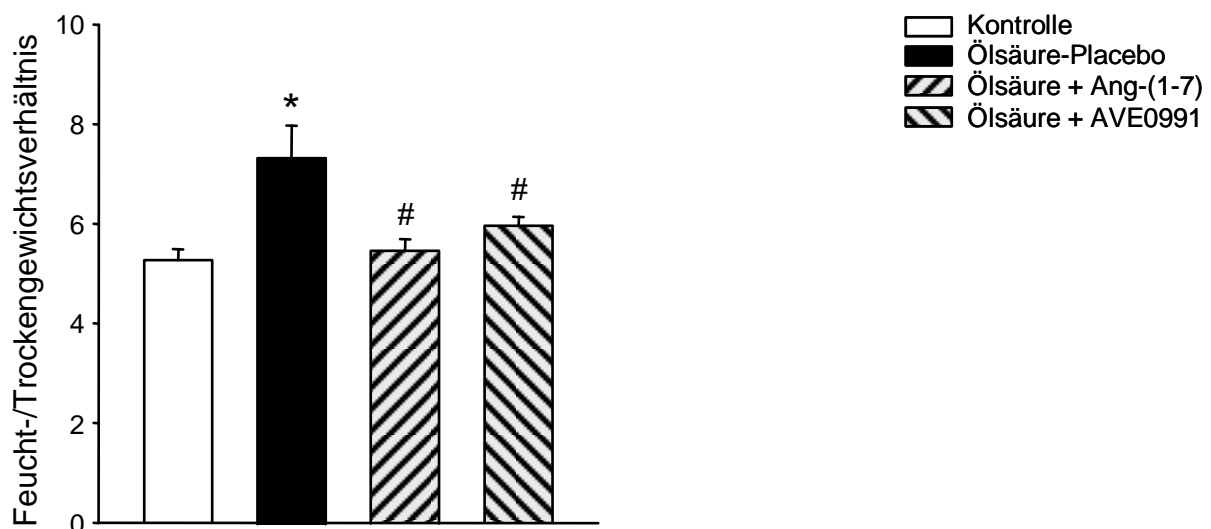


Abbildung 1: Effekte der Applikation von Angiotensin (1-7) und AVE 0991 jeweils nach Induktion des Lungenschadens bezogen auf das Feucht-/Trockengewichtverhältnis. Daten dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) von jeweils n=8 Ratten; *p<0,05 vs Kontrolle; #p<0,05 vs Ölsäure-Placebo.

In den Untersuchungen ergab sich keine signifikante Verschlechterung der arteriellen Oxygenierung nach Gabe von Ölsäure, was mit der schnellen Blutumverteilung zu tun hat (Schuster et al., 1994) und dementsprechend auch keine Veränderungen durch Gabe von Ang-(1-7) oder Ave0991 auf diesen Parameter.

Parallel zum Anstieg des Feucht-/Trockengewichtsverhältnisses führte die Verabreichung von Ölsäure zu einem massiven Anstieg der Proteinkonzentration in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit, welches ein charakteristisches Kennzeichen für eine pulmonalvaskuläre Barriestörung (Dodek et al., 1993) mit nachfolgender Entwicklung eines pulmonalen Permeabilitätsödems ist (Abb. 6).

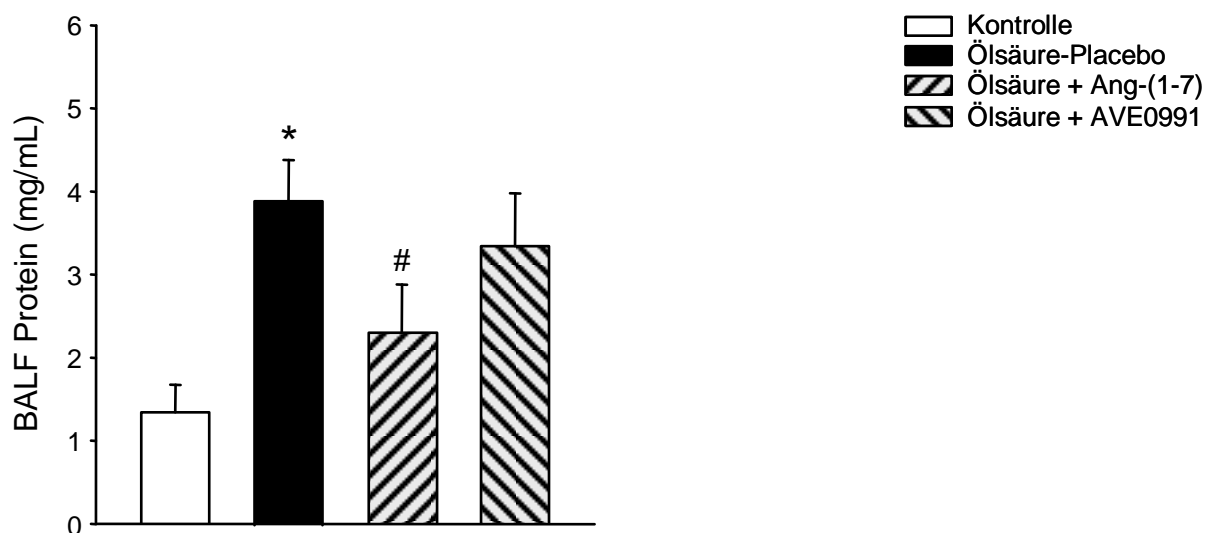


Abbildung 2: Anstieg des Proteingehaltes nach Induktion des Lungenschadens. Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von jeweils n=8 Ratten; *p<0,05 vs Kontrolle; #p<0,05 vs Ölsäure-Placebo.

Die therapeutische Gabe von Ang-(1-7) verminderte die Proteinextravasation in die BAL Flüssigkeit signifikant, wohingegen die Behandlung mit AVE0991 jedoch keinen signifikanten Effekt erzielte.

Die Myeloperoxidaseaktivität als Indikator der Akkumulation von neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe wurde als Maß für die charakteristische Entzündungsreaktion im Rahmen des akuten Lungenschadens gemessen. Ölsäure führte zu einem markanten Anstieg der MPO-Aktivität auf das ca. 2,4 fache des Kontrollwertes. Diese Entzündungsreaktion wurde durch Gabe von AVE0991 deutlich abgeschwächt und durch Ang-(1-7) sogar vollständig blockiert (Abb. 7).

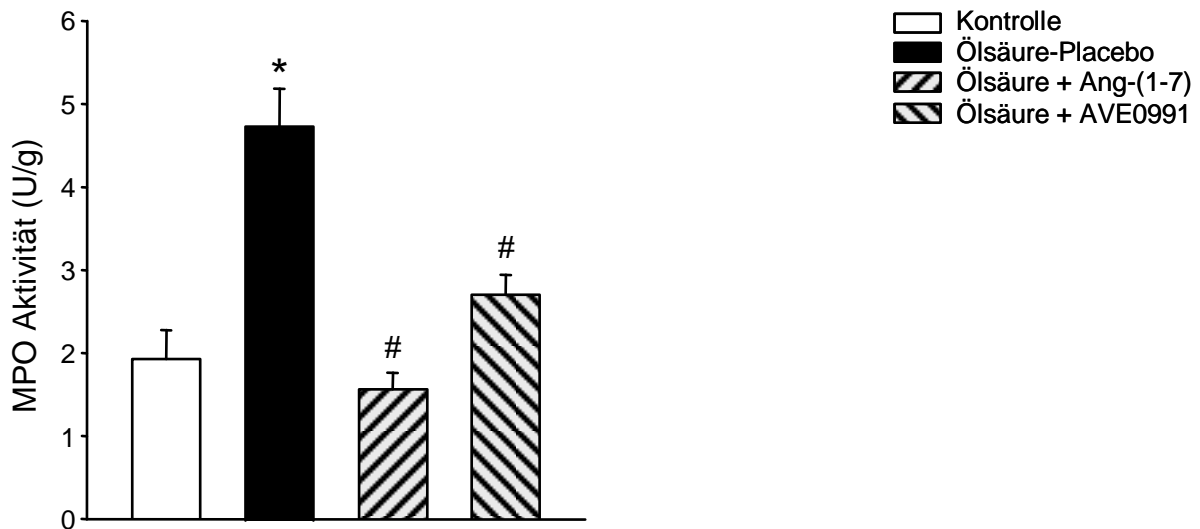


Abbildung 3: Effekte von Angiotensin (1-7) und AVE 0991 auf die Myeloperoxidaseaktivität. Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von jeweils n=8 Ratten; *p<0,05 vs Kontrolle; #p<0,05 vs Ölsäure-Placebo.

Des Weiteren induzierte Ölsäure einen rapiden arteriellen Blutdruckabfall, der bei allen Versuchsgruppen mit Ausnahme der Kontrollgruppe gleich war, um ca. 40%, und sich auch über die gesamte Versuchsdauer von 4 h nicht wieder erholte. Hingegen stabilisierte sich der Blutdruck unter Gabe von Ang-(1-7) oder auch AVE0991 über den vierstündigen Versuchsverlauf wieder. Die hämodynamische Stabilisation erfolgte bei den mit Ang-(1-7) behandelten Tieren schneller als bei den mit AVE0991 behandelten. (Abb. 8)

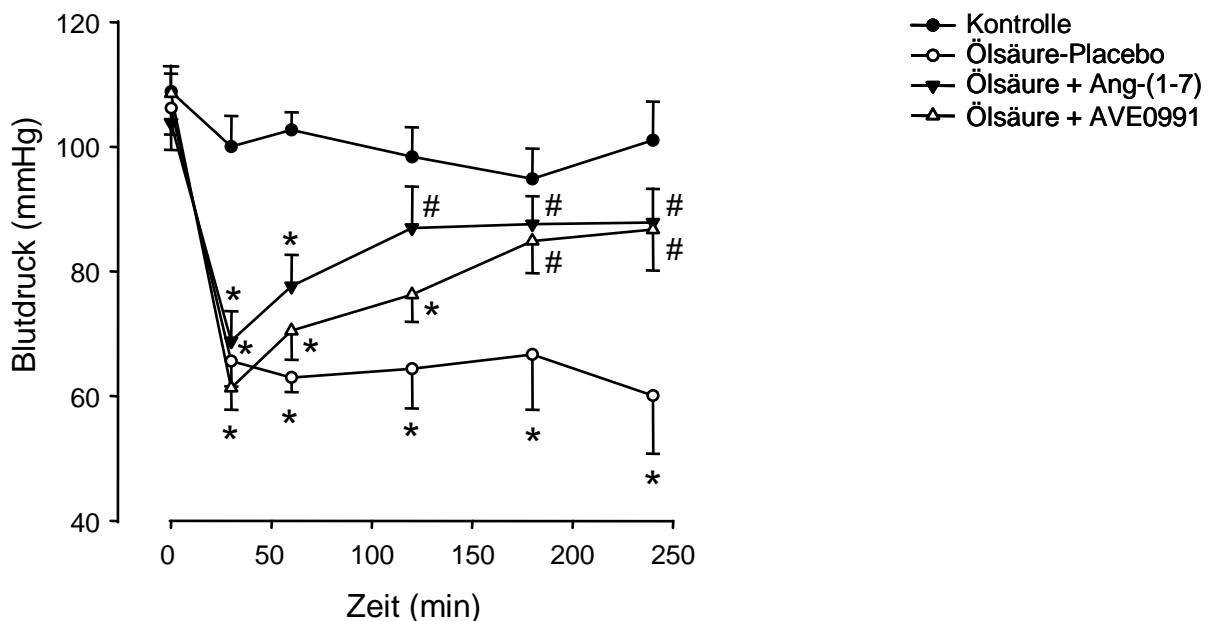


Abbildung 4: Absinken des arteriellen Blutdrucks in der Ölsäure-Placebo Gruppe und Stabilisation nach Applikation von Angiotensin (1-7) und AVE 0991. Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von jeweils n=8 Ratten; *p<0,05 vs Kontrolle; #p<0,05 vs Ölsäure-Placebo.

Neben der Hypotension kam es gleichzeitig zu einem Anstieg des pulmonalvaskulären Widerstands, welcher charakteristisch ist für die akute Phase des Lungenschadens und dies wurde ebenfalls durch Ang-(1-7) und AVE0991 verhindert (Abb. 9).

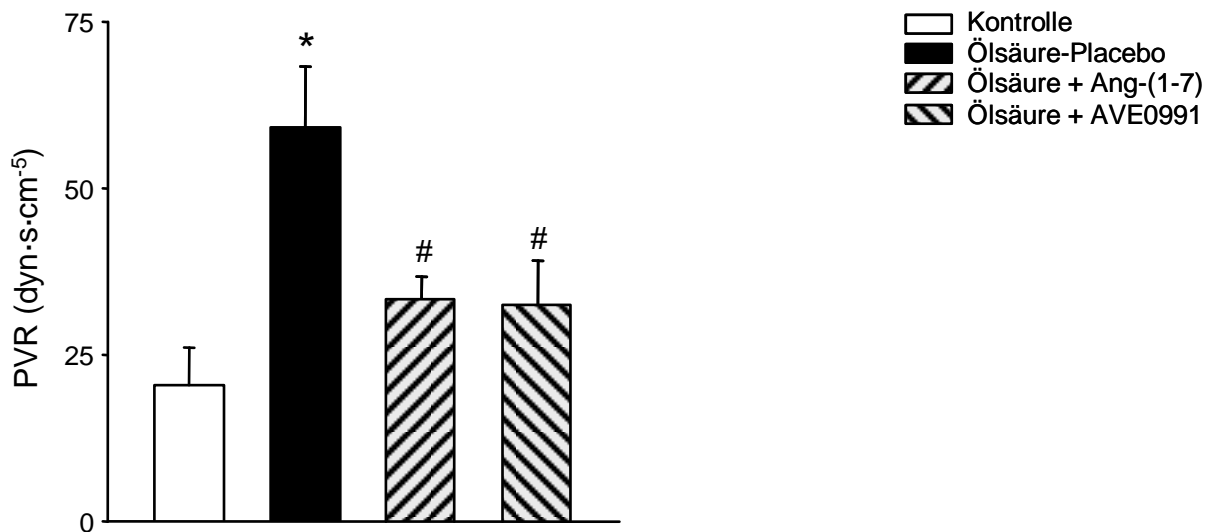


Abbildung 5: Auswirkungen von Angiotensin (1-7) und AVE 0991 auf den pulmonalvaskulären Widerstand. Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von jeweils n=8 Ratten; *p<0,05 vs Kontrolle; #p<0,05 vs Ölsäure-Placebo.

Dieses Ergebnis veranschaulicht somit wie auch in Bezug auf die Formation eines Lungenödems oder der Myeloperoxidaseaktivität ein einheitliches durchweg positives Bild.

4.2 *Mechanismus der von Ang-(1-7) vermittelten Regulation des Lungenschadens – Inhibition des Ang(1-7) Rezeptors Mas mit A779 und D-Pro⁷-Ang-(1-7)*

Nachdem die benefiziellen Auswirkungen von Ang-(1-7) auf den im Modell etablierten Lungenschaden aufgezeigt werden konnten, sollte im Folgenden näher untersucht werden, über welche Mechanismen Ang-(1-7) protektiv gegen die Ausbildung eines Lungenschadens wirkt.

Die Effekte von Angiotensin (1-7) können durch zwei unterschiedliche Antagonisten (A779 und D-Pro⁷-Ang-(1-7)) blockiert werden (Lautner et al., 2012). Die Wirkungsprofile dieser beiden Inhibitoren sind nicht völlig kongruent, was vermuten lässt, dass es mehr als einen Ang-(1-7) (Silva et al., 2007; Santos et al., 2003) Rezeptor gibt. Der MAS-Rezeptor wurde als einer der beiden Rezeptoren identifiziert, die molekulare Identität des zweiten Rezeptors hingegen wird noch diskutiert.

Im vorliegenden Modell des Ölsäure-induzierten Lungenschadens vermochten beide Rezeptorblocker, den normalisierenden Effekt von Ang-(1-7) auf den arteriellen Blutdruck und auf den pulmonalvaskulären Widerstand umzukehren (Abb.10).

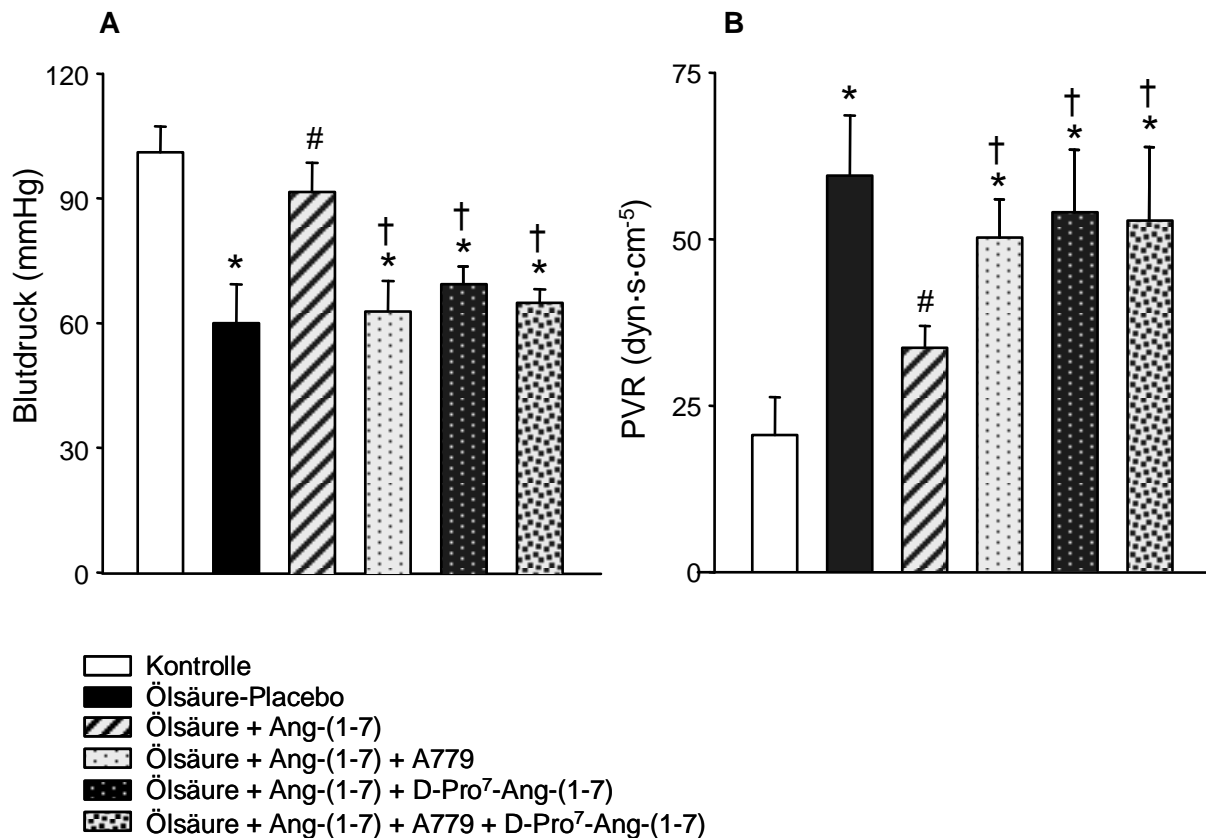


Abbildung 6 : Effekte von Angiotensin (1-7) allein oder in Kombination mit einem der beiden Angiotensin (1-7) Antagonisten A779 oder D-Pro⁷-Ang-(1-7) auf den arteriellen Blutdruck (A) und den pulmonalvaskulären Widerstand (B). Daten dargestellt als Mittelwert ± Standardfehler (SEM) von jeweils n=8 Ratten; *p<0,05 vs Kontrolle; #p<0,05 vs Ölsäure-Placebo, †p<0,05 vs Ölsäure-Placebo und Ölsäure + Angiotensin (1-7).

Die Kombination beider Ang-(1-7) Rezeptorenblocker ergab keinen zusätzlichen synergistischen Effekt auf die Hämodynamik, was darauf hinweist, dass es zwei individuelle Signalwege geben muss.

Bezüglich der charakteristischen Kenngrößen des Permeabilitäts-Lungenödems, also dem Anstieg des Feucht-/Trockengewichtsverhältnisses und der Proteinextravasation in den Alveolarraum, hatte A779 interessanterweise keine hemmenden Auswirkungen auf die durch Ang-(1-7) hervorgerufenen Verbesserungen der pulmonalvaskulären Barrierefunktion (Abb. 11), wohingegen D-Pro⁷-Ang-(1-7) die Ang-(1-7) vermittelte Stabilisation der Lungengefäßbarriere vollständig blockierte.

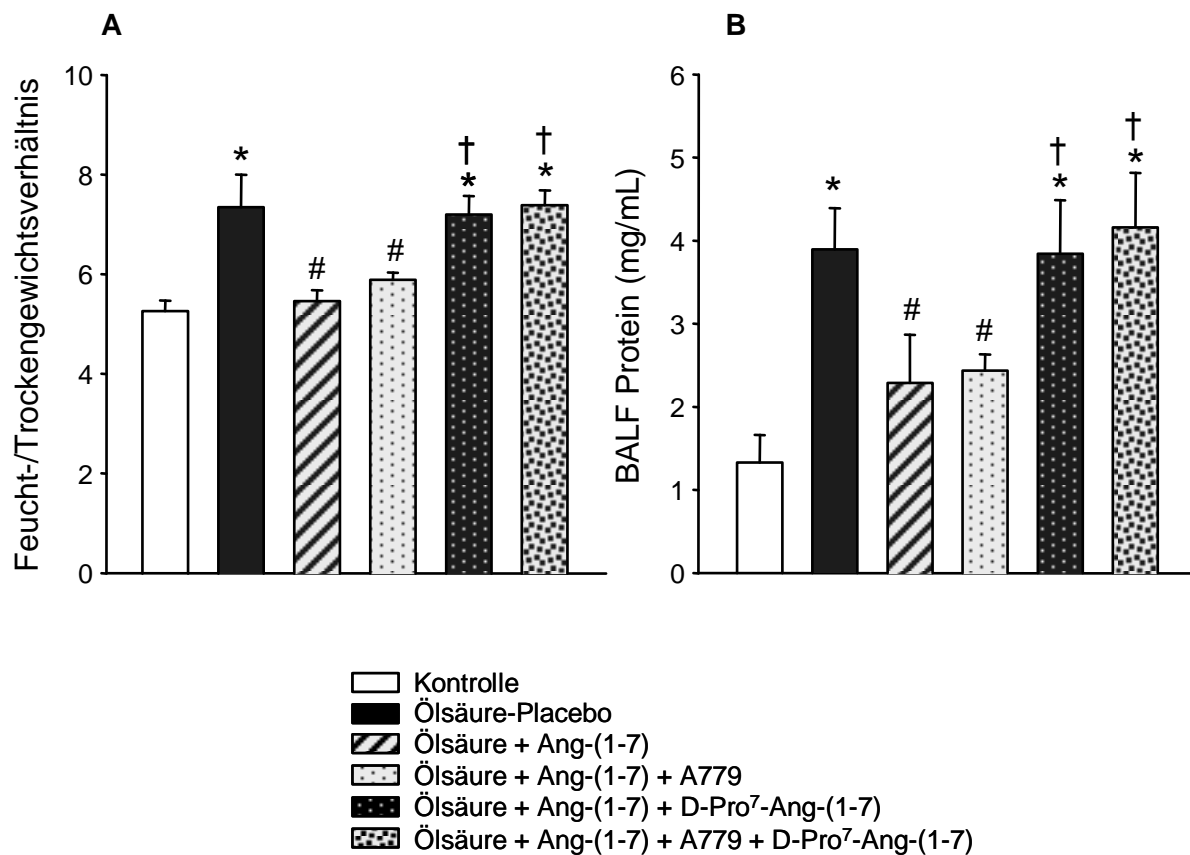


Abbildung 11: Anstieg des Feucht-/Trockengewichtsverhältnis (A) als auch der Proteinkonzentration (B) in der Lavageflüssigkeit in Kombination mit den Angiotensin (1-7) Antagonisten. Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von jeweils $n=8$ Ratten; * $p<0,05$ vs Kontrolle; # $p<0,05$ vs Ölsäure-Placebo, † $p<0,05$ vs Ölsäure-Placebo und Ölsäure + Angiotensin (1-7).

Demgegenüber war in Bezug auf die MPO-Aktivität im akuten Lungenschaden einzig A779 in der Lage, die positive Wirkung von Ang-(1-7) zu blockieren, D-Pro⁷-Ang-(1-7) jedoch nicht. In zusätzlichen Versuchsgruppen, in denen die Ang-(1-7) Rezeptorenblocker ohne gleichzeitige Gabe von exogenem Ang-(1-7) zugeführt wurden, hatten diese keine Auswirkungen auf den Schweregrad der pulmonalen und systemischen Schädigungen, die durch den Ölsäureschaden hervorgerufen wurden (Daten nicht gezeigt). Endogen gebildetes Ang-(1-7) scheint somit keinen effektiven Schutzmechanismus im Krankheitsbild des akuten Lungenschadens zu haben.

4.3 Blockade des AT₁-Rezeptors mit Irbesartan als alternativer Weg zur Verbesserung des ALI

In einer Studie von Imai et al. im Jahr 2005 wurde vermutet, dass die positiven Effekte von rekombinantem ACE2 im experimentellen Lungenschaden einer reduzierten Verfügbarkeit von Ang II und in der Folge einer geringeren Aktivierung von AT₁ Rezeptoren zuzuordnen seien. Dies wurde durch die Beobachtung unterstrichen, dass die Entwicklung eines Lungenschadens nach Salzsäureaspiration bei AT₁-defizienten Mäusen gegenüber Wildtyp-Tieren stark abgeschwächt war (Imai et al., 2005).

Um die alternative Hypothese zu testen, dass der zu beobachtende protektive Effekt einer AT₁ Defizienz oder Blockade in Wahrheit einer erhöhten Ang-(1-7) Bildung und der nachfolgenden Aktivierung nachgeschalteter Signalwege zuzuschreiben sei, wurde im Folgenden untersucht, inwiefern die positiven Effekte der AT₁-Blockade einer intakten Ang-(1-7) Rezeptorsignalwirkung bedurften.

Hierzu wurde eine Versuchsgruppe von Ratten vor Infusion der Ölsäure mit dem AT₁ Blocker Irbesartan behandelt. Ähnlich wie bei der Behandlung mit Ang-(1-7) im Ölsäure-induzierten Lungenschaden, normalisierten sich auch unter der Applikation von Irbesartan bei den Versuchstieren der arterielle Blutdruck (Abb. 12 A), der pulmonalvaskuläre Widerstand (Abb. 12 B), das Feucht-/Trockengewichtsverhältnis (Abb. 12 C), die Proteinextravasation in die bronchoalveoläre Lavageflüssigkeit (Abb. 12 D) und die Myeloperoxidaseaktivität im Lungengewebe (Abb. 12 E).

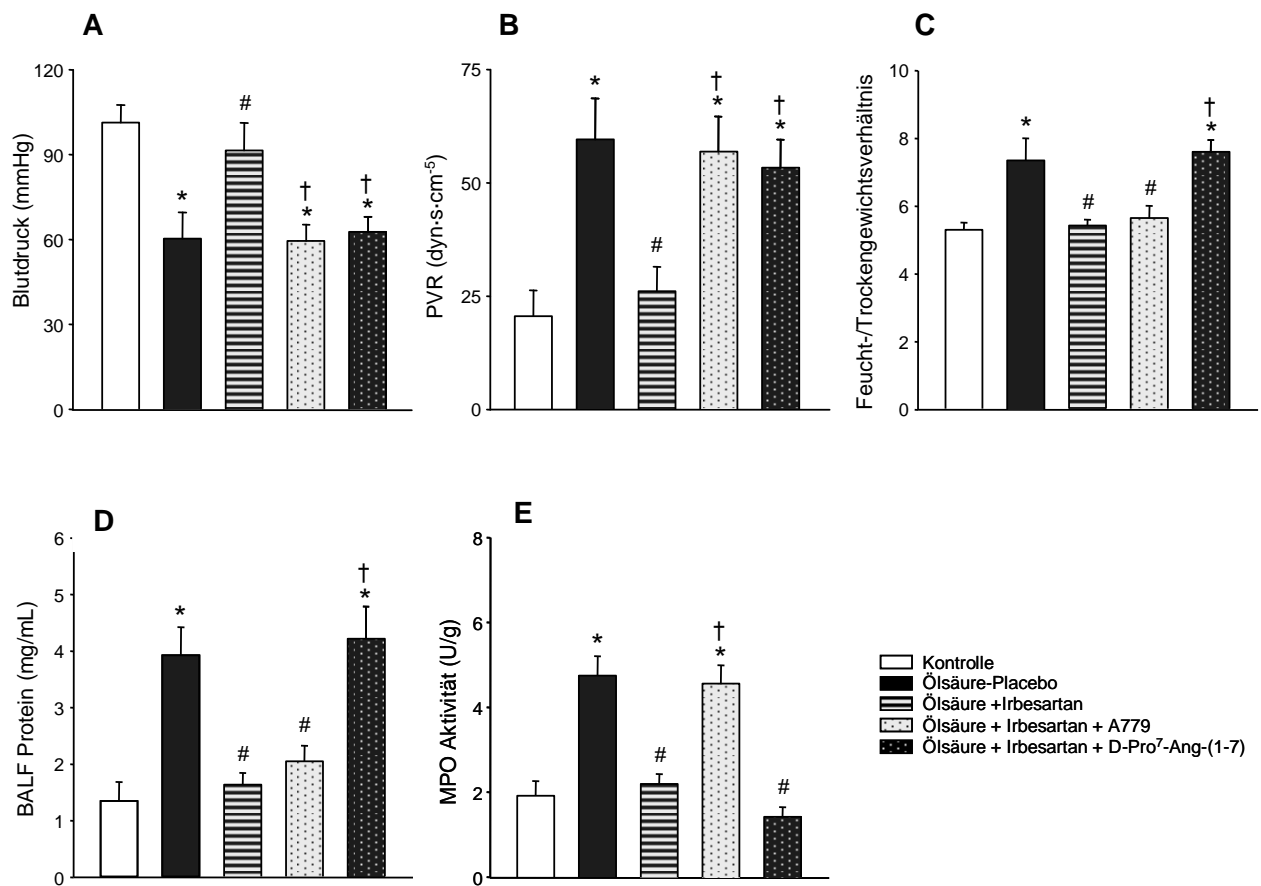


Abbildung 12: Auswirkungen des AT₁-Rezeptorblockers Irbesartan allein oder in Kombination mit einem der Angiotensin (1-7) Antagonisten A779 oder D-Pro⁷-Ang-(1-7) auf den arteriellen Blutdruck (A), den pulmonalvaskulären Widerstand (B), das Feucht-/Trockengewichtsverhältnis (C), die Proteinkonzentration in der Lavageflüssigkeit (D) und die Myeloperoxidaseaktivität (E). Daten dargestellt als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) von jeweils n=8 Ratten; *p<0,05 vs Kontrolle; #p<0,05 vs Ölsäure-Placebo, †p<0,05 vs Ölsäure-Placebo und Ölsäure + Irbesartan.

Im Anschluss wurden in zwei weiteren Versuchsgruppen die beiden Achsen des RAS-Systems blockiert, indem Irbesartan zur Blockade des AT₁-Rezeptors mit einem der beiden Ang-(1-7) Rezeptorblockern, A779 oder D-Pro⁷-Ang-(1-7), kombiniert infundiert wurde. Hierdurch sollte abgeklärt werden, ob die vorteilhafte Wirkung von Irbesartan auf einer vermehrten Aktivierung von Ang-(1-7) Rezeptoren beruht, d.h. ob durch Gabe von A779 oder D-Pro⁷-Ang-(1-7) in Kombination mit Irbesartan wieder eine Verschlechterung des ALI aufgetreten wäre.

Das Inhibitorprofil entsprach genau den Befunden wie bei einer Verabreichung von exogenem Ang-(1-7), da beide Inhibitoren die hämodynamischen Effekte (MAP, PVR) von Irbesartan hemmten, aber nur A779 die Verbesserung der MPO Aktivität verhinderte, während nur D-Pro⁷-Ang-(1-7) die Stabilisierung der Gefäßbarriere antagonisierte.

5 Diskussion

An einem Ölsäureschadensmodell der Ratte (Buelmann et al., 2009) wurde in der vorgelegten Arbeit ein neues Therapiekonzept zur Behandlung des akuten Lungenschadens vorgestellt. Die Applikation von Ölsäure ruft eine deutliche Entzündungsreaktion im Lungengewebe hervor. Die Infusion der Ölsäure führte zu einer Hypotonie, was ebenfalls in weiteren Studien beobachtet werden konnte (Anderson et al., 2009; Dodek et al., 1993), zu einem signifikanten Anstieg des PVR (Hubloe et al., 2003) und entsprechend zu einer Erhöhung des PAP (Zwissler et al 1995). Eine Zunahme der neutrophilen Granulozyten im Lungengewebe und der Leukozyten in der bronchoalveolären Lavage und ein erhöhtes Lungen Feucht/Trockengewicht sprechen ebenfalls für eine deutliche Entzündungsreaktion sowie eine damit einhergehende Einschränkung der pulmonalvaskulären Barrierefunktion, wie sie charakteristischerweise durch Ölsäure hervorgerufen werden.

Die Wirksamkeit von Ang-(1-7) über seine entsprechenden Rezeptoren könnte therapeutisch für die Behandlung des ALI eine entscheidende Möglichkeit darstellen und wurde in dieser Arbeit entsprechend in einem präklinischen Modell geprüft. Die Applikation von exogenem Ang-(1-7) bewirkte eine Abschwächung der durch Ölsäure verursachten Schädigung der alveolokapillären Barriere, eine Reduktion der Neutrophileninfiltration und stabilisierte gleichzeitig die systemischen hämodynamischen Perfusionsdrücke. Der protektive Effekt des Ang-(1-7) konnte ebenfalls mit dem nichtpeptidischen Ang-(1-7) Rezeptor Agonisten AVE0991 erzielt werden und von keinem der beiden Rezeptorinhibitoren über unterschiedliche Inhibitor-Profile blockiert werden.

Ang-(1-7) scheint in der Lage zu sein, diesen Schutz vor ALI und der damit verbundenen Schädigung der alveolokapillären Barriere und der sich anschließenden Invasion von Neutrophilen über zwei individuelle Signalwege gezielt zu vermitteln, da A779 nur die Inflammationsverbesserung hemmt und D-Pro⁷-Ang-(1-7) nur die Barriestabilisierung. Das bedeutet, dass es zwei verschiedene Rezeptoren für Ang-(1-7) geben muss, deren einer selektiv die barriere-protektiven, und der andere die anti-inflammatorischen Effekte vermittelt, während beide gemeinsam die hämodynamischen Effekte bewirken .

Die Experimente für den schützenden Effekt von Irbesartan im experimentellen Lungenschaden bewiesen, dass die nützlichen Effekte einer AT₁-Blockade oder eine Defizienz des Rezeptors vielleicht teilweise der Aktivierung des Ang-(1-7) Signalweges zuzuschreiben ist.

Seit der vergangenen Dekade wurde schon die Stimulation oder vermehrte Expression von ACE2 als präventive therapeutische Strategie im Zusammenhang mit kardiovaskulären Krankheiten, die nicht nur ALI/ARDS umfassen, vorgeschlagen und experimentell getestet. Beispiele hierfür sind die systemische oder pulmonale Hypertension (Diez-Freire et al., 2006). Eine ACE2 Überexpression übt einen positiven Einfluss auf hohen Blutdruck und Pathophysiologie des Herzens, welche durch Hypertension ausgelöst wird, aus. Ferreira et al. veranschaulicht, dass ACE2 therapeutisch relevant für die Behandlung und Kontrolle der pulmonalen Hypertension sein kann (Ferreira et al., 2009). Atherosklerose (Dong et al., 2008) zeigt, dass Überexpression von ACE2 zu einer Stabilisation bei der Arterienverkalkung führt und dass dieser Mechanismus vermutlich aus der vermehrten Bildung von gefäßprotektivem Ang-(1-7) aus vasokonstriktivem Ang II resultiert. Die protektiven Eigenschaften der ACE2/Ang-(1-7) Achse des RAS, hier gezeigt an einer experimentellen Studie am Auge, könnten als neue therapeutische Zielsetzung dienen, um die diabetische Vaskulopathie zu behandeln (Verma et al., 2012). Während diese Arbeiten in erster Linie von der Hypothese ausgehen, dass die schützende Wirkung von ACE2 in erster Linie auf eine verminderte Bioverfügbarkeit seines Substrates Ang II am AT₁-Rezeptor zurückzuführen sei, wurde im Jahr 2003 entdeckt, dass das ACE2 Produkt Ang-(1-7) selbst in der Lage ist, einen unabhängigen Signalweg zu stimulieren, der über die Bindung von Ang-(1-7) an den G-Protein gekoppelten Rezeptor Mas vermittelt wird (Santos et al., 2003).

Es wurde in einer Studie gezeigt, dass es Hinweise auf einen alternativen Signalweg innerhalb des RAS gibt, der den klassischen Effekten der ACE/Ang II/ AT₁ entgegenwirkt (Kostenis et al., 2005).

Entsprechend können protektive Effekte von ACE2 in Zusammenhang mit kardiopulmonalen Krankheitsbildern wie hypertensivem kardialen Remodelling (Mercure et al., 2008), pulmonaler Hypertension (Shenoy et al., 2010) und Lungenfibrose (Shenoy et al., 2010) repliziert werden, indem man Ang-(1-7) direkt appliziert oder indem es vermehrt exprimiert wird.

Die Vermutung lag nah, dass die positiven Effekte, die durch die Applikation von rekombinanten ACE2 im experimentellen ALI (Imai et al., 2005) erreicht wurden, vielleicht genauso durch die Gabe von exogenem Ang-(1-7) erreicht werden könnten.

Bisher wird Ang-(1-7) in der Literatur hauptsächlich mit protektiven Effekten im Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben (Ferreira et al., 2002; Loot et al., 2002; Soto-Pantoja et al., 2009). Auch AVE0991 wird in einer Studie von (Ebermann et al., 2008) eine positive Auswirkung auf die Herzfunktion zugeschrieben. Hier wurde ein Diabetes mellitus bei Sprague Dawley Ratten induziert und die Tiere wurden im Anschluss

mit AVE0991 gefüttert. Das Ergebnis dieser Studie war eine Verbesserung der Herzfunktion und der Blutdruck normalisierte sich.

Um den Rezeptor für Ang-(1-7) und AVE0991 eindeutig als den MAS-Rezeptor zu identifizieren, wurde in einer Studie gezeigt, dass AVE0991 einen antidiuretischen Effekt hat und der Rezeptorblocker A779 in der Lage ist diesen zu blockieren und dieser Effekt bei Mas-knockout Mäusen abgeschwächt wurde. Des Weiteren konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass in Nierenzellen der Mäuse die spezifische Bindung von ^{125}I -Ang-(1-7) durch AVE ersetzt wurde. Der antidiuretische Effekt wurde gänzlich von AT_2 Antagonisten blockiert und auch zum Teil von AT_1 Antagonisten (Pinheiro et al., 2004).

5.1 *Protektive Effekte des Angiotensin (1-7)*

In zwei Mausmodellen, in denen der Lungenschaden beatmungsinduziert oder durch Säureaspiration verursacht wurde, konnten durch die intravenöse Ang-(1-7)-Infusion die charakteristischen Eigenschaften eines ALI abgeschwächt werden.

In einer erst kürzlich durchgeführten Versuchsreihe bei Ratten eines doppelten Lungenschadensmodells kam es zu Hypoxämie, histologischen Anzeichen eines Lungenschadens und entzündungsbedingtem Ansteigen der Zytokinkonzentrationen in der BALF. Das Verhältnis der ACE2/ACE Aktivität in der BALF konnte bis zu 400fach reduziert werden. Dies wurde durch die Applikation von zyklischem Ang-(1-7) (Dosierung $50 \text{ pmol} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) erreicht und zeigt somit eindeutige Parallelen zur vorliegenden Arbeit (Wösten-van Asperen et al., 2008). Zudem zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass derartige protektive Effekte ebenfalls erreicht werden, wenn die Ang-(1-7)-Infusion erst 30 Minuten nach Induktion des ALI begonnen wird. Somit kann Ang-(1-7) in der frühen exsudativen Phase der Erkrankung nicht nur ein prophylaktisches, sondern auch ein therapeutisches Potential zugesprochen werden. Ang-(1-7) vermochte auch, den Anstieg des PVR im Ölsäuremodell abzuschwächen. Die Freisetzung vasoaktiver Mediatoren führt zur Vasokonstriktion und damit zum Anstieg des PVR und einer perivaskulären Ödembildung (Schuster et al., 1994).

Ang-(1-7) verhindert die systemische Hypotension, aktiviert die endotheliale NO-Synthase in vitro (Sampaio et al., 2007) und verursacht somit eine NO-abhängige Vasodilatation in Aortenringen bei Mäusen (Lemos et al., 2005). Somit könnte Ang-(1-7) potentiell bei systemisch entzündlichen Prozessen vasodilatorische Effekte bis zum Punkt des zirkulatorischen Schocks verstärken. Im Gegensatz dazu zeigen die Ergebnisse in dieser Arbeit, dass Ang-(1-7) den systemischen Blutdruck wieder herstellt. Dies beweist nicht nur die klinische Sicherheit dieser Strategie, sondern deckt auch einen dualen hämodynamischen Vorteil auf, indem Ang-(1-7) den rechten Ventrikel entlasten kann

während gleichzeitig die systemischen Perfusionsdrücke adäquat aufrechterhalten werden können.

Diese Effekte waren nicht analog mit den Veränderungen im PaO₂. Diese sind im Ölsäuremodell häufig geringer und passend zur raschen Neuverteilung des Blutflusses (Schuster et al., 1994). Diese Erkenntnisse reflektieren vielleicht gleichzeitig einen protektiven Effekt von Ang-(1-7) auf den Myokardschaden nach einer systemischen Ölsäureinfusion (Schuster et al., 1986).

5.2 Auswirkungen der Rezeptoragonisten und -antagonisten

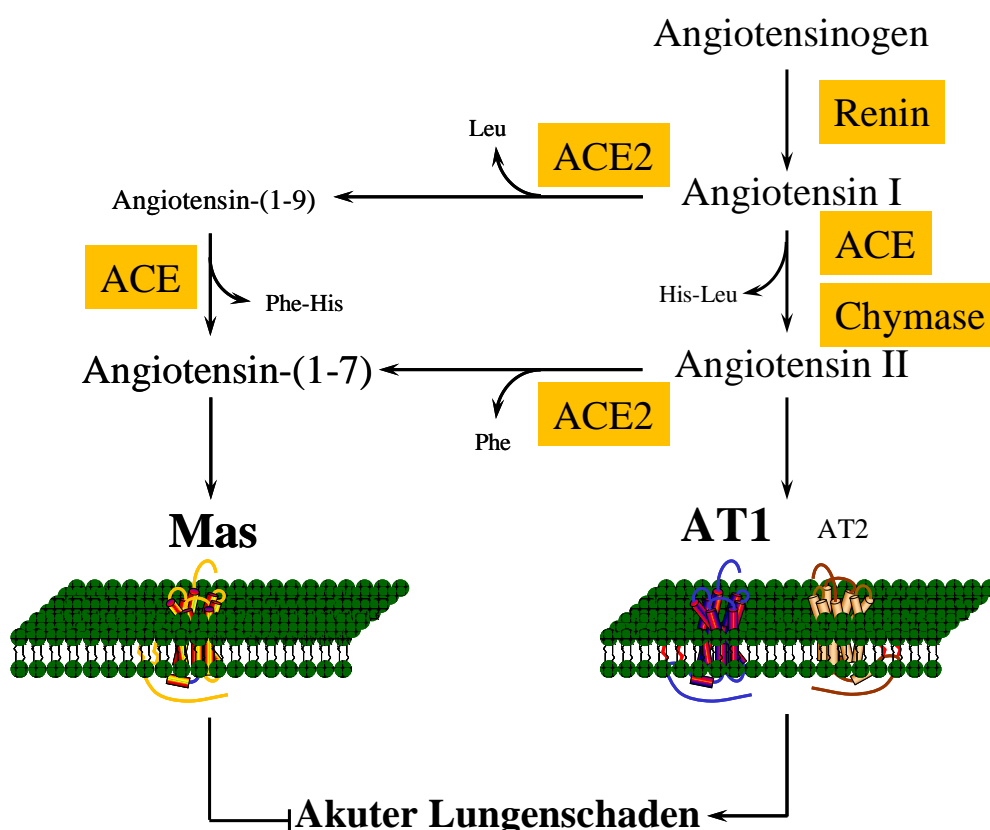
Die Behandlung mit Ang-(1-7) führte auch zu einem Anstieg der ACE2/ACE Aktivität. Dies lässt die Vermutung zu, dass die Behandlung mit exogenem Ang-(1-7) die protektiven Effekte nicht nur über eine direkte Aktivierung der Ang-(1-7) Rezeptoren, sondern parallel über die Stimulation der Bildung von endogenem Ang-(1-7) zu vermitteln vermag. Dieselben Effekte wie für exogenes Ang-(1-7) konnten, wenn auch in geringerem Ausmaß, durch die Applikation des nichtpeptidischen MAS-Rezeptor Agonisten AVE0991 erreicht werden. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Ang-(1-7) seine Wirkung direkt und nicht über einen zweiten Metaboliten erreicht. Diese Erkenntnis wird auch dadurch unterstrichen, dass in dieser Studie gezeigt werden konnte, dass die Wirkung von exogenem Ang-(1-7) direkt durch zumindest jeweils einen der beiden Rezeptorantagonisten effektiv geblockt werden konnte.

Die Rezeptorantagonisten zeigten zum Teil unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der Blockade der positiven Auswirkungen von Ang-(1-7). Beide hemmten die Effekte von Ang-(1-7) auf den AP und den PVR. Dies impliziert, dass bzgl. der hämodynamischen Wirkungen von Ang-(1-7) die beiden Signalwege - MAS abhängig und MAS unabhängig – synergistisch reagieren müssen. Im Gegensatz dazu werden die barrierestabilisierenden Eigenschaften von Ang-(1-7), welches sowohl das Ausmaß der Ödembildung als auch die Proteinextravasation verringert, ausschließlich über D-Pro⁷-Ang-(1-7) blockiert. Die Ansammlung der Neutrophilen wurde hingegen nur von A779 blockiert. In einer Studie von Kluskens et al. blockiert D-Pro⁷-Ang-(1-7) sowohl die vasodilatorischen Effekte von natürlichem als auch modifiziertem Ang-(1-7) (Kluskens et al., 2009).

Diese Gegensätzlichkeit der Inhibitorenwirkung scheint dem klassischen Modell, nämlich dass die Antwort auf die Entzündung und die zerstörte Barrierefunktion im ALI unweigerlich miteinander verknüpft sein müssen, zu widersprechen. Dies lässt die Vermutung zu, dass auch wenn sich die Ansammlung von Entzündungszellen und die Durchlässigkeit der Gefäßbarriere gegenseitig verstärken beide Antworten auf einen Schaden individuell gesteuert werden können und somit auch unabhängig voneinander aktiviert oder inhibiert werden.

In zusätzlichen Kontrollexperimenten konnte zudem beobachtet werden, dass wenn kein exogenes Ang-(1-7) verabreicht wurde und eine Blockade durch A779 oder D-Pro⁷-Ang-(1-7) erfolgte, dies im Ölsäure-induzierten Lungenschaden nicht zu einer weiteren Verschlechterung führte. Dieses Ergebnis passt zu der Erkenntnis, dass Ang-(1-7) Rezeptorantagonisten die positiven Auswirkungen von exogenem Ang-(1-7) aufheben, jedoch nicht den Lungenschaden im Vergleich zur Ölsäureversuchsgruppe verschlechtern. Demnach scheint endogen gebildetes Ang-(1-7) keine relevante Schutzfunktion in diesem Szenario zu haben. Dies stimmt mit einer kürzlich von Wösten-van Asperen durchgeführten Studie überein, die zeigt, dass das Verhältnis der ACE2/ACE Aktivität in der BALF in einem doppelten Lungenschadenmodell an der Ratte bis zu 400fach reduziert wird (Wösten-van Asperen et al., 2011). Demgegenüber wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Veränderung der Aktivität von ACE2 und ACE und deren entsprechendem Verhältnis im Lungengewebe nach Ölsäuregabe im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden. Bemerkenswerterweise waren auch die ACE2 Proteinlevel in der BALF in der Studie von Wösten-van Asperen während ALI nicht reduziert. Dies lässt vermuten, dass eventuell in dieser Studie die ACE2 Aktivität in der BALF von einem endogenen ACE2 Inhibitor gehemmt wurde (Wösten-van Asperen et al., 2011).

Eine Blockade oder Fehlen des AT₁-Rezeptors führt zu einem Schutz vor ALI. Dies wurde erstmals von Imai et al. (2005) berichtet. In deren Studie konnte beobachtet werden, dass ein Anstieg in der Lungenelastizität bei Mäusen und die Proteinextravasation als Antwort auf Säureinstillation bei Mäusen ohne AT₁-Rezeptor oder bei denen, die mit einem AT₁-Inhibitor wie Losartan behandelt wurden, stark abgeschwächt war (Abb. 13).



Dies ließ die Autoren vermuten, dass der protektive Effekt von rekombinantem ACE2 in ihrem Modell mit einer reduzierten Aktivität am AT₁-Rezeptor zu begründen sei. Viele ähnliche Studien (Liu et al., 2009; Yao et al., 2008) in experimentellen Lungenschadensmodellen wie beispielsweise in beatmungsinduzierten oder durch die Applikation von Lipopolysaccharid hervorgerufen, konnten durch die Behandlung mit Losartan ebenfalls einen schützenden Effekt erzielen.

Versuche zur pulmonalen Hypertonie und zum Myokardinfarkt zeigen, dass nach Myokardinfarkt und anschließender Verabreichung von Irbesartan eine Normalisierung von Füllungsdrücken, Hypertension und rechtsventrikulärer Hypertrophie erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit wurde Irbesartan als AT₁-Inhibitor benutzt, was sich protektiv auf den ölsäureinduzierten Lungenschaden auswirkte. Dies konnte jedoch durch eine gleichzeitige Applikation von A779 oder D-Pro⁷-Ang-(1-7) aufgehoben werden. Dies lässt eine alternative Erklärung zur protektiven Wirkung von rekombinantem ACE2 oder der AT₁-Blockade im ALI zu. Die Schutzfunktion taucht zusätzlich zur gesteigerten Ang-(1-7) Formation und Stimulation der spezifischen Rezeptorsignalwege auf und zwar eher als zur alleinigen Inhibition des AT₁-Rezeptorsignalweges. Somit scheinen ein gezieltes Ansprechen von Ang-(1-7) und die damit verbundenen Rezeptoren vielversprechend zu sein.

5.3 Bedeutung des Angiotensin (1-7) im Zusammenhang mit unterschiedlichen Therapieansätzen

Gegenwärtig ist noch nicht viel über die zellulären Mechanismen bekannt, über die Ang-(1-7) seine protektiven Effekte beim ALI entfaltet. Unter anderem konnte gezeigt werden, dass eNOS unter Wirkung von Ang-(1-7) durch reziproke Phosphorylierung/Dephosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷/Thr⁴⁹⁵ (Sampaio et al., 2007) stimuliert wird, und dies die bradykinininduzierte endotheliale NO-Freisetzung erhöht (Peiro et al., 2007). Zudem zeigen Untersuchungen an Mauseartenringen, dass die NO-abhängige Vasodilatation über Signalwege, die von A779 blockiert werden oder in MAS-defizienten Mäusen fehlen, vermittelt wird (Lemos et al., 2005). Bemerkenswerterweise besitzt endothelial generiertes NO nicht nur potente antiinflammatorische Eigenschaften (Moncada et al., 2006), sondern ist auch in der Lage, die mikrovaskuläre Lungenbarriere über eine Reihe von ineinandergreifenden Signalwegen zu stabilisieren (Kuebler et al., 2011). Dies legt den Schluss nahe, dass die Stimulation der endothelialen NO Freisetzung zu den protektiven Effekten von Ang-(1-7) im ALI relevant beitragen könnte.

Alternativ oder zusätzlich vermag Ang-(1-7) seinen therapeutischen Nutzen auch durch antiadhäsive Effekte auf Thrombozyten, die in der Entstehung des ALI eine Schlüsselrolle

spielen (Kuebler et al., 2006; Tabuchi et al., 2008), zu vermitteln (Fraga-Silva et al., 2008; Rajendran et al., 2005).

Abschliessend kann man feststellen, dass im Hinblick auf den bisher vollständigen Mangel an effektiven pharmakologischen Substanzen zur Therapie des akuten Lungenschadens die hier dargelegten protektiven Effekte von Ang-(1-7) und dessen Analoga eine attraktive neue Behandlungsmöglichkeit für diese häufige, schwerwiegende und oft letale Erkrankung eröffnen. Die Umsetzung der Befunde in die Klinik erscheint umso mehr realistisch, als Ang-(1-7) derzeit bereits in klinischen Phase II Studien für die Behandlung von kardiovaskulären, hämatologischen und neoplastischen Erkrankungen getestet wird (Ferreira et al., 2012; Heringer-Walther et al., 2009; Petty et al., 2009).

Somit stellen Ang-(1-7) oder entsprechende Analoga eine vielversprechende therapeutische Strategie zur Prävention oder Behandlung des ALI/ARDS in der Klinik dar.

5.4 **Methodische Erwägungen**

Das Ölsäure-Modell der akuten Lungenschädigung wird in der ARDS-Forschung häufig verwendet (Heuer et al., 1994; Jambrik et al., 2010). Es gibt eine Vielzahl von Modellen, die sich zur Untersuchung der Pathogenese und Therapie des akuten Lungenschadens im Tiermodell eignen (Matute Bello et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde sich für das Ölsäuremodell an der Ratte entschieden, weil es das klinische Bild der Frühphase des akuten Atemnotsyndroms repräsentiert. So entspricht das pathophysiologische Bild doch im Großen und Ganzen dem der klinischen Situation (Schuster et al., 1995). So finden sich sowohl beim Ölsäure-induzierten Lungenversagen, als auch in der exsudativen Phase des ARDS ein nicht kardial-bedingtes Lungenödem, intravaskuläre Koagulation, endotheliale und epitheliale Zellnekrosen sowie alveoläre Einblutungen. Das extravaskuläre Lungenwasser steigt sowohl im Ölsäure-Modell als auch bei ARDS-Patienten um das Zwei- bis Dreifache an. Das ARDS geht häufig mit einer Sepsis und den damit verbundenen systemischen Entzündungsvorgängen einher. Demgegenüber ruft Ölsäure eine Schädigung der Endothelzellen hervor. Daneben kommt es aber auch zu einer erheblichen Entzündungsreaktion gezeigt durch die MPO-Aktivität, die dann zusätzlich zum Lungenschaden beiträgt. Durch die Injektion der Ölsäure wird kein gleichmäßiges Schädigungsmuster erzielt insofern als die histopathologischen Veränderungen in den dorsalen Lungenbezirken stärker ausgeprägt sind als in den ventralen (Quintel et al., 1998), was sich wiederum mit dem klinischen Bild des ARDS deckt. Intravenöse Ölsäureinfusion führt zu Hypoxämie, einem proteinreichen Lungenödem und zu einer Leukozyteninfiltration und stimuliert somit die charakteristischen Eigenschaften der akuten exsudativen Phase des ARDS (Schuster et al., 1995). Ölsäure spielt ebenso eine kritische Rolle im klinischen Bild des ARDS, da erhöhte Serumkonzentrationen und der Aufnahme von OA in Phospholipide des Surfactant wirkungsvolle Prädiktoren dieser Erkrankung sind (Bursten et al., 1996, Schmidt et al., 2001). In dieser Studie wurde vier Stunden nach der Ölsäureapplikation die Versuchsdauer beendet basierend auf vorangegangenen Studien, die von einem Höhepunkt der Inflammation nach OA zwischen ein und vier Stunden berichten (Gust et al., 1998, Suttorp et al., 1993).

Alternativ zum Ölsäureschadensmodell wäre auch eine Induktion des Lungenschadens durch eine maschinelle Beatmung möglich. Dies führt jedoch eher bei einer bereits vorgeschädigten Lunge zu einer Lungenschädigung und wird als beatmungsinduzierter Lungenschaden (*ventilator associated lung injury*, VALI) bezeichnet (Frank et al., 2003; Dreyfuss et al., 1998). Dieses Modell kam für diese Untersuchungsreihe nicht in Betracht, da die Versuchstiere zu Beginn des Versuchs gesund waren. Eine weitere Möglichkeit ist die

Induktion eines Säureaspirationsschadens. Bei dieser Methode ist jedoch keine deutliche Ausprägung des Lungenödems zu verzeichnen und kommt somit ebenfalls nicht in Betracht. (Matute-Bello et al., 2008)

Das Modell der ölsäureinduzierten Lungenschädigung war in der Arbeitsgruppe bereits erfolgreich etabliert (Buelmann et al., 2008) und sehr gut reproduzierbar und eignete sich somit optimal für dieses Versuchsvorhaben. An dieser Stelle muss jedoch noch betont werden, dass es sich bei der Induktion des Lungenschadens durch die intravenöse Injektion von Ölsäure nur um ein Modell handelt. Es gibt keine Hinweise auf die Ätiologie des ARDS und ebenso wenig über die sich an die Frühphase anschließenden pathophysiologischen Veränderungen der geschädigten Lunge. Es gewährt einen Einblick in ein kurzes Zeitfenster von dynamisch ablaufenden Prozessen, die eine große Ähnlichkeit mit der akuten Frühphase des ARDS aufweisen.

5.5 Veterinärmedizinische Relevanz

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich vorrangig mit der klinischen Relevanz des ARDS bezogen auf die humanmedizinische Situation, jedoch können diese Fragestellungen und Aspekte grundsätzlich auch auf die Veterinärmedizin angewendet werden. Prädisponierende Erkrankungen, wie Polytrauma, Sepsis, Pneumonie oder Aspiration, auf die ca. 75% der humanen ARDS Fälle zurückgehen, finden sich in gleichem Maße auch bei zahlreichen Tierspezies wieder. Entsprechend wird ein natürlich vorkommendes, also nicht experimentell erzeugtes und mit dem humanen ALI/ARDS vergleichbares akutes Lungenversagen bei Hunden (Hunter et al., 2001; Jarvinen et al., 1995; Lopez et al., 1995; Parent et al., 1996) und Katzen beschrieben. Bei Pferden kann im Zusammenhang mit einer Perilla-Keton-Intoxikation ein ARDS-ähnliches Krankheitsbild, das aufgrund der entsprechenden pathomorphologischen Befunde auch als „interstitielle proliferative Pneumonie“ bezeichnet wird, diagnostiziert werden

(http://elib.tiho-hannover.de/dissertations/vennerm_ws03.pdf,
<http://www.dgp2005.de/abstract/pn154.pdf?PHPSESSID=c29a38b07658bbe28b9f45ffee8fd69b>).

Bei Rindern kann ein ARDS im Zusammenhang mit einer Bovinen-Synzytial-Virus-Infektion auftreten. Aufgrund der immer besseren Diagnose- und Therapiemöglichkeiten, insbesondere auf dem Gebiet der Kleintiermedizin, erlangen schwerwiegende und lebensbedrohliche Erkrankungen wie das ARDS immer mehr klinische Bedeutung (Lium et al., 1983; Frevert et al. 1992). So werden inzwischen Hunde und Katzen mit akutem Lungenversagen, verursacht z.B. durch Polytraumen (Autounfälle), Pneumonien, Beinahe-

Ertrinken, Stromschlag oder Rauchgasvergiftungen in veterinärmedizinischen Intensivstationen standardmäßig künstlich beatmet (Suter, P. Kohn, B., 2006).

Daher können die Erkenntnisse dieser Arbeit nicht nur für die Therapie des humanen ARDS von Nutzen sein, sondern sich auch positiv auf veterinärmedizinisch relevante Lungenerkrankungen auswirken, obwohl eine umfangreiche Therapie durch die hohen Kosten, die durch die Patientenbesitzer getragen werden müssen, zurzeit noch begrenzt erscheint.

6 Zusammenfassung

Das akute Lungenversagen mit einer Letalität von bis zu 40 % stellt nach wie vor eine der zentralen Herausforderungen der modernen Intensivmedizin dar.

Seit der erstmaligen Beschreibung des *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) im Jahre 1967 gibt es bis heute keinerlei Therapiemöglichkeiten, welche die Morbidität und Mortalität dieser lebensbedrohlichen Erkrankung senken.

Die Pathophysiologie des ARDS erstreckt sich auf eine therapieresistente Hypoxämie, ein Permeabilitätslungenödem, eine verminderte pulmonale Compliance und häufig damit einhergehend einer pulmonalarteriellen Hypertonie (PAH). Die Höhe der PAH korreliert mit der Schwere der Lungenschädigung.

Jüngst wurde gezeigt, dass rekombinantes Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2) Mäuse vor dem akuten Lungenversagen schützt. Dieser Effekt ist gekennzeichnet durch die reduzierte Bioverfügbarkeit des Angiotensin II und abgeschwächte Aktivierung dessen Rezeptors AT₁. Die Hypothese dieser Arbeit war, da ACE2 Ang II zu Ang-(1-7) umwandelt, dass dieser Effekt alternativ über einen Ang-(1-7) Rezeptor, und zwar die Stimulation des MAS-Rezeptors, vermittelt wird.

Das Ölsäuremodell weist eine hohe pathophysiologische Ähnlichkeit mit dem ARDS auf. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde es daher als ein stabiles und reproduzierbares Lungenschädigungsmodell genutzt. Durch die zentralvenöse Injektion von 0,2 g/kg KG Ölsäure wurde innerhalb eines Versuchszeitraums von 240 min eine stabile Lungenschädigung erzielt. Diese war durch eine gering- bis mittelgradige pulmonale Hypertonie, systemische Hypotonie und verschiedene spezifische gemessene Entzündungsparameter des Lungengewebes wie beispielsweise ein Lungenödem und die Plasma-Protein-Extravasation gekennzeichnet.

In dem Modell wurden die Effekte von intravenös infundiertem Ang-(1-7) in drei experimentellen Modellen untersucht und die Rolle von Ang-(1-7) und AT₁ Rezeptoren als Schutz vor dem akuten Lungenversagen erforscht.

Eine kontinuierliche Ang-(1-7)- beziehungsweise AVE0991 Infusion, die 30 min nach Verabreichung der Ölsäure gegeben wurde, schützte die Ratten vor dem akuten Lungenversagen. Erwiesen wurde dies durch ein reduziertes Lungenödem, Plasma-Protein-Extravasation sowie Myeloperoxidaseaktivität als Indikator für die Akkumulation von neutrophilen Granulozyten.

Der durch Ölsäureinfusion bedingte Blutdruckabfall normalisierte sich über den Versuchsverlauf wieder und eine Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands als Charakteristikum für die akute Phase des Lungenschadens wurde ebenfalls verhindert.

Diese Befunde identifizierten die Gabe von Ang-(1-7) und AVE0991 aufgrund ihrer protektiven, über Ang-(1-7) Rezeptoren vermittelten Wirkung im experimentellen akuten Lungenschaden als vielversprechenden neuen Therapieansatz zur Behandlung des ARDS.

Um die an diesem Mechanismus beteiligte Signaltransduktion genauer zu analysieren, wurde die Rolle von Ang-(1-7) Rezeptoren untersucht, indem die Antagonisten A779 und D-Pro⁷-Ang-(1-7) verwendet wurden. Diese Rezeptorantagonisten haben unterschiedliche Wirkprofile und inhibieren auf unterschiedliche Weise Ang-(1-7) Rezeptoren, von denen einer unter Umständen der MAS-Rezeptor ist. Dies geschah sowohl mit alleiniger Verabreichung der jeweiligen Antagonisten, wie auch in Kombination mit exogen zugeführtem Ang-(1-7).

Im weiteren Verlauf wurde nochmals überprüft, ob über ACE2-Effekte und den Abbau von AngII und die verminderte Stimulation von AT₁ ebenfalls eine Reduzierung der Lungenschädigung erfolgt. Hierzu wurden Versuche mit dem AT₁ Rezeptorantagonisten Irbesartan durchgeführt.

Die Resultate der Untersuchungen zu Irbesartan weisen darüber hinaus darauf hin, dass auch die benefiziellen Effekte einer pharmakologischen Hemmung des AT₁ Rezeptors zumindest teilweise über eine vermehrte Bildung von Ang-(1-7) Rezeptoren vermittelt werden. Beide Ang-(1-7) Antagonisten hemmten die protektive Wirkung von Irbesartan auf den Blutdruck und führten zu einer Erhöhung des pulmonalvaskulären Widerstands. Der Unterschied der beiden Inhibitoren bestand darin, dass A779 die Myeloperoxidaseaktivität nicht abschwächen konnte und D-Pro⁷-Ang-(1-7) die Stabilisierung der Gefäßbarriere antagonisierte. Somit führte die Verabreichung dieser Antagonisten wieder zu einer Verschlechterung des OA-vermittelten Lungenschadens.

Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal die Effekte von Angiotensin (1-7) und dessen nichtpeptidischen Agonisten AVE0991 im Ölsäuremodell des induzierten Lungenschadens. Diese Ergebnisse können als Grundlage in der Behandlung des akuten Lungenversagens genutzt werden und bieten eine vielversprechende neue Therapiemöglichkeit.

7 Summary

New therapy concept in treatment of the acute respiratory distress syndrome

The acute respiratory distress syndrome with a mortality rate of up to 40% continues to be one of the central challenges of modern intensive care.

Since the initial characterization of the Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) in 1967 there have been no therapeutic approaches to lower morbidity and mortality in this life-threatening disease until now.

The pathophysiology of the ARDS extends to a therapy-resistant hypoxemia, a permeability pulmonary edema, reduced pulmonary compliance and frequently an associated pulmonary arterial hypertension (PAH). The level of the PAH correlates with the severity of the lung damage.

Recently, recombinant angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) was shown to protect mice from acute lung injury (ALI). This effect is attributed to reduced bioavailability of angiotensin II and attenuated activation of its receptor AT_1 . Since ACE2 metabolizes angiotensin II to Ang-(1-7), we hypothesized that this effect alternatively is mediated via activation of Ang-(1-7) receptor, the receptor MAS.

The oleic acid model exhibits many pathophysiological similarities with acute respiratory failure. Therefore, it was used as a stable and reproducible model of lung damage within the scope of the present thesis.

Central venous injection of 0.2 g/kg body weight oleic acid induced a stable lung damage within a trial period of 240 min. This was characterized by a low- to medium-grade pulmonary hypertension, systemic hypotension and various specifically measured inflammatory parameters of the lung tissue such as, for example, pulmonary edema and protein extravasation. In this model we investigated the effects of intravenously infused Ang-(1-7) in three experimental models and probed for the role of Ang-(1-7) and AT_1 receptors in the protection from acute lung failure. Continuous infusion of Ang-(1-7) respectively AVE0991 starting 30 min after administration of oleic acid, protected rats from ALI. This was evident by reduced lung edema, protein extravasation, myeloperoxidase activity which was an indication for the accumulation of neutrophils granulocytes.

The blood pressure drop due to the oleic acid infusion normalizes again in the course of the trial, and an increase of the pulmonary-vascular resistance as characteristic for the acute phase of the lung damage is also prevented.

These findings identify the administration of Ang-(1-7) and AVE0991 as a promising new therapy approach to treat the ARDS due to their beneficial effect transmitted via Ang-(1-7) receptors in the experimental acute respiratory distress.

To analyze the signal transduction of this mechanism more precisely, the role of Ang-(1-7) receptors was tested employing the antagonists A779 and D-Pro⁷-Ang-(1-7). These receptor antagonists have different action profiles and inhibit Ang-(1-7) receptors in different ways, one of which may possibly be the receptor MAS. This occurred both with sole administration of the respective antagonists and in combination with exogenously supplied Ang-(1-7).

Furthermore, it has been verified whether a reduction of the lung damage will also take place via ACE2 effects and the breakdown of AngII as well as reduced stimulation of AT₁. For this purpose, trials were conducted with the AT₁ receptor antagonist Irbesartan. The results regarding Irbesartan also indicate that the beneficial effects of a pharmacological blocking of the AT₁ receptor, are, at least in part, mediated via an increased formation of Ang-(1-7) receptors. Both Ang-(1-7) antagonists blocked the protective effect of Irbesartan on blood pressure and led to an increased pulmonary-vascular resistance. The difference in the blockade was that A779 could not attenuate the activity of the myeloperoxidase and D-Pro⁷-Ang-(1-7) blocked the stabilisation of the vascular barrier. Therefore the administration of these antagonists again led to a deterioration of the OA-mediated lung damage. These data first demonstrate the effects of Ang-(1-7) and its non-peptidic analogue AVE0991 in the oleic acid induced lung injury model. These findings can be taken as a basis for a new promising therapeutic strategy for the treatment of ALI.

8 Literatur

1. Abel SJ, Finney SJ, Brett SJ, Keogh BF, Morgan CJ, Evans TW (1998). Reduced mortality in association with the acute respiratory distress syndrome (ARDS). *Thorax*. 53: 292-294.
2. Albiston AL, McDowall SG, Matsacos D, Sim P, Clune E, Mustafa T (2001). Evidence that the angiotensin IV (AT(4)) receptor is the enzyme insulin-regulated aminopeptidase. *J Biol Chem*. 276: 48623-48626.
3. Alescio-Lautier B, Paban V, Soumireu-Mourat B (2000). Neuromodulation of memory in the hippocampus by vasopressin. *Eur J Pharmacol*. 405: 63-72.
4. Ambroz C, Clark AJ, Catt KJ (1991). The mas oncogene enhances angiotensin-induced $[Ca^{2+}]_i$ responses in cells with pre-existing angiotensin II receptors. *Biochim Biophys Acta*. 1133: 107-111.
5. Anderson SG, Sanders TA, Cruickshank JK (2009). Plasma fatty acid composition as a predictor of arterial stiffness and mortality. *Hypertension*. 53: 839-845.
6. ARDSNet (2000). Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. *N. Engl. J. Med*. 342: 1301–1308.
7. Ardaillou R (1997). Active fragments of angiotensin II: enzymatic pathways of synthesis and biological effects. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 6: 28-34.
8. Ardaillou R (1999). Angiotensin II receptors. *J Am Soc Nephrol*. 10 Suppl 11: 30-39.
9. Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE (1999). Acute respiratory distress in adults. *Lancet*. 2: 319-323.
10. Bacani C, Frishman WH (2006). Chymase: a new pharmacologic target in cardiovascular disease. *Cardiol Rev*. 14: 187-193.
11. Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, Carlet J, Falke K, Hudson L (1994). The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med*. 149: 818-824.

12. Bevan EG, Connell JM, Doyle J, Carmichael HA, Davies DL, Lorimer AR (1992). Candoxatril, a neutral endopeptidase inhibitor: efficacy and tolerability in essential hypertension. *J Hypertens.* 10: 607-613.
13. Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72: 248-254.
14. Bueltmann M, Kong X, Mertens M, Yin N, Yin J, Liu Z (2009). Inhaled milrinone attenuates experimental acute lung injury. *Intensive Care Med.* 35: 171-178.
15. Bursten SL, Federighi DA, Parsons P, Harris WE, Abraham E, Moore EE, Jr. (1996). An increase in serum C18 unsaturated free fatty acids as a predictor of the development of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med.* 24: 1129-1136.
16. Campbell DJ (2003). The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *Int J Biochem Cell Biol.* 35: 784-791.
17. Canals M, Jenkins L, Kellett E, Milligan G (2006). Up-regulation of the angiotensin II type 1 receptor by the MAS proto-oncogene is due to constitutive activation of Gq/G11 by MAS. *J Biol Chem.* 281: 16757-16767.
18. Chai SY, Fernando R, Peck G, Ye SY, Mendelsohn FA, Jenkins TA (2004). The angiotensin IV/AT4 receptor. *Cell Mol Life Sci.* 61: 2728-2737.
19. Corvol P, Jeunemaitre X (1997). Molecular genetics of human hypertension: role of angiotensinogen. *Endocr Rev.* 18: 662-677.
20. Corvol P, Williams TA, Soubrier F (1995). Peptidyl dipeptidase A: angiotensin I-converting enzyme. *Methods Enzymol.* 248: 283-305.
21. Danser AH (2003). Local renin-angiotensin systems: the unanswered questions. *Int J Biochem Cell Biol.* 35: 759-768.
22. Diez-Freire C, Vazquez J, Correa de Adjoulian MF, Ferrari MF, Yuan L, Silver X (2006). ACE2 gene transfer attenuates hypertension-linked pathophysiological changes in the SHR. *Physiol Genomics.* 27: 12-19.
23. Dodek PM, Pare PD, Minshall DK, Wiggs BR, Doerschuk CM, Baile EM (1991). Direct injury to the bronchial vasculature in anesthetized sheep. *J Appl Physiol.* 70: 2072-2079.

24. Dodek PM, Valenzuela A, Minshall DK, Baile EM, Pare PD (1993). Bronchial vascular occlusion does not attenuate or accentuate oleic acid lung injury in anesthetized sheep. *J Appl Physiol.* 75: 2671-2676.
25. Doggrell SA, Wanstall JC (2004). Vascular chymase: pathophysiological role and therapeutic potential of inhibition. *Cardiovasc Res.* 61: 653-662.
26. Dong B, Zhang C, Feng JB, Zhao YX, Li SY, Yang YP (2008). Overexpression of ACE2 enhances plaque stability in a rabbit model of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28: 1270-1276.
27. Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, Godbout K, Gosselin M, Stagliano N (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res.* 87: E1-9.
28. Dreyfuss D, Saumon G (1998). Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med.* 157: 294-323.
29. Ebermann L, Spillmann F, Sidiropoulos M, Escher F, Heringer-Walther S, Schultheiss HP (2008). The angiotensin-(1-7) receptor agonist AVE0991 is cardioprotective in diabetic rats. *Eur J Pharmacol.* 590: 276-280.
30. Ferrario CM, Chappell MC (2004). Novel angiotensin peptides. *Cell Mol Life Sci.* 61: 2720-2727.
31. Ferrario CM, Chappell MC, Dean RH, Iyer SN (1998). Novel angiotensin peptides regulate blood pressure, endothelial function, and natriuresis. *J Am Soc Nephrol.* 9: 1716-1722.
32. Ferrario CM, Santos RA, Brosnihan KB, Block CH, Schiavone MT, Khosla MC (1988). A hypothesis regarding the function of angiotensin peptides in the brain. *Clin Exp Hypertens.* 10:107-121.
33. Ferreira AJ, Jacoby BA, Araujo CA, Macedo FA, Silva GA, Almeida AP (2007). The nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist AVE-0991 attenuates heart failure induced by myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292: H1113-1119.
34. Ferreira AJ, Murca TM, Fraga-Silva RA, Castro CH, Raizada MK, Santos RA (2012). New cardiovascular and pulmonary therapeutic strategies based on the Angiotensin-converting enzyme 2/angiotensin-(1-7)/mas receptor axis. *Int J Hypertens.* 147825.

35. Ferreira AJ, Santos RA, Almeida AP (2002). Angiotensin-(1-7) improves the post-ischemic function in isolated perfused rat hearts. *Braz J Med Biol Res.* 35: 1083-1090.
36. Ferreira AJ, Shenoy V, Yamazato Y, Sriramula S, Francis J, Yuan L (2009). Evidence for angiotensin-converting enzyme 2 as a therapeutic target for the prevention of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 179: 1048-1054.
37. Ferreira PM, Alzamora AC, Santos RA, Campagnole-Santos MJ (2008). Hemodynamic effect produced by microinjection of angiotensins at the caudal ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience.* 151: 1208-1216.
38. Fraga-Silva RA, Pinheiro SV, Goncalves AC, Alenina N, Bader M, Santos RA (2008). The antithrombotic effect of angiotensin-(1-7) involves mas-mediated NO release from platelets. *Mol Med.* 14: 28-35.
39. Frank JA, Matthay MA (2003). Science review: mechanisms of ventilator-induced injury. *Crit Care.* 7: 233-241.
40. Frevert CW, Warner AE (1992). Respiratory distress resulting from acute lung injury in the veterinary patient. *J Vet Intern Med.* 6: 154-165.
41. Gallagher PE, Tallant EA (2004). Inhibition of human lung cancer cell growth by angiotensin-(1-7). *Carcinogenesis.* 25: 2045-2052.
42. Gembardt F, Grajewski S, Vahl M, Schultheiss HP, Walther T (2008). Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family. *Mol Cell Biochem.* 319: 115-123.
43. Goossens GH, Jocken JW, Blaak EE, Schiffers PM, Saris WH, van Baak MA (2007). Endocrine role of the renin-angiotensin system in human adipose tissue and muscle: effect of beta-adrenergic stimulation. *Hypertension.* 49: 542-547.
44. Gust R, Kozlowski J, Stephenson AH, Schuster DP (1998). Synergistic hemodynamic effects of low-dose endotoxin and acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 157: 1919-1926.
45. Gust R, Kozlowski JK, Stephenson AH, Schuster DP (1999). Role of cyclooxygenase-2 in oleic acid-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 160: 1165-1170.
46. Haller H, Park JK, Lindschau C, Meyer M, Menne J (2006). Spotlight on renin: intrarenal renin-angiotensin system--important player of the local milieu. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 7: 122-125.

47. Heringer-Walther S, Eckert K, Schumacher SM, Uharek L, Wulf-Goldenberg A, Gembardt F (2009). Angiotensin-(1-7) stimulates hematopoietic progenitor cells in vitro and in vivo. *Haematologica*. 94:857-860.
48. Heuer JF, Pelosi P, Hermann P, Perske C, Crozier TA, Bruck W. Acute effects of intracranial hypertension and ARDS on pulmonary and neuronal damage: a randomized experimental study in pigs. *Intensive Care Med*.
49. Hickling KG, Walsh J, Henderson S, Jackson R (1994). Low mortality rate in adult respiratory distress syndrome using low-volume, pressure-limited ventilation with permissive hypercapnia: a prospective study. *Crit Care Med*. 22: 1568-1578.
50. Hubloue I, Biarent D, Abdel Kafi S, Bejjani G, Melot C, Naeije R (2003). Endothelin receptor blockade in canine oleic acid-induced lung injury. *Intensive Care Med*. 29: 1003-1006.
51. Huckle WR, Earp HS (1994). Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. *Prog Growth Factor Res*. 5: 177-194.
52. Imai H (1963). Study by Electron Microscopy of Oleic and Linoleic Acids Injected Intrabronchially into the Lungs of Rats. *Exp Mol Pathol*. 40: 331-346.
53. Imai Y, Kuba K, Penninger JM (2007). Angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome. *Cell Mol Life Sci*. 64:2006-2012.
54. Imai Y, Kuba K, Rao S, Huan Y, Guo F, Guan B (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*. 436: 112-116.
55. Jackson TR, Blair LA, Marshall J, Goedert M, Hanley MR (1988). The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*. 335: 437-440.
56. Jaiswal N, Diz DI, Chappell MC, Khosla MC, Ferrario CM (1992). Stimulation of endothelial cell prostaglandin production by angiotensin peptides. Characterization of receptors. *Hypertension*. 19: II49-55.
57. Jambrik Z, Gargani L, Adamicza A, Kaszaki J, Varga A, Forster T. B-lines quantify the lung water content: a lung ultrasound versus lung gravimetry study in acute lung injury. *Ultrasound Med Biol*. 36: 2004-2010.
58. Jarvinen AK, Saario E, Andresen E, Happonen I, Saari S, Rajamaki M (1995). Lung injury leading to respiratory distress syndrome in young Dalmatian dogs. *J Vet Intern Med*. 9: 162-168.

59. Johnson ER, Matthay MA (2010). Acute Lung Injury: Epidemiology, Pathogenesis, and Treatment. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.*
60. Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE (1995). Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest.* 96: 2515-2520.
61. Kluskens LD, Nelemans SA, Rink R, de Vries L, Meter-Arkema A, Wang Y (2009). Angiotensin-(1-7) with thioether bridge: an angiotensin-converting enzyme-resistant, potent angiotensin-(1-7) analog. *J Pharmacol Exp Ther.* 328: 849-854.
62. Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM (2005). G-protein-coupled receptor Mas is a physiological antagonist of the angiotensin II type 1 receptor. *Circulation.* 111: 1806-1813.
63. Kuebler WM. The Janus-faced regulation of endothelial permeability by cyclic GMP. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 301: L157-160.
64. Kuebler WM (2006). Selectins revisited: the emerging role of platelets in inflammatory lung disease. *J Clin Invest.* 116: 3106-3108.
65. Kumar R, Singh VP, Baker KM (2007). The intracellular renin-angiotensin system: a new paradigm. *Trends Endocrinol Metab.* 18: 208-214.
66. Lautner RQ, Villela DC, Fraga-Silva RA, Silva N, Verano-Braga T, Costa-Fraga F. Discovery and characterization of alamandine: a novel component of the renin-angiotensin system. *Circ Res.* 112: 1104-1111.
67. Lemos VS, Silva DM, Walther T, Alenina N, Bader M, Santos RA (2005). The endothelium-dependent vasodilator effect of the nonpeptide Ang(1-7) mimic AVE 0991 is abolished in the aorta of mas-knockout mice. *J Cardiovasc Pharmacol.* 46: 274-279.
68. Leung PS, Carlsson PO (2005). Pancreatic islet renin angiotensin system: its novel roles in islet function and in diabetes mellitus. *Pancreas.* 30: 293-298.
69. Levitt JE, Matthay MA (2006). Treatment of acute lung injury: historical perspective and potential future therapies. *Semin Respir Crit Care Med.* 27: 426-437.
70. Li P, Chappell MC, Ferrario CM, Brosnihan KB (1997). Angiotensin-(1-7) augments bradykinin-induced vasodilation by competing with ACE and releasing nitric oxide. *Hypertension.* 29: 394-400.

71. Li W, Moore MJ, Vasilieva N, Sui J, Wong SK, Berne MA (2003). Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature*. 426: 450-254.
72. Liu L, Qiu HB, Yang Y, Wang L, Ding HM, Li HP (2009). Losartan, an antagonist of AT1 receptor for angiotensin II, attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rat. *Arch Biochem Biophys*. 481: 131-136.
73. Lium B (1983). Adult respiratory distress syndrome (ARDS). Incidence, clinical findings, pathomorphology and pathogenesis. A review. *Nord Vet Med*. 35: 38-47.
74. Lochard N, Thibault G, Silversides DW, Touyz RM, Reudelhuber TL (2004). Chronic production of angiotensin IV in the brain leads to hypertension that is reversible with an angiotensin II AT1 receptor antagonist. *Circ Res*. 94: 1451-1457.
75. Loot AE, Roks AJ, Henning RH, Tio RA, Suurmeijer AJ, Boomsma F (2002). Angiotensin-(1-7) attenuates the development of heart failure after myocardial infarction in rats. *Circulation*. 105: 1548-1550.
76. Lopez A, Lane IF, Hanna P (1995). Adult respiratory distress syndrome in a dog with necrotizing pancreatitis. *Can Vet J*. 36: 240-241.
77. Lu B, Gerard NP, Kolakowski LF, Jr., Bozza M, Zurakowski D, Finco O (1995). Neutral endopeptidase modulation of septic shock. *J Exp Med*. 181: 2271-2275.
78. Matsuoka N, Yamazaki M, Yamaguchi I (1995). Changes in brain somatostatin in memory-deficient rats: comparison with cholinergic markers. *Neuroscience*. 66: 617-626.
79. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, Groshong SD, Matthay MA, Slutsky AS. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 44: 725-738.
80. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR (2008). Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295: L379-399.
81. McAuley DF, Matthay MA (2005). Is there a role for beta-adrenoceptor agonists in the management of acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome? *Treat Respir Med*. 4: 297-307.
82. Menon J, Soto-Pantoja DR, Callahan MF, Cline JM, Ferrario CM, Tallant EA (2007). Angiotensin-(1-7) inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenografts in nude mice through a reduction in cyclooxygenase-2. *Cancer Res*. 67: 2809-2815.

83. Mercure C, Yogi A, Callera GE, Aranha AB, Bader M, Ferreira AJ (2008). Angiotensin (1-7) blunts hypertensive cardiac remodeling by a direct effect on the heart. *Circ Res.* 103: 1319-1326.
84. Moncada S, Higgs EA (2006). Nitric oxide and the vascular endothelium. *Handb Exp Pharmacol.* (176 Pt 1): 213-254.
85. Muthalif MM, Benter IF, Uddin MR, Harper JL, Malik KU (1998). Signal transduction mechanisms involved in angiotensin-(1-7)-stimulated arachidonic acid release and prostanoid synthesis in rabbit aortic smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 284: 388-398.
86. Parent C, King LG, Van Winkle TJ, Walker LM (1996). Respiratory function and treatment in dogs with acute respiratory distress syndrome: 19 cases (1985-1993). *J Am Vet Med Assoc.* 208: 1428-1433.
87. Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev.* 2006;86(3):747-803.
88. Peiro C, Vallejo S, Gembardt F, Azcutia V, Heringer-Walther S, Rodriguez-Manas L (2007). Endothelial dysfunction through genetic deletion or inhibition of the G protein-coupled receptor Mas: a new target to improve endothelial function. *J Hypertens.* 25: 2421-2425.
89. Penninger J, Imai Y, Kuba K (2008). The discovery of ACE2 and its role in acute lung injury. *Exp Physiol.*
90. Peterson BT, Brooks JA, Zack AG (1982). Use of microwave oven for determination of postmortem water volume of lungs. *J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol.* 52: 1661-1663.
91. Petty WJ, Miller AA, McCoy TP, Gallagher PE, Tallant EA, Torti FM (2009). Phase I and pharmacokinetic study of angiotensin-(1-7), an endogenous antiangiogenic hormone. *Clin Cancer Res.* 15: 7398-7404.
92. Pinheiro SV, Simoes e Silva AC, Sampaio WO, de Paula RD, Mendes EP, Bontempo ED (2004). Nonpeptide AVE 0991 is an angiotensin-(1-7) receptor Mas agonist in the mouse kidney. *Hypertension.* 44: 490-496.
93. Pinsky MR (1990). The effects of mechanical ventilation on the cardiovascular system. *Crit Care Clin.* 6: 663-678.

94. Premer C, Lamondin C, Mitzey A, Speth RC, Brownfield MS (2013). Immunohistochemical Localization of AT1a, AT1b, and AT2 Angiotensin II Receptor Subtypes in the Rat Adrenal, Pituitary, and Brain with a Perspective Commentary. *Int J Hypertens.*: 175428.
95. Quintel M, Heine M, Hirschl RB, Tillmanns R, Wessendorf V (1998). Effects of partial liquid ventilation on lung injury in a model of acute respiratory failure: a histologic and morphometric analysis. *Crit Care Med.* 26: 833-843.
96. Rajendran S, Chirkov YY, Campbell DJ, Horowitz JD (2005). Angiotensin-(1-7) enhances anti-aggregatory effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside. *J Cardiovasc Pharmacol.* 46: 459-463.
97. Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *Jama.* 307: 2526-2533.
98. Rice GI, Thomas DA, Grant PJ, Turner AJ, Hooper NM (2004). Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochem J.* 383: 45-51.
99. Rodgers K, Xiong S, DiZerega GS (2003). Effect of angiotensin II and angiotensin(1-7) on hematopoietic recovery after intravenous chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol.* 51: 97-106.
100. Rodgers KE, Espinoza T, Felix J, Roda N, Maldonado S, diZerega G (2003). Acceleration of healing, reduction of fibrotic scar, and normalization of tissue architecture by an angiotensin analogue, NorLeu3-A(1-7). *Plast Reconstr Surg.* 111: 1195-1206.
101. Rodgers KE, Oliver J, diZerega GS (2006). Phase I/II dose escalation study of angiotensin 1-7 [A(1-7)] administered before and after chemotherapy in patients with newly diagnosed breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 57: 559-568.
102. Sakai K, Sigmund CD (2005). Molecular evidence of tissue renin-angiotensin systems: a focus on the brain. *Curr Hypertens Rep.* 7: 135-140.
103. Sampaio WO, Nascimento AA, Santos RA (2003). Systemic and regional hemodynamic effects of angiotensin-(1-7) in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 284: H1985-1994.
104. Sampaio WO, Souza dos Santos RA, Faria-Silva R, da Mata Machado LT, Schiffrin EL, Touyz RM (2007). Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. *Hypertension.* 49: 185-192.

105. Santos RA, Brosnihan KB, Jacobsen DW, DiCorleto PE, Ferrario CM (1992). Production of angiotensin-(1-7) by human vascular endothelium. *Hypertension*.19: 1156-61.
106. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Andrade SP (2000). Angiotensin-(1-7): an update. *Regul Pept*. 91: 45-62.
107. Santos RA, Campagnole-Santos MJ, Baracho NC, Fontes MA, Silva LC, Neves LA (1994). Characterization of a new angiotensin antagonist selective for angiotensin-(1-7): evidence that the actions of angiotensin-(1-7) are mediated by specific angiotensin receptors. *Brain Res Bull*. 35: 293-298.
108. Santos RA, Ferreira AJ (2006). Pharmacological effects of AVE 0991, a nonpeptide angiotensin-(1-7) receptor agonist. *Cardiovasc Drug Rev*. 24: 239-246.
109. Santos RA, Ferreira AJ (2007). Angiotensin-(1-7) and the renin-angiotensin system. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 16: 122-128.
110. Santos RA, Ferreira AJ, Simoes ESAC (2008). Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Exp Physiol*. 93: 519-527.
111. Santos RA, Haibara AS, Campagnole-Santos MJ, Simoes e Silva AC, Paula RD, Pinheiro SV (2003). Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). *Hypertension*. 41: 737-743.
112. Santos RA, Simoes e Silva AC, Magaldi AJ, Khosla MC, Cesar KR, Passaglio KT (1996). Evidence for a physiological role of angiotensin-(1-7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension*. 27: 875-884.
113. Santos RA, Simoes e Silva AC, Maric C, Silva DM, Machado RP, de Buhr I (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100: 8258-8263.
114. Schiavone MT, Santos RA, Brosnihan KB, Khosla MC, Ferrario CM (1988). Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 85: 4095-4098.
115. Schmidt R, Meier U, Yabut-Perez M, Walmrath D, Grimminger F, Seeger W (2001). Alteration of fatty acid profiles in different pulmonary surfactant phospholipids in acute respiratory distress syndrome and severe pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*. 163: 95-100.

116. Schuster DP (1994). ARDS: clinical lessons from the oleic acid model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 149: 245-260.
117. Schuster DP (1986). Clinical lessons from an experimental model of ARDS. *Pediatr Pulmonol Suppl.* 11: 104-105.
118. Schuster DP, Perez JE, Trulock EP, Williamson JR, Biello DR, Kenzora JL (1986). Cardiac dysfunction during acute lung injury induced by oleic acid in dogs. *Am Rev Respir Dis.* 133: 519-525.
119. Schuster DP, Sandiford P, Stephenson AH (1993). Thromboxane receptor stimulation/inhibition and perfusion redistribution after acute lung injury. *J Appl Physiol.* 75: 2069-2078.
120. Shenoy V, Ferreira AJ, Qi Y, Fraga-Silva RA, Diez-Freire C, Dooies A. The angiotensin-converting enzyme 2/angiogenesis-(1-7)/Mas axis confers cardiopulmonary protection against lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 182: 1065-1072.
121. Silva DM, Vianna HR, Cortes SF, Campagnole-Santos MJ, Santos RA, Lemos VS (2007). Evidence for a new angiotensin-(1-7) receptor subtype in the aorta of Sprague-Dawley rats. *Peptides.* 28: 702-207.
122. Skidgel RA, Erdos EG (1985). Novel activity of human angiotensin I converting enzyme: release of the NH₂- and COOH-terminal tripeptides from the luteinizing hormone-releasing hormone. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82: 1025-1029.
123. Soto-Pantoja DR, Menon J, Gallagher PE, Tallant EA (2009). Angiotensin-(1-7) inhibits tumor angiogenesis in human lung cancer xenografts with a reduction in vascular endothelial growth factor. *Mol Cancer Ther.* 8: 1676-1683.
124. Steinberg KP, Hudson LD, Goodman RB, Hough CL, Lanken PN, Hyzy R (2006). Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 354: 1671-1684.
125. Stragier B, De Bundel D, Sarre S, Smolders I, Vauquelin G, Dupont A (2008). Involvement of insulin-regulated aminopeptidase in the effects of the renin-angiotensin fragment angiotensin IV: a review. *Heart Fail Rev.* 13: 321-337.
126. Strawn WB, Ferrario CM, Tallant EA. Angiotensin-(1-7) reduces smooth muscle growth after vascular injury. *Hypertension.* 1999;33(1 Pt 2): 207-11.

127. Suttorp N, Weber U, Welsch T, Schudt C (1993). Role of phosphodiesterases in the regulation of endothelial permeability in vitro. *J Clin Invest.* 91:1421-1428.
128. Tabuchi A, Kuebler WM (2008). Endothelium-platelet interactions in inflammatory lung disease. *Vascul Pharmacol.* 49: 141-150.
129. Tallant EA, Ferrario CM, Gallagher PE (2005). Angiotensin-(1-7) inhibits growth of cardiac myocytes through activation of the mas receptor. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289: H1560-1566.
130. Tan F, Morris PW, Skidgel RA, Erdos EG (1993). Sequencing and cloning of human prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C). Similarity to both serine carboxypeptidase and prolylendopeptidase families. *J Biol Chem.* 268: 16631-16638.
131. Tewksbury DA (1983). Angiotensinogen. *Fed Proc.* 42: 2724-2728.
132. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network (2000). Ketoconazole for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA.* 17: 1995–2002.
133. The ARDS Clinical Trials Network (2002). Randomized, placebo-controlled trial of lisofylline for early treatment of acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *Crit. Care Med.* 30: 1–6.
134. Tigerstedt R, Bergman PG (1898). Niere und Kreislauf. *Scand Arch Physiol.* 4: 223–271.
135. Timmermans PB, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P, Carini DJ (1993). Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists. *Pharmacol Rev.* 45: 205-251.
136. Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 275: 33238-33243.
137. Trask AJ, Averill DB, Ganten D, Chappell MC, Ferrario CM (2007). Primary role of angiotensin-converting enzyme-2 in cardiac production of angiotensin-(1-7) in transgenic Ren-2 hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 292: H3019-3024.
138. Turner AJ, Hooper NM (2002). The angiotensin-converting enzyme gene family: genomics and pharmacology. *Trends Pharmacol Sci.* 23: 177-183.

139. van der Wouden EA, Henning RH, Deelman LE, Roks AJ, Boomsma F, de Zeeuw D (2005). Does angiotensin (1-7) contribute to the anti-proteinuric effect of ACE-inhibitors. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 6: 96-101.
140. Verma A, Shan Z, Lei B, Yuan L, Liu X, Nakagawa T. ACE2 and Ang-(1-7) confer protection against development of diabetic retinopathy. *Mol Ther.*20: 28-36.
141. Vickers C, Hales P, Kaushik V, Dick L, Gavin J, Tang J (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J Biol Chem.* 277: 14838-14843.
142. Von Bohlen und Halbach O, Walther T, Bader M, Albrecht D (2000). Interaction between Mas and the angiotensin AT1 receptor in the amygdala. *J Neurophysiol.* 83: 2012-2021.
143. Walters PE, Gaspari TA, Widdop RE (2005). Angiotensin-(1-7) acts as a vasodepressor agent via angiotensin II type 2 receptors in conscious rats. *Hypertension.* 45:960-966.
144. Ware LB, Matthay MA (2000). The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.* 342: 1334-1349.
145. Wiemer G, Dobrucki LW, Louka FR, Malinski T, Heitsch H (2002). AVE 0991, a nonpeptide mimic of the effects of angiotensin-(1-7) on the endothelium. *Hypertension.* 40: 847-852.
146. Wosten-van Asperen RM, Lutter R, Haitsma JJ, Merkus MP, van Woensel JB, van der Loos CM (2008). ACE mediates ventilator-induced lung injury in rats via angiotensin II but not bradykinin. *Eur Respir J.* 31: 363-371.
147. Wosten-van Asperen RM, Lutter R, Specht PA, Moll GN, van Woensel JB, van der Loos CM. Acute respiratory distress syndrome leads to reduced ratio of ACE/ACE2 activities and is prevented by angiotensin-(1-7) or an angiotensin II receptor antagonist. *J Pathol.* 225: 618-627.
148. Wright JW, Harding JW (1997). Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev.* 25: 96-124.
149. Wright JW, Tamura-Myers E, Wilson WL, Roques BP, Llorens-Cortes C, Speth RC (2003). Conversion of brain angiotensin II to angiotensin III is critical for pressor response in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284: R725-733.

150. Yamamoto K, Chappell MC, Brosnihan KB, Ferrario CM (1992). In vivo metabolism of angiotensin I by neutral endopeptidase (EC 3.4.24.11) in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 19: 692-696.
151. Yang C, Moriuchi H, Takase J, Ishitsuka Y, Irikura M, Irie T (2003). Oxidative stress in early stage of acute lung injury induced with oleic acid in guinea pigs. *Biol Pharm Bull*. 26: 424-428.
152. Yang HY, Erdos EG, Levin Y (1970). A dipeptidyl carboxypeptidase that converts angiotensin I and inactivates bradykinin. *Biochim Biophys Acta*. 214: 374-376.
153. Yang QH, Kaplowitz MR, Lai-Fook SJ (1989). Regional variations in lung expansion in rabbits: prone vs. supine positions. *J Appl Physiol*. 67: 1371-1376.
154. Yao S, Feng D, Wu Q, Li K, Wang L (2008). Losartan attenuates ventilator-induced lung injury. *J Surg Res*. 145: 25-32.
155. Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M (1986). Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*. 45: 711-719.
156. Zhang H, Sun GY (2005). LPS induces permeability injury in lung microvascular endothelium via AT(1) receptor. *Arch Biochem Biophys*. 441: 75-83.
157. Zini S, Fournie-Zaluski MC, Chauvel E, Roques BP, Corvol P, Llorens-Cortes C (1996). Identification of metabolic pathways of brain angiotensin II and III using specific aminopeptidase inhibitors: predominant role of angiotensin III in the control of vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 11968-11973.
158. Zohn IE, Symons M, Chrzanowska-Wodnicka M, Westwick JK, Der CJ (1998). Ras oncogene signaling and transformation require the small GTP-binding protein Rac. *Mol Cell Biol*. 18: 1225-1235.
159. Zwissler B, Welte M, Habler O, Kleen M, Messmer K (1995). Effects of inhaled prostacyclin as compared with inhaled nitric oxide in a canine model of pulmonary microembolism and oleic acid edema. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 9: 634-640.

9 Publikationsliste

Originalarbeit:

Klein N, Gembardt F, Supé S, Kaestle SM, Nickles H, Erfinanda L, Lei X, Yin J, Wang L, Mertens M, Szaszi K, Walther T, Kuebler WM (2013). Angiotensin-(1-7) protects from experimental acute lung injury. *Crit Care Med.* 2013 Nov;41(11):e334-43. doi: 10.1097/CCM.0b013e31828a6688.

Tagungsbeitrag:

Klein N, Mertens M, Walther T, Kuebler W (2009). Protective effect of the angiotensin metabolite angiotensin-(1-7) in experimental acute lung injury
Acta Physiologica 2009; Volume 195, Supplement 669 Abstract number: P445
The 88th Annual Meeting of The German Physiological Society
22/03/2009-25/03/2009
Giessen, Germany

10 Danksagungen

Mein Dank gilt an dieser Stelle allen, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung meiner Arbeit unterstützt haben.

Mein Dank gilt im Besonderen:

- Herrn Prof. Dr. Wolfgang Kübler, der mir diese Arbeit in seiner Arbeitsgruppe ermöglicht hat. Ich habe zu jeder Zeit eine Unterstützung sowohl auf wissenschaftlicher als auch auf menschlicher Ebene erfahren.
- Herrn Prof. Dr. Salah Amasheh, der sich dazu bereit erklärt hat diese Arbeit zu betreuen, mich in der finalen Phase sehr gut beraten und alle meine Fragen umgehend bearbeitet hat.
- Herrn Prof. Dr. Axel Pries für die Aufnahme am Institut für Physiologie.
- Meinen Kolleginnen und Kollegen am Institut für Physiologie wie Björn Hoffmann, Michael Mertens, Nils Neye, Stephanie Supe, Julia Hoffmann, Ning Yin, Renate Noske-Reimers, Sabine Hahn, Isabelle Bünsch. Im Besonderen Frau Stephanie Gembardt, die mich während meiner Zeit am Institut unentbehrlich begleitet und eingearbeitet hat.
- Herrn Prof. Dr. Thomas Walther und Florian Gembardt für die professionelle Zusammenarbeit.
- Der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Finanzierung des Projekts.
- Meinem Mann und meinen beiden Kindern, meiner Mutter und Schwiegereltern.
- All meinen Freunden, die mich in dieser Zeit motiviert und mir geholfen haben.

11 Selbstständigkeitserklärung

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

Kerpen, den 25.02.2015

Unterschrift: Nadine Klein