

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Manfred Thiel

**Auswirkungen einer Lipopolysaccharid-induzierten Sepsis
auf die frühe pulmonale Fibrosierung
im akuten Lungenversagen (ARDS)
unter lungenprotektiver Beatmung**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der
Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Alexander Kolz

aus
Eckernförde
2021

Dekan:

Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referent:

Prof. Dr. med. Thomas Lücke MBA, D.E.S.A.

INHALTVERZEICHNIS

	Seite
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Akute Lungenversagen im historischen Kontext der Intensivmedizin.....	1
1.2 Das Akute Lungenversagen (ARDS).....	3
1.2.1 Definition des ARDS	3
1.2.2 Epidemiologie des ARDS.....	4
1.2.3 Ätiologie des ARDS	5
1.3 Pathogenese des ARDS und der pulmonalen Fibrosierung	7
1.3.1 Pathobiochemie der Inflammation im ARDS.....	7
1.3.2 Pathophysiologie des ARDS im septischen Schock.....	8
1.3.3 Pathobiochemie der pulmonalen Fibrosierung im ARDS.....	10
1.3.4 Pulmonale Schädigung durch Beatmung als Trigger der Fibrose.....	12
1.3.5 Protektive Beatmungsstrategien bei ARDS.....	13
1.4 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit.....	15
2 MATERIAL UND METHODEN	17
2.1 Studiendesign und Modellorganismus	17
2.1.1 Versuchstiere und Haltung.....	17
2.1.2 Gruppeneinteilung	18
2.2 Versuchsvorbereitungen	19
2.2.1 Induktion einer akuten Lungenschädigung mittels LPS	19
2.2.2 Anästhesie und OP-Vorbereitungen	19
2.2.3 Arterielle und venöse Katheterisierung	20

2.2.4	Tracheotomie	20
2.3	Versuchsablauf	21
2.3.1	Total intravenöse Anästhesie (TIVA).....	21
2.3.2	Beatmung	21
2.3.3	Open lung PEEP.....	22
2.3.4	Messung des transpulmonalen Drucks.....	23
2.3.5	Physiologische Messparameter.....	23
2.3.6	Intravenöse Endotoxinämie.....	26
2.3.7	Kreislauf- und Volumenmanagement	26
2.4	Versuchsende	26
2.4.1	Plasma-Proben.....	27
2.4.2	Histologische Untersuchungen: Schnittebenen	27
2.4.3	Paraffineinbettung und Mikrotomschnitt.....	28
2.4.4	Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung).....	28
2.4.5	Histologische Beurteilung des Lungenparenchyms	29
2.4.6	Immunohistochemie.....	30
2.4.7	Bilddatenanalyse	31
2.5	Messung der Zytokinkonzentrationen aus Plasmaproben	33
2.6	RNA-Expressionsanalyse	33
2.6.1	Isolation der Ribonukleinsäuren	33
2.6.2	Entfernung endogener DNA und DNase.....	34
2.6.3	Messung und Angleichen der RNA Konzentration	34
2.6.4	cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptase	35
2.6.5	Real-Time-quantitative-Polymerase-Chain-Reaction (q-PCR)	35
2.7	Statistische Analysen.....	37

3	ERGEBNISSE.....	38
3.1	Physiologische Daten.....	38
3.1.1	Beatmung.....	38
3.1.2	Beatmungsparameter im Verlauf.....	40
3.1.3	Hämodynamik und Flüssigkeitsbilanz.....	41
3.1.4	Blutgasanalysen.....	43
3.1.5	Zytokinkonzentrationen im Plasma (ELISA).....	44
3.2	Untersuchungen des Lungenparenchyms.....	45
3.2.1	Histologische Auswertung HE-Färbung: Lungenschädigungsindex.....	45
3.2.2	Differenzierte histologische Auswertung.....	46
3.2.3	Immunohistochemie.....	48
3.3	RNA-Expressions-Analysen.....	50
3.3.1	Pro-inflammatorische mRNA Expression im pulmonalen Parenchym.....	50
3.3.2	Pro-fibrotische mRNA Expression im pulmonalen Parenchym.....	53
3.3.3	Korrelationsanalysen der pulmonalen mRNA Expression.....	54
4	DISKUSSION.....	55
4.1	Inflamationsreaktion unter Endotoxinämie.....	56
4.2	Pathophysiologische Veränderungen unter Endotoxinämie.....	58
4.2.1	Beatmungsparameter.....	58
4.2.2	Hämodynamik.....	60
4.3	Inflamationsabhängige Veränderungen im pulmonalen Parenchym.....	61
4.3.1	Histologie.....	61
4.3.2	Pathobiochemie.....	65
4.4	Schlussfolgerungen.....	70

5 ZUSAMMENFASSUNG	72
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	74
7 TABELLARISCHER ANHANG.....	94
7.1 Abbildungsverzeichnis.....	94
7.2 Tabellenverzeichnis	96
7.3 Apparate und Material.....	97
7.4 Software.....	98
7.5 Pharmaka und Chemikalien	99
7.6 Antikörper und Primer, Testkits.....	101
7.7 Verbrauchsmaterial.....	102
8 LEBENSLAUF	103
9 DANKSAGUNG.....	104

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	- Arteria
AF	- Atemfrequenz
ALI	- Acute Lung Injury*
AMV	- Atemminutenvolumen
ARDS	- Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL	- Bronchoalveoläre Lavage
C_{cw}	- Compliance der Thoraxwand (Chest-wall)
Ccw	- Compliance des Thorax (Chest-wall)
CD	- Cluster of Differentiation (Antikörper)
cDNA	- komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C_{Dyn}	- Dynamische Compliance des respiratorischen Systems
C_L	- Compliance der Lunge
cmH ₂ O	- Zentimeter Wassersäule
CMV	- Continuous mandatory ventilation
COPD	- Chronische obstruktive Lungenerkrankung
C_{rs}	- Compliance des respiratorischen Systems
Ct	- Anzahl der PCR Zyklen
CT	- Computertomographie
DAMPs	- Damage-associated molecular pattern
DEC	- Kontrastierender Filter
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
ECMO	- Extrakorporale Membranoxygenierung
E_{CW}	- Elastance der Thoraxwand (Chest-Wall)
E_L	- Elastance der Lunge
EMT	- Epithelial-mesenchymale-Transformation
E_{RS}	- Elastance des respiratorischen Systems
FiO ₂	- Fraktion der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration
gKG	- Gramm des Körpergewichts
Hb	- Hämoglobinkonzentration
HCO ₃ ⁻	- Hydrogencarbonat
HE	- Hämatoxylin-Eosin-Färbung

HF	- Herzfrequenz
HFOV	- Hochfrequenzoszillationsventilation
HI	- Horovitz-Oxygenierungsindex
I.D.	- inner diameter = Innendurchmesser
i.p.	- intraperitoneal
i.v.	- intravenös
ICV	- Isolated Ventilated Cages
IHC	- Immunohistochemie
IL-1 β	- Interleukin-1 β (IL-1B)
IPPV	- Intermittent positive pressure ventilation
kgKG	- Kilogramm Körpergewicht
KOF	- Körperoberfläche
LPS	- Lipopolysaccharide (pyogene, bakterielle Endotoxine)
m ü.NHN	- Meter über Normalhöhennull
MAP	- Mittlerer arterieller Blutdruck
MDD	- Minimum detectable dose
MMP	- Matrix-Metalloproteasen
NT-PC	- N-terminalen Peptide von Prokollagenen
NT-PC-I	- N-terminalen-Peptiden des Prokollagens I
NT-PC-III	- N-terminale-Peptid des Prokollagen Typ III
O.D.	- outer diameter = Außendurchmesser
OD	- Optische Dichte
OL	- Open Lung
OL-PEEP	- Open Lung positiv-endexpiratorischer Druck
p _a CO ₂	- arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
PAMPs	- Pathogen associated molecular pattern
p _a O ₂	- arterieller Sauerstoff-Partialdruck
P _{AW}	- Atemwegsdruck
PC	- Pressure controlled
PC I	- Prokollagen I, III, usw.
PCR	- Polymerase-Kettenreaktion
PEEP	- Positiv-Endexpiratorischer Druck
P _{es}	- intraösophagealer Druck

P_{mean}	- mittlerer Beatmungsdruck
PMN	- polymorphonuclear leukocytes = Granulozyten
P_{peak}	- Spitzen-Beatmungsdruck
P_{Pleura}	- Intrapleuraler Druck
RCT	- randomized controlled trial = randomisierte kontrollierte Studie
RQ	- Relative quantification = $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$
RR	- Blutdruck
s.	- siehe Seite / Kapitel
s.c.	- subkutan
S_aO_2	- Arterielle Sauerstoffsättigung des Hämoglobins
sBE	- Standard Base Excess
SF	- Sichtfeld-Zahl (Okular)
SIRS	- Systemisches inflammatorisches Response-Syndrom
SOP	- Standard Operating Procedure
SPF	- Spezifisch pathogenfrei
TBS	- Tris buffered saline = Tris-Puffer-Lösung
TIVA	- total intravenöse Anästhesie
TLV	- Total liquid ventilation
TMB	- Tetramethylbenzidin
TNF- α	- Tumor-Nekrose-Faktor- α
UI	- uninjured (Kontrollgruppe)
V.	- Vena
VIVE	- Verhältnis inspiratorischer und expiratorischer Flow
Vol./h	- Volumen-Stunden-Bilanz
V_t	- Tidalvolumen
x	- Vergrößerungsfaktor (Optik)
α -SM1	- Monoklonaler Maus-Antikörper gegen α -SMA
α -SMA	- Alpha Smooth muscle actin
ΔP_{es}	- Amplitudendifferenz des intraösophagealen Drucks

*in dieser Arbeit wird gemäß der aktuellen Berlin Definition des ARDS statt „ALI“ der Begriff „moderates ARDS“ verwendet

Physikalische Einheiten

m milli 10^{-3}

μ mikro 10^{-6}

n nano 10^{-9}

g Gramm

s Sekunde

min Minuten

h Stunde

W Watt = Volt x Ampere

l Liter

Chemische Einheiten und Elemente

pH - pH-Wert, negativ dekadischer Logarithmus der H^+ -Ionenkonzentration

Na - Natrium

Cl - Chlorid

M - Molar (mol)

Warenzeichen [®] und [©] sind im Folgenden nicht speziell als solche gezeichnet.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Akute Lungenversagen im historischen Kontext der Intensivmedizin

Die ersten erfolgreich durchgeführten Langzeit-Beatmungen, die innerhalb einer Kohorte mit einer signifikanten Mortalitätssenkung¹ einhergingen, wurden während der Polioepidemie Mitte der 1950er Jahre in Dänemark von Bjørn Aage Ibsen et al.² etabliert und gelten als die Geburtsstunde der modernen Intensivmedizin³. In der Folgezeit entstanden weltweit Intensivstationen auf denen Patienten mit mechanischen Respiratoren behandelt wurden^{4, 5}. Mit den sich stetig erweiternden, intensiv-therapeutischen Möglichkeiten konnten Patienten mit respiratorischer Insuffizienz über längere Zeit therapiert werden.

Allerdings wurden bald die Limitationen und Nebenwirkungen als Folgen von Sauerstofftoxizität⁶⁻⁸ und Barotrauma^{9, 10} deutlich; diese werden unter dem Sammelbegriff „Ventilator induced lung injury (VILI)“^{5, 10} subsumiert. In dieser Zeit, noch vor Entdeckung und Einsatz des Surfactant-Proteins¹¹, hatte das neonatale Lungenversagen „Infant respiratory distress syndrome“ (IRDS) eine hohe Mortalität¹².

So zogen Ashbaugh et al. 1967 Parallelen zu pathophysiologischen Veränderungen ihrer adulten Patienten bei therapierefraktärer, respiratorischer Insuffizienz zum IRDS und prägten die erste Definition eines „Acute respiratory distress in adults“¹³⁻¹⁵. Trotz Ausschöpfung der damals zur Verfügung, stehenden intensivmedizinischen Therapieoptionen, blieben die von Ashbaugh beschriebenen Patienten hypoxämisch¹⁶. Dies war kein neues Problem, Einzelfallberichte^{17, 18} von respiratorischem Versagen hatte es bereits vor 1950 gegeben^{5, 19, 20}. Neu war die multiätiologische Definition des Syndroms der akuten respiratorischen Insuffizienz des Erwachsenen (ARDS)^{13, 16}.

Neben der Verwendung von positiv endexpiratorischen Drücken (PEEP)¹⁶ kam ab 1972, zunächst experimentell, die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO)²¹ bei therapierefraktärer Hypoxämie in der Intensivmedizin zum Einsatz. In der Anfangszeit war die ECMO durch die Verwendung von Rollerpumpen und der hierfür notwendigen, hochwirksamen Antikoagulation mit hohen Komplikationsraten durch Embolien und Blutungen assoziiert^{22, 23}. Weitere Behandlungsansätze des ARDS wie Flüssigkeitsbeatmung „Total liquid Ventilation“ (TLV) mit Perfluorcarbonen²⁴⁻²⁶ oder Hochfrequenzoszillationsventilation (HFOV)²⁷⁻³⁰ wurden erprobt, konnten aber bisher hinsichtlich einer

Mortalitätssenkung in der adulten Intensivmedizin nicht genügend klinische Evidenz erreichen^{28, 31}. Die extrakorporale Blutzirkulation der ECMO-Therapie wurde mit der Verfügbarkeit neuer Pumpentechniken³² und mit heparin-beschichteten Komponenten³³ sicherer anwendbar und erlebte so ab 2008 erweiterte Indikationsstellungen in spezialisierten ARDS Zentren^{23, 31, 34-37}. Mortalitäts-modulierende Effekte der ECMO konnten nur bei schweren ARDS gezeigt werden^{38,39}. Eine signifikante Senkung der Mortalität konnte durch die Verwendung niedriger Tidalvolumina (V_t) von 6 ml/kgKG im Vergleich zu V_t von 12 ml/kgKG erzielt werden⁴⁰. Weitere evidenzbasierte Therapien des ARDS sind gemäß der aktuellen Leitlinien^{38, 41} Beatmungsdrücke kleiner als 30 cmH₂O sowie die Bauchlagerung über mehr als 16 h^{42,43}. Eine neuromuskuläre Blockade in der Frühphase des ARDS^{44,45}, nicht-invasive Beatmungsverfahren^{46,47} (NIV) und Rekrutierungs-Manöver⁴⁸⁻⁵⁰ sind nach aktuellem Expertenkonsens in manchen klinischen Situationen empfohlen, allerdings noch mit wenig klinischer Evidenz belegt^{38,41}.

Mit den therapeutischen Optionen der heutigen Intensivmedizin ist damit der beim Lungenversagen auftretende Organfunktionsverlust temporär therapierbar und nur noch selten primäre Mortalitätsursache^{36, 51, 52}. Die aktuellen, klinischen Limitationen bei ARDS-Patienten ergeben sich vielmehr durch die häufige Koinzidenz eines multiplen Organversagens⁵³, einer pulmonalen Fibrose⁵⁴ und einem Versagen des Weanings⁵⁵ (Entwöhnung vom Beatmungsgerät und / oder ECMO). Dies sind wichtige Ursachen für die nach wie vor hohe Mortalität⁵¹ und Morbidität^{56,57} des ARDS.

Die pulmonale Fibrosierung⁵⁸ durch prolongierte Inflammation⁵⁹ wird bereits seit den 1990er Jahren als mortalitätsassoziierte Komplikation des ARDS erforscht. Patienten, welche die akute, hypoxische Phase des ARDS überleben, versterben nicht selten im Verlauf an den Folgen einer pulmonalen Fibrosierung^{59,60}. Bisher existiert weder eine kausale Therapie der ARDS-induzierten Fibrosierung noch gibt es ausreichende Erkenntnisse über die Pathophysiologie der pulmonalen Fibrose, die sich als potentielle Therapieziele eignen^{61,62}. So besteht auch mehr als 50 Jahre nach der ARDS Erstdefinition noch erheblicher Forschungsbedarf und das ARDS hat nach wie vor eine hohe Inzidenz und Mortalität in der Intensivmedizin^{14,15}.

1.2 Das Akute Lungenversagen (ARDS)

1.2.1 Definition des ARDS

Die Erstbeschreibung des ARDS geht auf Ashbaugh et al. zurück, die bei einer Fallserie von 12 erwachsenen Patienten gleichartige Symptomkonstellationen einer akuten respiratorischen Insuffizienz feststellten¹³. Alle Patienten hatten, bei differierender Ätiologie, eine rapid einsetzende, therapierefraktäre Hypoxämie mit diffusen, bilateralen pulmonalen Infiltraten und reduzierter respiratorischer Compliance^{13, 16}.

Im Kontext der klinischen Forschung folgten weitere Spezifikationen der ARDS-Definition wie ein Scoring System 1988 durch Murray et al.⁶³ und die Verwendung des Horovitz-Index zur Einstufung von Schweregraden im Jahre 1994 durch Bernard et al.^{64, 65}.

Die aktuelle „Berlin“-Definition des ARDS wurde durch die „ARDS Definition Task Force“ nach Evaluation infrage kommender Parameter aus umfangreichen klinischen Datenbanken auf der internationalen Konsensus Konferenz im Jahr 2012 beschlossen^{66, 67} (siehe Tabelle 1).

Wesentliche Neuerung war die dreistufige Schweregradeinteilung des ARDS anhand des Horovitz-Quotienten und der Wegfall des Begriffs Acute Lung Injury (ALI)^{64, 66}.

Auch die Verwendung eines PEEP von mindestens 5 cmH₂O wurde aufgrund des Einflusses auf die pulmonale Diffusionsfläche und die Oxygenierung seither verbindlich. Andere Parameter aus dem Entwurf der ARDS Definition, wie etwa die Compliance des respiratorischen Systems (C_{RS}) oder das zur suffizienten Decarboxylierung nötige Atemminutenvolumen ($\dot{V}E_{COOR} = MV \times (P_aCO_2 / 40)$) wurden wegen fehlender prädiktiver Validität nicht in die neue ARDS Definition aufgenommen^{66, 67}.

Die WHO führt das „Atemnotsyndrom des Erwachsenen“ als ICD-10 Code J80.

	ARDS		
Schweregrad	mild	moderat	schwer
Hypoxämie^a			
P_aO₂/F_iO₂ [mmHg]	≤ 300 und >200	≤ 200 und > 100	≤ 100
PEEP [cmH₂O]	PEEP/CPAP ^b ≥ 5	PEEP ≥ 5	PEEP ≥ 10
Zeitlicher Verlauf	Akuter Beginn innerhalb einer Woche nach bekannter klinischer Schädigung oder Neuauftreten / Verschlechterung einer respiratorischen Symptomatik.		
Ätiologie des Lungenödems	Respiratorisches Versagen, das nicht vollständig durch Herzinsuffizienz oder Flüssigkeitsüberladung erklärbar ist.		
Radiologische Auffälligkeiten Röntgen / CT	Beidseitige, pulmonale Verschattungen, die nicht vollständig durch Pleuraergüsse, (segmentale) Atelektasen oder Rundherde erklärt werden können.		
^a In Höhen über 1000m ü. NHN Anpassung nach: P _a O ₂ /F _i O ₂ x Barometerdruck /760			
^b CPAP auch als Non Invasive Ventilation (NIV)			

Tabelle 1: Berlin-Definition des ARDS (Tabelle modifiziert nach ⁶⁶)

1.2.2 Epidemiologie des ARDS

Zur Inzidenz des ARDS finden sich in der Literatur stark variierende Angaben⁶⁸. In europäischen Studien nach dem Jahr 2000 liegt die Inzidenz eines ARDS zwischen 5 bis 7,2 Fällen / 100.000 Einwohner / Jahr⁶⁹⁻⁷². In den USA hingegen wurden ARDS-Inzidenzen von bis zu 78,9 – 82,4 Fällen / 100.000 Einwohner / Jahr, zuletzt mit einem Rückgang auf 38,9 Fälle / 100.000 Einwohner / Jahr berichtet^{73,74}.

In der bislang größten internationalen Multicenterstudie zur klinischen Inzidenz des ARDS „LUNG SAFE“ (ESICM Trials) im Jahr 2014 von Bellani et al.⁵¹ wurden in 435 Kliniken 29.144 Patienten auf Intensivstationen beobachtet, von denen n=3022 (10,4%) die ARDS-Kriterien

erfüllten, dies waren 23,4% aller beatmeten Patienten⁵¹. Die Verteilung der ARDS-Prävalenz ergab 30,0% milde, 46,6% moderate und 23,4% schwere Fälle. Die Diagnose ARDS wurde durch die behandelnden Intensivmediziner allerdings nur bei 64,2% der Patienten gestellt (mild: 51,3%, moderat: 65,3%, schwer: 78,5%) und somit häufig übersehen⁵¹ oder nicht korrekt dokumentiert.

Die Mortalität des ARDS von rund 70% in den 1970er Jahren⁷⁵ konnte durch Verbesserungen in der Intensivmedizin auf aktuell ca. 40% gesenkt werden^{69, 71, 72, 75, 76}. In der „LUNG SAFE“ Studie wurde 2014 eine perihospitale Mortalität des ARDS von 40,0 % (mild: 34,9% / moderat: 40,3% / schwer: 46,1%) festgestellt, somit verstirbt auch heute noch nahezu jeder zweite Patient im schweren ARDS⁵¹, dies änderte sich in den letzten Dekaden kaum^{72, 77}. In einer Kohorten-Studie aus 59 Intensivstationen in Deutschland (DACAPO Studie n=700) wurden ARDS-Patienten eingeschlossen, wovon 79,0% eine primäre (pulmonale) Ursache des ARDS mit einer perihospitalen Mortalität von 33,6% hatten⁷⁸.

Nachuntersuchungen von langzeitüberlebenden ARDS-Patienten (n=109) aus Kanada zeigten eine relativ günstige Prognose: So konnten 5 Jahre nach ARDS bis zu 77% der Patienten wieder erwerbstätig sein^{57, 79}.

1.2.3 Ätiologie des ARDS

Ein akutes Lungenversagen ist die gemeinsame Endstrecke pathologischer Veränderungen unterschiedlicher Ätiologie^{13, 67}. Zumeist ist eine direkte, epithelial beginnende, pulmonale Schädigung⁷² durch Bakterien, Viren oder Aspiration ursächlich für ein primäres ARDS^{51, 80}. Das sekundäre ARDS hingegen entsteht durch initial endothelialeseitig beginnende Pathomechanismen extrapulmonaler Genese, wie beispielsweise eine systemische Inflammationsreaktion infolge einer Endotoxinämie bei einer Sepsis⁸⁰⁻⁸². In beiden Fällen resultieren letztlich diffuse alveoläre Defekte (DAD)^{83, 84}, die infolge von Permeabilitätsödemen⁸⁵ zu einer akuten respiratorischen Insuffizienz mit Hypoxämie und weiterer Inflammation führen können⁸². Bei beatmeten Patienten kann aggravierend ein beatmungsassoziierter Lungenschaden (VILI) hinzukommen⁸⁶⁻⁸⁸.

Klinisch existiert bei den meisten Patienten mit ARDS letztlich eine Mischform aus direkter und indirekter pulmonaler Schädigung⁸⁹.

Ätiopathogenese des ARDS		
	Primär <small>(intrapulmonal, epithelseitig beginnend)</small>	Sekundär <small>(primär extrapulmonal, endothelseitig beginnend)</small>
Inflammation exogen	Pneumonie ¹⁶ bakteriell / viral / fungal	Sepsis (Endotoxinämie): Peritonitis, Pankreatitis, Urosepsis, Malaria tropicana, et al. ^{78, 90}
	Aspiration von Mageninhalt	
	exazerbierte COPD ^{51, 91}	
Inflammation endogen	pulmonale Fibrose ⁹²	Goodpasture-Syndrom ⁹³
	Sarkoidose ⁹⁴	mikroskopische Polyangiitis ^{93, 95}
	Abstoßungsreaktion nach Lungentransplantation ⁹⁶	systemischer Lupus erythematoses ⁹³
Trauma	Thoraxtrauma ⁹⁷ , pulmonale Kontusion	Hämorrhagischer Schock ⁸² Reperfusionsschaden
		Schädel-Hirn-Trauma ⁹⁸
		Verbrennungen >30% KOF ⁸²
		Pulmonal arterielle Embolie durch Thrombus, Fett, Fruchtwasser ^{99, 100}
Koagulopathie	Blutaspiration ¹⁰¹ / bronchio-pulmonale Blutungen ¹⁰²	Disseminierte intravasale Koagulopathien, Mikroembolien ¹⁰³
		Massivtransfusion (TRALI) ⁸²
Toxisch	Inhalationstrauma ¹⁰⁴ Aspiration von Noxen Toxisches Lungenödem ^{105, 106}	Bleomycin induzierte Lungenfibrose ¹⁰⁷ / unerwünschte Arzneimittelwirkungen
	hyperbare oder langfristig konzentrierte (F _i O ₂ > 0,6) Sauerstoffinhalation ¹⁰⁸	i.v. Opiatabusus ¹⁰⁹ , Lipid-Emulsion Antidotinfusion ¹¹⁰
Physikalisch, Submersion	Explosionstrauma, Dekompressionsunfall ¹¹¹	
	Aspiration Süß-/Salzwasser	Höhenlungenödem ¹¹¹
	Radiatio (thorakales Strahlenfeld) ¹¹²	
Iatrogen	Beatmungsinduzierter Lungenschaden (VILI) ⁸⁷	Nosokomiale, systemische Infektion / Katheter-Sepsis
	Ventilator assoziierte Pneumonie (VAP) ⁵²	Hypervolämie / -hydratation bei Volumenersatztherapie ¹¹³

Tabelle 2: Ätiopathogenese des ARDS erweitert und modifiziert nach^{80, 81, 114} (KOF = Körperoberfläche)

1.3 Pathogenese des ARDS und der pulmonalen Fibrosierung

Nach klassischem, histopathologischen Verständnis^{80, 81} erfolgt eine Unterteilung des ARDS in 3 Phasen^{80, 81, 114}:

1. Inflammatorisch-exsudative Phase
2. Proliferative Phase¹¹⁵
3. Fibrotische Phase¹¹⁶

Die Fibrosierung fällt nach dem o.g. Schema in die späte Phase des ARDS, wobei der zeitliche Ablauf dieser Einteilung, je nach Pathogenese, interindividuell sehr variabel ist^{61, 84, 117, 118}. Eine klinische Einteilung nach Gattinoni erfolgt in eine frühe, mittlere und späte Phase⁸⁸.

1.3.1 Pathobiochemie der Inflammation im ARDS

Molekulare Trigger einer Inflammation können sowohl Noxen, welche als „Damage associated molecular patterns“ (DAMPs)^{98, 119, 120} bezeichnet werden, oder Infektionen mit sogenannten „Pathogen associated molecular patterns“ (PAMPs)^{119, 121, 122} sein, die zur Aktivierung von Immunzellen führen¹²²⁻¹²⁴. Ein starkes PAMP stellen Endotoxine dar, wie z.B. Lipopolysaccharide (LPS) aus der Zellmembran gramnegativer Bakterien^{125, 126}. LPS bindet an Plasmaproteine (LBP)¹²⁶ und ist ein sehr potenter Ligand an den CD14-¹²⁷ und Toll-like-Rezeptoren^{123, 128}, die sich unter anderem auf Monozyten und Makrophagen in einem „Inflammasom“ genannten Proteinkomplex befinden¹²⁷. Hierdurch kommt es zu einer von Caspase-1 vermittelten, schnellen Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin-1 β ^{82, 119, 129}.

Bei durch LPS stimulierten Leukozyten entsteht, durch den Nuclear-factor-kappa-B (NF κ B)^{123, 130} vermittelt, eine vermehrte Expression proinflammatorisch wirkender^{81, 114, 131} Interleukine (IL) wie IL-1 β , IL-6 und IL-12^{59, 114, 128, 132, 133}. Gleichzeitig wird von durch LPS stimulierten Makrophagen Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF α) freigesetzt^{132, 134, 135}, welcher einerseits die Expression weiterer inflammatorischer Proteine¹³⁶ stimuliert und eine Caspase induzierte Apoptose auslösen kann^{119, 137, 138}. Mit fortschreitender Inflammation kommt es durch Chemotaxis zur Migration und Mobilisation von neutrophilen Granulozyten^{114, 123}, die durch Chemokine wie Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant 1 (CINC-1/CXCL1)^{82, 139} gelenkt wird.

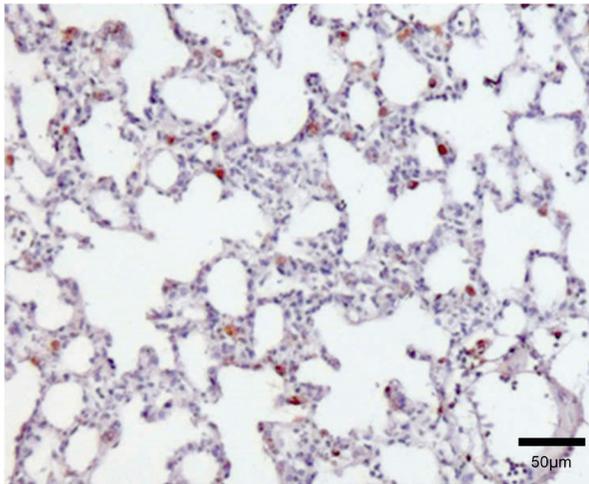


Abbildung 1 Pulmonale Alveolarmakrophagen in der gesunden, beatmeten Ratte.

(Eigene Bilder, CD68-IHC-Färbung in braun)

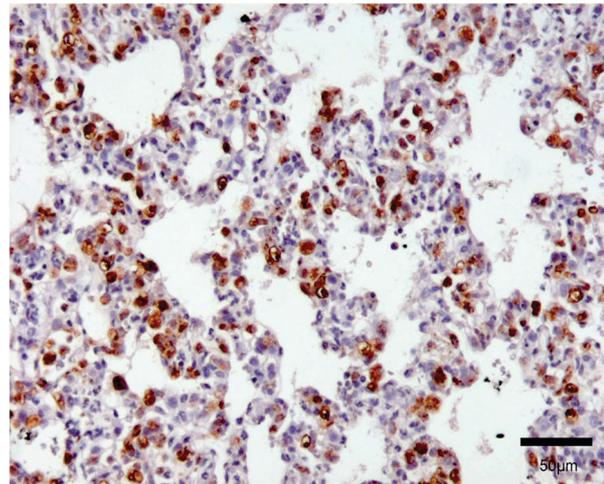


Abbildung 2 Pulmonale Inflammation mit Leukozyten Aggregation unter LPS-Sepsis in der Ratte.

(Eigene Bilder, CD68-IHC-Färbung in braun)

Makrophagen und Monozyten können mit CD68 Antikörper dargestellt werden¹⁴⁰.

1.3.2 Pathophysiologie des ARDS im septischen Schock

Während einer Sepsis kommt es zu einer systemischen Ausbreitung einer Inflamationsreaktion auf den gesamten Organismus⁹⁰.

Infolge von proinflammatorischen Zytokinen^{59, 114}, Prostaglandinen und insbesondere Stickstoffmonoxid (NO)^{141, 142} entsteht eine zunächst lokale und im fortgeschrittenen Stadium auch systemische Vasodilatation¹⁴², wodurch der periphere vaskuläre Widerstandsindex fällt und ein septischer Schock entsteht^{18, 90, 124}. Bei einer starken Infektion kann der septische Schock^{143, 144} nach einer Latenz von 24-48 h infolge der Mikrozirkulationsstörungen mit einem ARDS und multiplen Organversagen⁵³ einhergehen^{90, 124}.

Aktivierte Granulozyten und Makrophagen⁸² setzen zytotoxische Zytokine wie TNF α ^{132, 134, 135} frei und geben bei Ihrer lokalen Migration und Abwehrreaktion Metalloproteinasen^{145, 146}, Kollagenasen¹⁴⁷ und Peroxide¹⁴¹ frei. Dies führt neben der Pathogeninaktivierung auch zu Kollateralschäden an Endothelzellen und Glycocalyx^{148, 149} mit der Folge eines capillary-leak-syndrome^{113, 149}.

Aufgrund anatomisch-physiologischer Gegebenheiten besteht bei systemisch-inflammatorischen Prozessen eine besondere Vulnerabilität der Lunge^{53, 82, 103}.

Die Lunge, als stark perfundiertes Organ mit systemischer Filterfunktion, ist davon im besonderen Maße betroffen⁵³, weil in den pulmonalen Kapillaren aktivierte Leukozyten akkumulieren können^{114, 150} und sie die größte epitheliale Organoberfläche des Körpers hat¹⁰³. Die Vasa publica der Lunge bilden ein vom gesamten Herzzeitvolumen durchströmtes perialveoläres Kapillarnetz, in dem größere, zentralvenös angeschwemmte Partikel hängen bleiben¹⁵¹ und (physiologischerweise) phagozytiert werden¹⁵². Während einer Sepsis wird dieser Filter mit zirkulierenden Leukozytenaggregaten^{114, 150}, Bakterien und Mikrothromben überladen und embolisiert partiell¹⁵². Letztere entstehen im Rahmen einer disseminierten intravasalen Koagulopathie¹⁰³. Dies wiederum bewirkt eine lokale Aktivierung der zahlreichen pulmonalen Granulozyten¹⁵³ und Alveolarmakrophagen^{103, 152, 154}. Im pulmonalen Kapillarbett führt diese Inflamationsreaktion zum kapillar-alveolären Leck^{113, 149, 155}, welches durch Extravasation von Plasmabestandteilen die für das ARDS charakteristischen, proteinreichen Permeabilitätsödeme^{82, 85, 113, 156} mit hyalinen Membranen¹⁵⁷ in den Alveolen entstehen lässt.

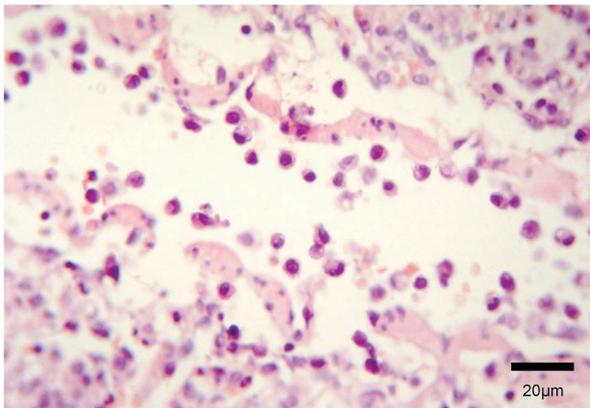


Abbildung 3: Intravaskuläre Leukozytenaggregation und endotheliale Destruktion mit perivasalen Ödemen in der Rattenlunge im ARDS.
(Eigene Bilder [LPS 1.5 mg] HE-Färbung, 400x)

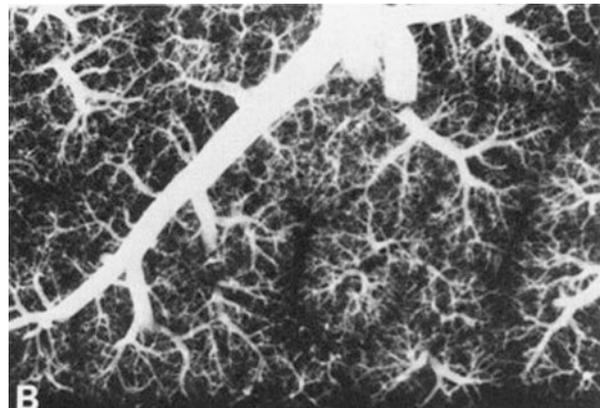


Abbildung 4: Angiographie eines Lungenschnitt mit Mikroembolien bei ARDS.
aus: Tomashefski et al. Am J Pathol 1983, Vol. 112 Page 115
Figure 2, B © Elsevier mit freundlicher Genehmigung

1.3.3 Pathobiochemie der pulmonalen Fibrosierung im ARDS

Infolge der Inflammationsreaktion im ARDS kommt es zu fibrotischen Veränderungen im Lungengewebe, die klinisch mit einer erhöhten Mortalität^{60-62, 158-160} korrelieren und bereits in frühen Stadien des ARDS beobachtet wurden^{61, 117, 118, 158, 161, 162}.

Die pulmonale Fibrose im ARDS^{60, 115, 117, 163} ist durch überschießende, parenchymatöse Aktivität von Fibrozyten und der Akkumulation von Kollagenen^{61, 117} charakterisiert¹⁶⁴. Kollagene sind wichtige Proteine, die der extrazellulären Matrix ihre Stabilität und Elastizität verleihen¹⁶⁵. Im pulmonalen Interstitium dominieren die Kollagene I und III^{166, 167}. Kollagene entstehen aus den von Fibroblasten exprimierten Prokollagenen (PC), die nach extrazellulär transportiert werden, wo Prokollagen-Peptidasen die endständigen N-terminalen Peptide des Prokollagen (NT-PC) abspalten und eine Polymerisationsreaktion mit dem Endprodukt Kollagenfibrillen auslösen^{165, 168, 169}. Mehrere Untersuchungen seit den 1980er Jahren konnten Prokollagene^{58, 170} als reliable Marker¹⁷¹ für pulmonale Reparatur- und Fibrosierungsprozesse verschiedenster Kausalitäten identifizieren^{161, 172, 173}. Analysen des Serums^{58, 158, 172} und der bronchoalveolären Lavage (BAL)^{161, 174, 175} von ARDS Patienten haben neben Fibrozyten¹⁷⁴ auch Prokollagene des Typs I und III (PC I, PC III)^{161, 168, 172, 176, 177} nachgewiesen, deren erhöhte Konzentrationen mit Morbidität und Mortalität korrelierten^{118, 133, 158, 161, 174, 175}.

Dabei ist eine erhöhte Expression und Konzentration von PC III^{128, 142} hauptsächlich in der frühen^{118, 178} und PC I^{167, 175, 179} eher in den späten Stadien^{170, 175} des ARDS festgestellt worden. Auch experimentelle Arbeiten haben etwa nach intratrachealer Applikation von LPS bei Ratten einen Expressionsanstieg von PC III festgestellt^{168, 179}. Experimentelle Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe zeigten in den ersten 48 h eines LPS-induzierten ARDS unter lungenprotektiver Beatmung^{29, 162} interessanterweise eine Abnahme der parenchymatösen PC III Expression²⁹.

Neben der Inflammationsreaktion sind erhöhte Beatmungsdrücke mit pulmonalen Scherkräften^{180, 181} wesentliche Trigger einer vermehrten Expression von PC III^{29, 62, 178, 182}. Durch Inflammation^{120, 121} und mechanische Belastung¹³⁶ kommt es im Lungenparenchym zur Destruktion der extrazellulären Matrix^{80, 183}, Apoptose^{137, 184} und Induktion von Reparaturmechanismen der Wundheilung, die sogenannte „tissue defense response“ (TDR)¹⁸⁵. Der Verlust von Zell-Zell-Verbindungen der Basalmembran^{166, 183, 186} sowie Zytokine wie TGF α ¹⁸⁷ induzieren im ARDS eine epithelial-mesenchymale Transformation (EMT)^{62, 186, 188}.

Dabei wandeln sich epithelseitig vorhandene Pneumozyten in Fibrozyten¹⁸⁸, indem sie mesenchymale Proteine wie Vimentin, N-Cadherin und α -smooth muscle actin (α -SMA) exprimieren^{62, 189}. Zusätzlich kommen über das Blut zirkulierende Fibrozyten^{62, 190} aus mesenchymalen Stammzellen hinzu, sodass destrukturierte alveoläre Areale durch Fibroproliferation restrukturiert werden können¹⁸².

Sowohl in BAL-Messungen bei ARDS Patienten^{159,160,191} als auch in experimentell induzierter Fibrose¹⁹¹⁻¹⁹³ wurde α -SMA als ein weiterer Marker der Fibroproliferation etabliert¹⁹⁴. Die α -SMA-haltigen Fibrozyten werden auch als Myofibrozyten bezeichnet^{182,192}. Sie besitzen die Fähigkeit zur Migration in destruierte Areale und eine vermehrte Syntheserate von extrazellulären Matrixproteinen^{62,80,195}.

Je stärker die Basalmembran geschädigt ist, desto schlechter baut sich die ursprüngliche, septierte alveoläre Struktur wieder auf^{80, 166}. Die in Folge der Fibrosierung verdickte interstitielle Kollagenschicht^{60,117} geht mit einer Störung der alveolären Diffusionsstrecke und letztlich mit einer chronischen pulmonalen Insuffizienz einher^{80,185,196}. Katzenstein et al. prägten 1976 dafür den Begriff der diffusen alveolären Schädigung⁸³ „diffuse alveolar damage“ (DAD)⁸³ (Abbildung 6¹⁸³).

Eine medikamentöse Therapie der pulmonalen Fibrose mit Kortikoiden konnte bisher weder experimentell¹⁹⁷ noch klinisch¹⁹⁸ eindeutig positive Effekte zeigen. Bei Pneumonien durch Influenza-Viren erhöhte sich durch Einsatz von Kortikoiden die Mortalität¹⁹⁹.

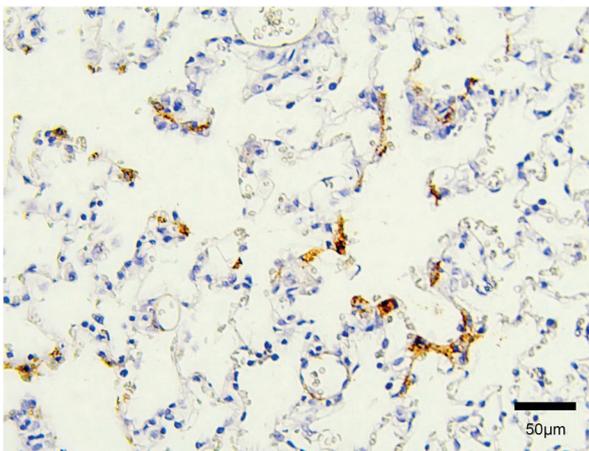


Abbildung 5: Pulmonale α -SMA positive Zellen in der gesunden Ratte.

(Eigene Bilder [UI], α -SMA-IHC-Färbung: braun, 200x)

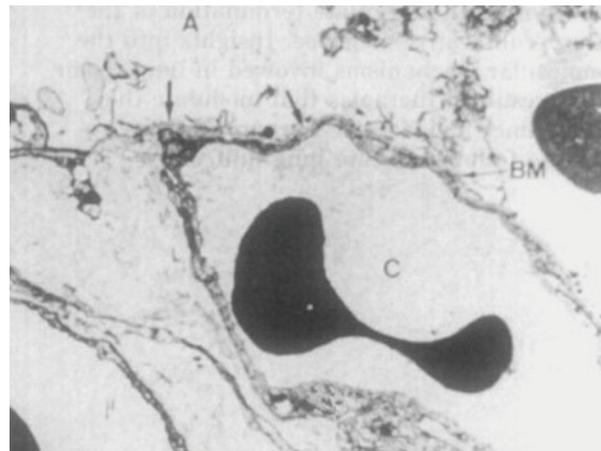


Abbildung 6: Alveole (A) nach ARDS mit Kapillare (C) und geschädigter Basalmembrane (BM).

Quelle: Bitterman, PB Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. *The American Journal of Medicine* 1992, 92(6): S40, Figure 1 © Elsevier mit freundlicher Genehmigung

1.3.4 Pulmonale Schädigung durch Beatmung als Trigger der Fibrose

Die Therapie der akuten respiratorischen Insuffizienz mit konzentriertem Sauerstoff und mechanischer Ventilation ist primär lebensrettend, kann aber per se zu sekundären, pulmonalen Schäden führen¹⁰. Bereits früh wurde experimentell bekannt, dass Beatmungsgeräte Lungenschäden verursachen können²⁰⁰. Diese Auswirkungen wurden zunächst als „ventilator lung“¹⁶ bezeichnet, bis sich später der Begriff „Ventilator-induced lung injury“ (VILI) prägte^{9, 10, 86}.

Ein VILI entsteht aus simultanen Effekten^{10, 86, 201} der folgenden Faktoren:

Erstens die Sauerstofftoxizität⁷, die mit steigender Konzentration, Partialdruck und Expositionsdauer durch oxidativen Stress eine Lungenfibrose induziert^{6, 8, 38}.

Zweitens das Barotrauma, welches in der Vergangenheit als primäre pathogene Ursache angesehen wurde⁹. Unter Verwendung sehr hoher Tidalvolumina wurden in den 1960er und 1970er Jahren häufig beatmungsassoziierte Pneumothoraces gesehen, was zur Einführung von Sicherheitsgrenzen zur Druckbegrenzung führte^{5, 9, 202}. Später wurde deutlich, dass nicht die absolute Höhe des Beatmungsdrucks, sondern der endinspiratorisch wirkende Druck, der „driving pressure“, für die Schädigung entscheidend ist^{203, 204}. Dieser wiederum korreliert in Abhängigkeit der Lungen-Compliance mit dem Tidalvolumen ($\Delta V = \Delta P \times C_{RS}$).^{10, 203}.

Drittens das Volutrauma, das durch zu hohe Tidalvolumina für die im ARDS teils drastisch reduzierten funktionellen Lungenareale²⁰⁵ eine lokale endinspiratorische Distension der Alveolen⁸⁶ verursacht^{40, 86}.

Viertens ist als weiterer lungenschädigender Faktor das Atelekttrauma^{52, 206} zu nennen, welches durch atemzyklisches Rekrutieren und endexpiratorisches Kollabieren von Alveolen zu Scherkräften führt^{207, 208}, die durch PEEP²⁰⁹ und eine „open lung strategy“^{29, 48} (siehe 1.3.5) vermindert werden können.

Fünftens das Biotrauma, welches die biophysikalischen Effekte beschreibt, die auf zellulärer Ebene proinflammatorische Zytokine freisetzen^{128, 201}, wodurch eine Inflamationsreaktion^{134, 210} mit nachfolgender Fibrosierung^{182, 211} ausgelöst wird.

Als sechstes und neuestes Konzept ist die Energie des Beatmungsgerätes, die auf die Lunge übertragen wird, für ein VILI entscheidend^{196, 197}. Dabei sind nicht allein die Druck-Volumen-Relation, sondern insbesondere auch Atemfrequenz und Flussraten für pulmonale Schäden verantwortlich^{212, 213}. Aktuell wird kontrovers diskutiert, ob die auf geschädigte Lungenareale disproportional übertragene Energie allein die Effekte des VILI erklären kann²¹⁴.

Mit zunehmender Dauer^{162, 215} und Invasivität⁸⁶ der Beatmung kommt es vermehrt zu strukturellen Schädigungen an der alveolären Basalmembran, wodurch Inflammationsreaktionen entstehen, die durch endotheliale-mesenchymale Transformation zu einer pulmonalen Fibrosierung führen^{10, 62, 117, 166, 182, 201, 216}.

1.3.5 Protektive Beatmungsstrategien bei ARDS

Die aktuellen internationalen Behandlungsleitlinien der amerikanischen und europäischen intensivmedizinischen Fachgesellschaften³⁸ sowie die daran angelehnte S3-Leitlinie zur invasiven Beatmung⁴¹ geben Maßnahmen einer evidenzbasierten, lungenprotektiven Therapie des ARDS vor.

Eine der entscheidendsten Verbesserungen in der ARDS-Therapie der letzten Jahre war die Einführung kleiner Tidalvolumina (V_t) von 6 ml/kg des idealisierten Körpergewichts (kgKG), wodurch im Vergleich zu traditionellen V_t von 12 ml/kgKG, die Mortalität signifikant (31,0% vs. 39,8%; $p=0,007$) vermindert werden konnte⁴⁰. Während eine permissive Hyperkapnie unter der Verwendung von niedrigen V_t ohne Azidose akzeptabel erscheint, ist zur suffizienten Oxygenierung eine ausreichend große alveoläre Diffusionsfläche notwendig, die durch Rekrutierung^{49, 217, 218} geschaffen und mit PEEP aufrechterhalten werden kann^{16, 49}. Bei verminderter extrapulmonaler Compliance durch Thoraxrigidität oder abdomino-/diaphragmalen Druck ist die Messung des transpulmonalen Drucks²¹⁹ hilfreich, um Recruitment und Beatmung nach intrapulmonalen Druckverhältnissen zu adjustieren^{220, 221}. Der intraösophageale Druck²²² wird dabei nach der Methode von Talmor et al.^{219, 220, 223} als Surrogatparameter der intrapleurale Druckverteilung²⁰⁶ gemessen. Der transpulmonale Druck errechnet sich aus dem Atemwegsdruck minus den intraösophagealen Druck²²⁰ und ist ausschlaggebend für alveoläre Schäden¹⁰.

Interessanterweise ist ein PEEP nach der Tabelle des ARDS-Netzwerks⁴⁰ nicht immer ausreichend, um bei allen Patienten einen positiven transpulmonalen Druck zu erzeugen^{224, 225}. Eine zukunftsweisende Strategie zur Ventilation im ARDS wurde bereits 1995 von Amato et al. mit dem „Open Lung“ (OL) Konzept vorgestellt⁴⁸. Dafür wird zunächst ein druckkontrolliertes Rekrutierungsmanöver mit hohem PEEP durchgeführt²²⁶. Anschließend werden PEEP und Beatmungsdruck bei isovolämen V_t stufenweise abgesenkt²²⁶, bis mit der bestmöglichen Compliance ($\Delta V/\Delta p$ siehe Kapitel 2.3.5) der individuell optimale PEEP „best

PEEP“ ermittelt ist⁴⁸. Der zur Rekrutierung notwendige hohe PEEP kann allerdings hämodynamische Nebenwirkungen²²⁷ und pulmonale Schäden verursachen^{228, 229}.

In einer multivariaten Analyse mit (n=3562) ARDS-Patienten konnten Amato et al. zeigen, dass mit steigenden Arbeitsdrücken ($P_{\text{peak}} - \text{PEEP} = \Delta P = \text{driving pressure}$) die Mortalität ansteigt und ein hoher PEEP nicht immer protektiv ist^{203, 204}. Weitere sekundäre Datenbankanalysen bestätigten diese Ergebnisse²³⁰.

Die bisher größte multizentrische Studie zum alveolaren Recruitment beim ARDS (ART-Trial) schloss 1010 Patienten, überwiegend aus Brasilien, ein²³¹. Die Interventionsgruppe (n = 509 Patienten) erhielt im ART-Trial gemäß Studienprotokoll ein OL-Recruitment, wobei der PEEP bis auf 35-45 cmH₂O gesteigert wurde. Hierbei entstanden zum Teil sehr hohe Spitzendrücke von bis zu 50 cmH₂O. Unter diesen verhältnismäßig hohen Beatmungsdrücken wurden vermehrt Komplikationen wie Barotraumatata, Pneumothoraces und vereinzelt Herz-Kreislauf-Stillstände beobachtet, worauf das Studienprotokoll abgewandelt wurde²³¹. Insgesamt hatte die Interventionsgruppe unter „lung recruitment and titrated PEEP“ gegenüber der Kontrollgruppe mit „low PEEP“ eine signifikant höhere Mortalität nach 28 Tagen (55,3% vs. 49,3%) und nach 6 Monaten (65,3% vs. 59,9%)²³¹. Dennoch wurde von den Autoren und anderen Experten die Verwendung einer open lung Strategie mit moderatem PEEP-Level als vorteilhaft angesehen²³² und eine erneute Untersuchung mit verbessertem Studienprotokoll gefordert²³³.

Weitere RCT-Studien zum Open Lung Approach bei ARDS Patienten zeigten lediglich eine positive Tendenz (29% vs. 33%, p=0,18) in der 60-Tage-Mortalität⁵⁰ oder keinerlei Mortalitätsunterschiede²³⁴. Einerseits führte der Open Lung Approach zu einer verbesserten Oxygenierung mit konsekutiv vermindertem Einsatz von Lungenunterstützungsverfahren wie ECMO, andererseits wurden vermehrt kardiale Arrhythmien beobachtet^{50, 234}.

In einem Cochrane Review von 2016 über Rekrutierungsmanöver bei ARDS-Patienten wurden die Einschlusskriterien von 10 Studien mit n = 1658 Patientendaten erfüllt, deren Daten eine Tendenz zu verringerter Mortalität auf Intensivstation zeigten²³⁵. Aufgrund der geringen Datenmenge und der Heterogenität der in den einzelnen Studien verwendeten Beatmungsprotokolle und Spitzendrücke (P_{max} von 30 bis 60 cmH₂O) konnte nur ein niedriges Evidenzniveau erreicht werden²³⁵.

Im perioperativen Setting wurde eine OL-Strategie mit niedrigen Tidalvolumina ebenfalls untersucht und von mehreren Autoren als vorteilhaft angesehen^{236, 237}.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Das akute Lungenversagen (ARDS) hat nach wie vor eine hohe Inzidenz und Mortalität in der Intensivmedizin^{14, 15}. Auch wenn heute die akute Hypoxämie des ARDS temporär gut therapierbar geworden ist^{36, 51, 52}, betrifft die perihospitale Mortalität immer noch mehr als ein Drittel^{51, 78} der ARDS-Patienten. Dabei stellt nach dem Multiorganversagen die pulmonale Fibrosierung^{59, 60} als Folge prolongierter Inflammation⁵⁹ und mechanischer Ventilation^{10, 212} die wichtigste mortalitätsassoziierte Komplikation des ARDS dar^{51, 62}. Bisher existiert keine gezielte Therapie der ARDS-bedingten Lungenfibrose, weshalb verbesserte Kenntnisse über den pathophysiologischen Verlauf der Inflammationsreaktion und Erkenntnisse über modulierende Effekte lungenprotektiver Beatmungsstrategien²³⁸ an der Fibrosierung zur Verbesserung der intensivmedizinischen Versorgung beitragen könnten. In einer retrospektiven Analyse aus unveröffentlichten Daten vorangegangener Experimente der Arbeitsgruppe „Pulmonale Insuffizienz“ (Krebs et al.) wurde im Lungenparenchym von Ratten mit LPS-induzierten ARDS eine signifikant inverse Korrelation zwischen IL-6- und Prokollagen-III-RNA-Expression festgestellt¹⁶² (s. Abbildung 7). Dabei wurde der Zusammenhang zwischen progredienten Dosen an LPS und der Fibrosierung im pulmonalen Parenchym unter lungenprotektiver Beatmung bisher noch nicht untersucht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Zusammenhang zwischen Inflammation und Fibrose in der Initialphase des akuten Lungenversagens unter protektiver mechanischer Ventilation genauer zu untersuchen.

Durch eine prospektive, randomisierte und kontrollierte Studie²³⁸ mit definiert steigenden Lipopolysaccharid-Dosen wurden die Effekte von Inflammationsreaktion sowie der frühen pulmonalen Fibrosierung in vivo am Modellorganismus beobachtet und in vitro gemessen, um die folgenden Arbeitshypothesen zu prüfen:

Primärer Endpunkt:

- 1) Wird die frühe pulmonale Fibrosierung infolge der progressiv gesteigerten LPS-induzierten Inflammation unter Verwendung einer lungenprotektiven Beatmungsstrategie supprimiert?

Sekundäre Endpunkte:

- 2) Wie verhält sich die systemische und die pulmonale Inflammationsreaktion unter steigenden LPS-Dosen in vivo?
- 3) Welche Auswirkungen haben verschiedene Schweregrade der Endotoxämie auf die respiratorischen und hämodynamischen Funktionsparameter im Modellorganismus?
- 4) Kann durch lungenprotektive Beatmung mittels der open lung strategy auch bei steigender Inflammationsreaktion eine suffiziente Oxygenierung gewährleistet werden?
- 5) Gibt es bei der Quantifizierung der Schädigung des pulmonalen Parenchyms infolge steigender Inflammationsreaktion und mechanischer Ventilation loko-regionäre Unterschiede?
- 6) Finden sich unter lungenprotektiver „open lung strategy“ Beatmung histologische Korrelate der frühen pulmonalen Fibrose?
- 7) Wie verhält sich die Expressionskinetik der proinflammatorischen Zytokine und der Prokollagene unter variabler Inflammationsreaktion?
- 8) Besteht in der initialen Phase des septisch induzierten sekundären ARDS im pulmonalen Parenchym eine inverse Kinetik der mRNA-Expression von IL-6 und PC III?

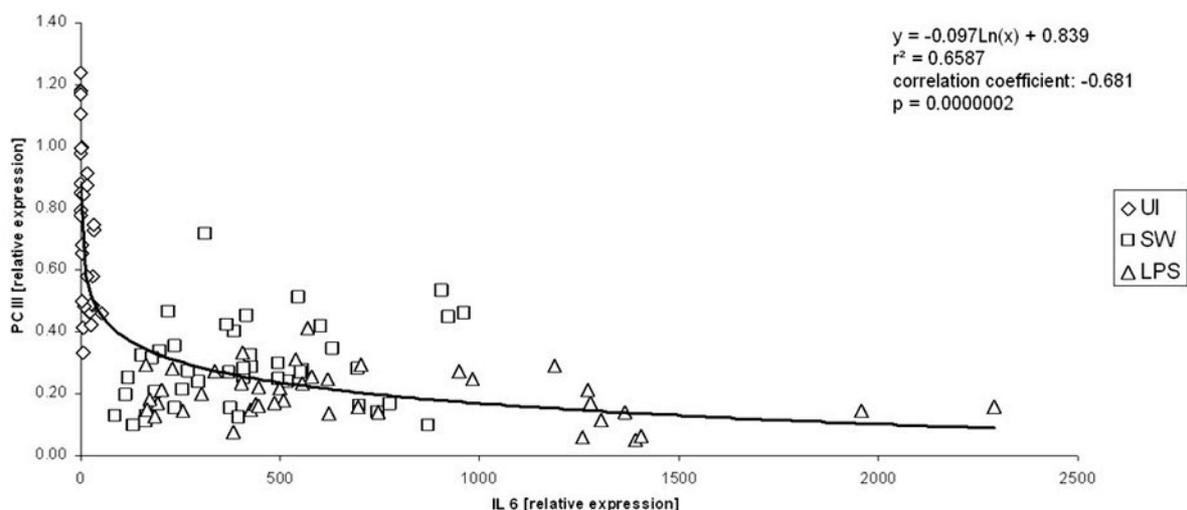


Abbildung 7: Negative Korrelation zwischen relativer Expression von Interleukin-6 und Prokollagen-III.

Zusammengesetzte Daten aus 3 beatmeten Gruppen (low-PEEP CMV, Best-PEEP CMV und HOF) in 3 verschiedenen ARDS Modellen (LPS systemisch = LPS, NaCl-Lavage = SW, Kontrolle = UI) unveröffentlichte Daten aus²⁹.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Studiendesign und Modellorganismus

2.1.1 Versuchstiere und Haltung

Die Planung und Durchführung der Versuche erfolgte gemäß den Bestimmungen des "Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 20 des Gesetzes vom 9. Dezember 2010 (BGBl. I S. 1934) geändert worden ist" sowie den Empfehlungen der Gesellschaft für Tierversuchskunde GV-SOLAS²³⁹⁻²⁴¹.

Beim Regierungspräsidium Karlsruhe wurde das Versuchsvorhaben gemäß §8 TierSchG beantragt und am 02.05.2012 unter dem Aktenzeichen 35-9185.817G-46/12 genehmigt.

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten (*Rattus norvegicus forma domestica*) im Alter von 16-18 Wochen mit einem durchschnittlichen Körpergewicht (KG) von 530g ± 24g. verwendet, die von der Firma Janvier (Elevage Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich) bezogen wurden.

Nach Anlieferung durch den Züchter wurden alle Tiere vor Versuchsbeginn für mindestens zwei Wochen im Tierhaus des Universitätsklinikums Mannheim akklimatisiert. Die Ratten wurden unter spezifisch pathogenfreien Standardbedingungen (SPF) gemäß den Empfehlungen der GV-SOLAS²³⁹ in Gruppen von je 4 Tieren gehalten und mit Wasser und Alleinfuttermittel für Ratten- und Mäusehaltung (V1534-000) der Firma Sniff Spezialdiäten GmbH (Soest, Deutschland) ad libitum ernährt.

2.1.2 Gruppeneinteilung

Die 40 männlichen Wistar-Ratten wurden in 5 Gruppen zu jeweils 8 Tieren randomisiert:

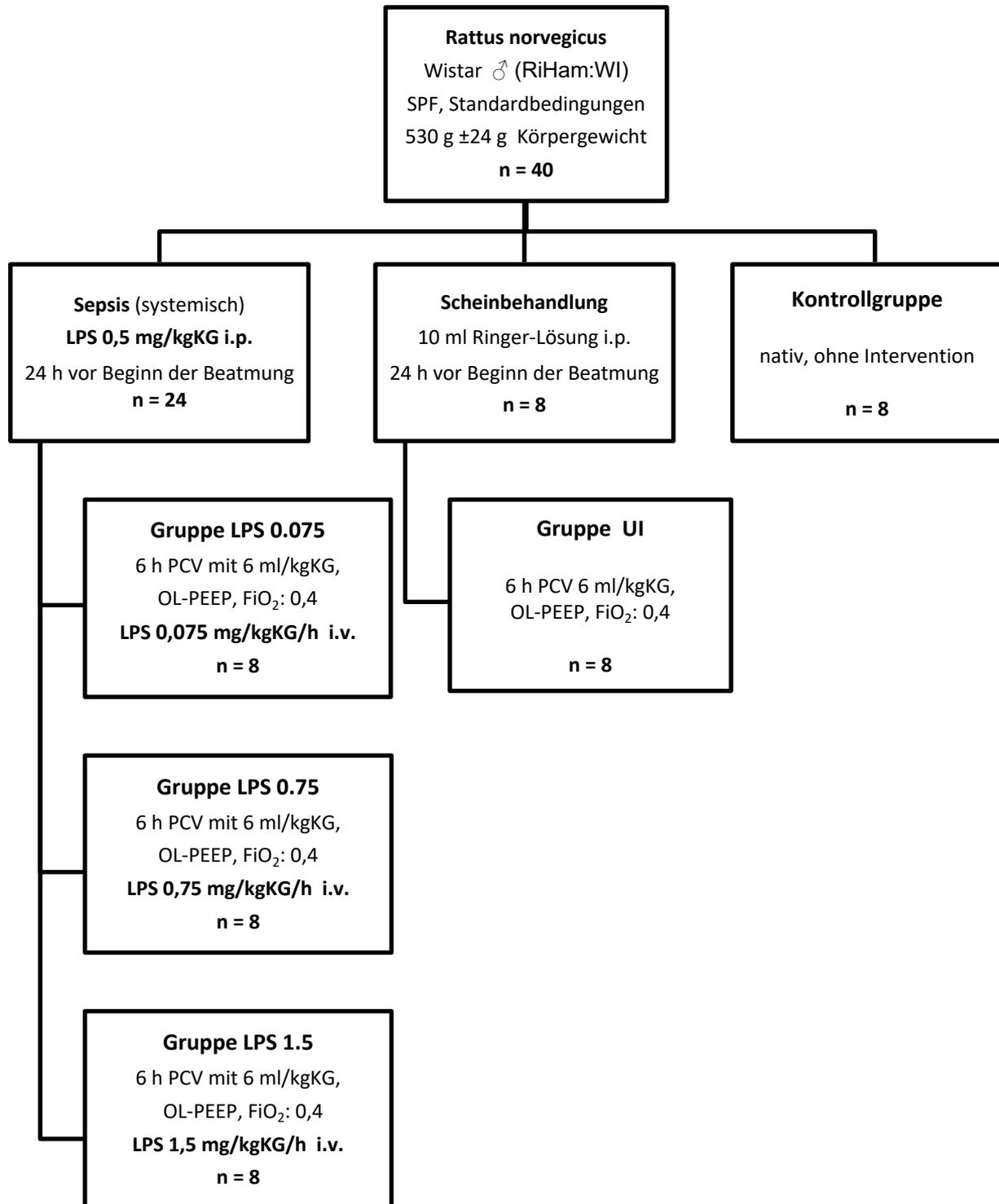


Abbildung 8: Gruppeneinteilung und Versuchsablauf

Bis auf die native Kontrollgruppe wurden alle Tiere über 6 h kontrolliert beatmet.

2.2 Versuchsvorbereitungen

2.2.1 Induktion einer akuten Lungenschädigung mittels LPS

Für die Versuche wurde eine standardisierte, über Phenol aufgereinigte Lipopolysaccharid-Charge aus *Escherichia coli* des Serotype O55:B5 (Best.Nr.: L2880, Charge: 032M4082V) der Firma Sigma verwendet.

Alle Tiere der LPS-Gruppen erhielten jeweils 24 h vor Versuchsbeginn eine Dosis von 0,5 mg/kg Körpergewicht Lipopolysaccharide intraperitoneal (i.p.) injiziert^{242,243}.

Dazu wurden die Tiere gewogen und eine inhalative Narkose mit 4 % Isofluran aus einem Verdampfer für volatile Anästhetika (Vaporizer) eingeleitet. Zur Analgesie wurden 30 µg/kgKG Buprenorphin nuchal subkutan injiziert²⁴¹. Anschließend erfolgte in der mittleren, rechten Region des Abdomens eine intraperitoneale Injektion mit 0,5 mg/kgKG Lipopolysaccharide, welche in 10 ml einer auf 37 °C temperierten Vollelektrolytlösung gelöst waren. Damit wurde eine gleichmäßige Verteilung über das gesamte Peritoneum erreicht und gleichzeitig eine Flüssigkeitssubstitution durchgeführt.

Die Tiere aus der UI-Gruppe erhielten nur Vollelektrolytlösung ohne LPS injiziert.

Nach dem Eingriff wurden die Tiere einzeln für 24 h in Isolated Ventilated Cages (IVC) unter Standardbedingungen gehalten und regelmäßig beobachtet.

2.2.2 Anästhesie und OP-Vorbereitungen

Unter inhalativer Kurznarkose, wie oben beschrieben, erfolgte eine i.p.-Injektion mit 1 mg/kgKG Midazolam und 50 mg/kgKG Ketamin. In regelmäßigen Abständen wurden Atemtätigkeit und Herzaktion sowie die chirurgische Toleranz anhand des Zwischenzehenreflex²⁴⁰ überprüft.

Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Wärmeplatte gelagert, um die Körpertemperatur im Bereich vom 37°C ± 0,5°C konstant gehalten. Beide Augen wurden vor Austrocknung geschützt. Einer Rasur der OP-Gebiete folgte eine Hautdesinfektion (Softasept® N, Einwirkzeit 2 x 1 min), danach wurde steril abgedeckt und im Bereich der Hautinzisionen jeweils 0,1 - 0,2 ml des Lokalanästhetikums Scandicain 2 % subkutan injiziert.

2.2.3 Arterielle und venöse Katheterisierung

Unter erloschenen Schmerzreflexen wurde direkt über dem proximal palpablen Anteil der A. femoralis eine 10 mm messende Hautinzision durchgeführt. Der operative Zugang wurde stumpf durch das subkutane Fettgewebe in die Tiefe Richtung Gefäß-Nerven-Bündel erweitert. Die, die femoralen Gefäße umgebende Faszia wurde eröffnet, die Gefäße von der Adventitia separiert und mit Fäden (USP 5/0; metrisch: 0,1) unterbunden.

Vena und Arteria femoralis wurden distal ligiert, proximal temporär okkludiert, und nach Inzision mit folgenden PE-Schläuchen katheterisiert:

Arterie: 0,38 mm I.D. x 1,09 mm O.D. x 5 cm intravasaler Länge
verbunden über Einmal-Kanülen 30 G (gelb), 0,3 x 13 mm

Vene: 0,58 mm I.D. x 0,96 mm O.D. x 3 cm intravasaler Länge
verbunden über Einmal-Kanülen 23 G (blau), 0,6 x 25 mm
(Innendurchmesser = I.D.; Außendurchmesser = O.D.)

Alle Gefäßkatheter wurden, falls nicht kontinuierlich perfundiert, mit 100 i.E./ml Heparin versetzter 0,9% NaCl-Lösung geblockt.

2.2.4 Tracheotomie

Unter laufender intravenöser Anästhesie erfolgte in der Regio cervicalis anterior unterhalb des Larynx eine mediane Inzision bis zum Platysma. Die Wunde wurde in stumpfer Technik bis zur Trachea erweitert. Nachdem die Trachea freigelegt war, wurde sie mit Ligaturfaden (USP: 6; metrisch: 8) unterminiert und zwischen 2. und 3. proximalen Cartilago tracheales mit einem Skalpell quer inzidiert. Eine modifizierte Venenverweilkanüle Gauge 14 (2,2 mm x 20 mm) wurde endotracheal eingebracht und mit dem vorgelegten Faden luftdicht in der Trachea fixiert. Über einen tottraumminimierten Tubuskonnektor wurde mit einem Babylog 8000 nun druckkontrolliert beatmet (siehe 2.3.1 Beatmung). Nach Lagekontrolle durch Inspektion und seitenvergleichende Auskultation erfolgte eine sorgfältige Fixierung der Kanüle.

2.3 Versuchsablauf

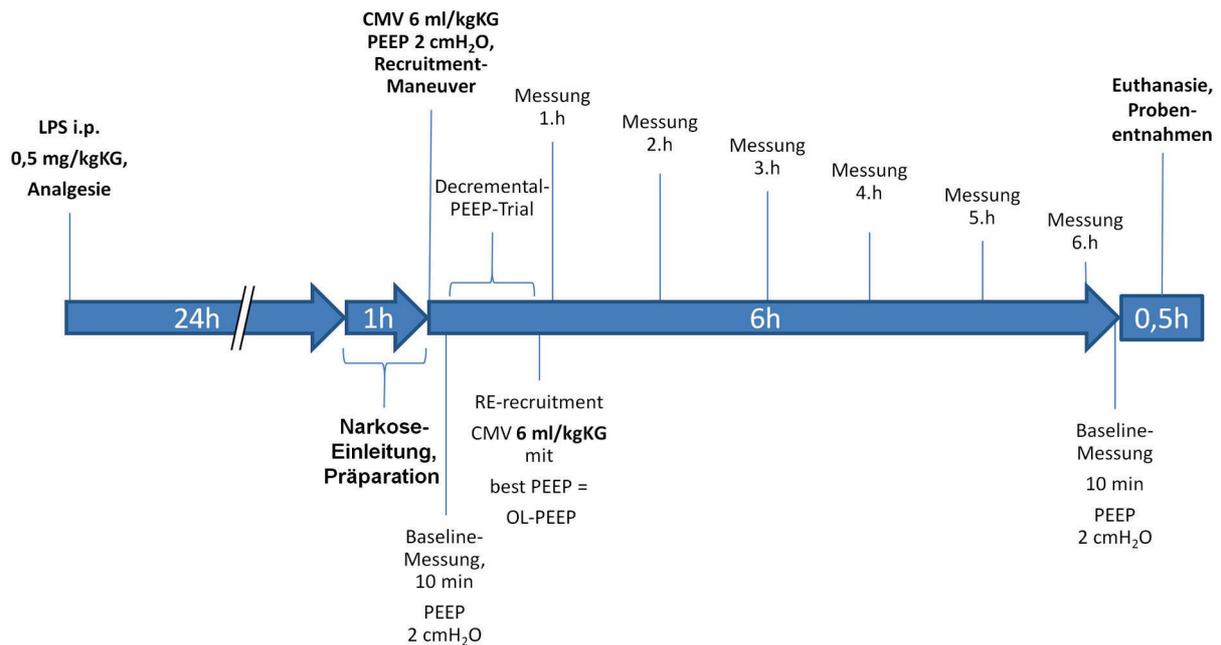


Abbildung 9: Zeitleiste des experimentellen Ablaufes

2.3.1 Total intravenöse Anästhesie (TIVA)

Die Narkose wurde nach Sicherung des Atemwegs mittels total intravenöser Anästhesie (TIVA) weiter vertieft, bis eine Spontanatmung vollständig sistierte. Adaptiert nach den unter 2.2.2 (perioperative Überwachung) beschriebenen Reflexen und Parametern wurde mit kontinuierlich intravenös infundierten Ketamin-Dosen um 50 mg/kgKG/h ein tiefes Narkosestadium über die gesamte Versuchsdauer gewährleistet. Die hämodynamischen Parameter flossen ebenfalls in die Beurteilung und Regulation der Narkosetiefe mit ein.

2.3.2 Beatmung

Die Tiere wurden während des Versuchs durch einen neonatalen Respiратор (Babylog 8000, Dräger, Lübeck) im druckkontrollierten Modus beatmet.

Zu Beginn der maschinellen Überdruckbeatmung wurde während einer 10-minütigen Stabilisierungsphase mit folgenden Einstellungen ventiliert:

Grundeinstellungen am Babylog 8000

Modus:	IPPV (Druckkontrollierte Beatmung)
P _{insp} :	kontinuierlich auf ein V _{tidal} = 6 ml/kgKG adjustiert
PEEP:	2 cmH ₂ O
AF:	100/min
I:E	1:1
F _i O ₂ :	0,40

Der Beatmungsdruck wurde während des Versuchsverlaufs kontinuierlich adjustiert, um ein konstantes Tidalvolumen von 6 ml/kgKG zu applizieren.

Bei Bedarf hätte die Atemfrequenz im Bereich zwischen 90 - 120 / min adaptiert werden können, um physiologische arterielle pH-Werte zwischen 7,30 - 7,45 zu erreichen, dies erwies sich allerdings nicht als notwendig.

2.3.3 Open lung PEEP

Nach 10-minütiger Beatmung wurde ein Recruitment-Manöver²¹⁷ durch Steigerung des P_{insp} auf 25 cmH₂O über 40 Sekunden vorgenommen²⁴⁴.

Direkt darauf erfolgte ein decremental-PEEP-Trial. Ausgehend von 8 cmH₂O PEEP erfolgte eine stufenweise Reduktion des PEEP um jeweils 2 cmH₂O, bis kein weiterer Anstieg der dynamischen Compliance (C_{dyn}) mehr festgestellt werden konnte^{29, 226, 227}.

Messungen der physiologischen Parameter wurden nach jeweils 10-minütiger Äquilibrationsphase mit Erreichen eines Steady-State durchgeführt.

Im Sinne eines „Open lung approach“ wurde erneut ein Recruitment-Manöver durchgeführt und der individuelle „best PEEP“ mit höchstem Compliance-Wert eingestellt und bis zum Ende des Versuchs beibehalten^{48, 225}.

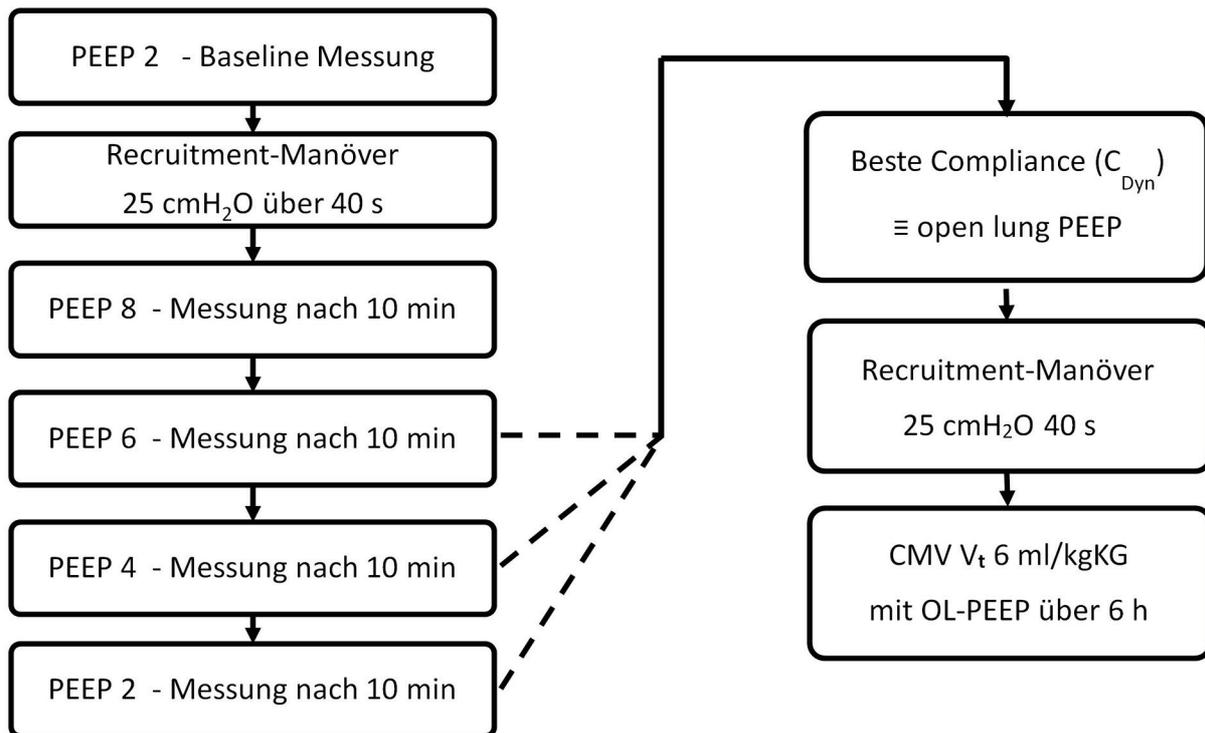


Abbildung 10: Ablauf des Decremental PEEP-Trial

2.3.4 Messung des transpulmonalen Drucks

Im Ösophagus wurde ein mit Wasser vorgefüllter Katheter (Ch 8) vorsichtig retrokardial positioniert und luftleer mit einem Druckmesssystem verbunden.

Die Messungen erfolgten analog der Methode von Talmor et al.^{219, 220, 223}. Der inspiratorische, transpulmonale Druck errechnet sich aus dem Atemwegsdruck minus intraösophagealem Druck. ($P_{tp} = P_{AW} - P_{es}$).

2.3.5 Physiologische Messparameter

Gemessene Beatmungsparameter:	Einheit:
Atemfrequenz (AF)	[1/min]
Fraktion der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (F_iO₂)	[]
Tidalvolumen (V_t)	[ml]
Atemwegsdruck (P_{AW})	[cmH ₂ O]
positiv-endexpiratorischer Druck (PEEP)	[cmH ₂ O]
Intraösophagealer Druck (P_{es})	[cmH ₂ O]
Differenz in-/expiratorischer Ösophagus Druck (Δ P_{es})	[cmH ₂ O]

Tabelle 3: Gemessene Beatmungsparameter

Die Beatmungsparameter wurden mit dem am Babylog 8000 vorhandenen Druck- und Flowsensoren (patientennahes Anemometer) gemessen und am PC registriert.

Errechnete Beatmungsparameter:	Einheit:
Inspiratorischer, transpulmonaler Druck (P_{tp}) $P_{tp} = P_{AW} - P_{es}$	[cmH ₂ O]
Dynamische Compliance des respiratorischen Systems (C_{dyn}) $C_{dyn} = \frac{\Delta V}{\Delta p} = \frac{V_t}{P_{AW} - PEEP}$	$\left[\frac{\text{ml}}{\text{cmH}_2\text{O}} \right]$
Compliance des Thorax (Chest-wall) (C_{cw}) $C_{cw} = \frac{\Delta V}{\Delta p} = \frac{V_t}{P_{Pleura}}$	$\left[\frac{\text{ml}}{\text{cmH}_2\text{O}} \right]$
Compliance der Lunge (C_L) $C_L = \frac{\Delta V}{\Delta p} = \frac{V_t}{P_{AW} - P_{Pleura}}$	$\left[\frac{\text{ml}}{\text{cmH}_2\text{O}} \right]$
Elastance des Respiratorischen Systems (E_{RS}) $E_{RS} = \frac{\Delta p}{\Delta V} = \frac{P_{AW} - PEEP}{V_t}$	$\left[\frac{\text{cmH}_2\text{O}}{\text{ml}} \right]$
Elastance der Thoraxwand (Chest-wall) (E_{cw}) $E_{cw} = \frac{\Delta p}{\Delta V} = \frac{P_{Pleura}}{V_t}$	$\left[\frac{\text{cmH}_2\text{O}}{\text{ml}} \right]$
Elastance der Lunge (E_L) $E_L = \frac{\Delta p}{\Delta V} = \frac{P_{AW} - P_{Pleura}}{V_t}$	$\left[\frac{\text{cmH}_2\text{O}}{\text{ml}} \right]$
Horovitz-Oxygenierungsindex (HQ) $HQ = \frac{p_a O_2}{F_i O_2}$	[mmHg]

Tabelle 4: Errechnete Beatmungsparameter

Für die fortlaufende Erfassung in Echtzeit und Speicherung der Messwerte aus Druckwandler-Dom und EKG wurde das Messsystem MABEL (Sonderanfertigung der

Fachhochschule Mannheim, Medizintechnik) mit der Software IS Med (Fachhochschule Mannheim) verwendet. Die invasive Messung von Blutdruck und Herzfrequenz erfolgte über einen an den arteriellen Zugang angeschlossenen Druckwandler-Dom.

Gemessene hämodynamische Parameter:	Einheit:
Herzfrequenz (HF)	[1/min],
Blutdruck (RR)	[mmHg]
Volumenbilanz (Vol./h)	[ml/h]
Katecholamine (Norepinephrin)	[µg/gKG/min]
Errechnete hämodynamische Parameter:	Einheit:
Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) $MAP = RR_{diastolisch} + \frac{(RR_{systolisch} - RR_{diastolisch})}{3}$	[mmHg]

Tabelle 5: Hämodynamische Parameter

Arterielle Blutgasanalysen erfolgten durch Entnahmen von jeweils 0,2 ml des unverdünnten Blutes aus dem arteriellen Katheter in eine heparinisierte 1 ml-Spritze und wurden direkt in einem Cobas b 121 Blutgasanalysegerät (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) gemäß den Angaben des Herstellers analysiert.

Gemessene arterielle Blutgasparameter:	Einheit:
pH-Wert (pH)	$[-\log(H^+)]$
Arterieller Sauerstoff-Partialdruck (p_aO₂)	[mmHg]
Arterieller Kohlenstoffdioxid-Partialdruck (p_aCO₂)	[mmHg]
Hämoglobinkonzentration (Hb)	[g/dl]
Arterielle Sauerstoffsättigung des Hämoglobin (S_aO₂)	[%]
Errechnete arterielle Blutgasparameter	Einheit:
Standard Base Excess $sBE = 0,02786 \times p_aCO_2 \times 10^{(pH-6,1)} + 13,77 \times pH - 124,58$	[mmol/l]
Hydrogencarbonat $HCO_3^- = 0,0304 \times pCO_2 \times 10^{(pH - 6,1)}$	[mmol/l]

Tabelle 6: Arterielle Blutgasparameter

2.3.6 Intravenöse Endotoxinämie

Während der 6-stündigen Beatmungsdauer unter Narkose wurde durch kontinuierliche intravenöse Infusion von Lipopolysacchariden eine systemische Endotoxinämie induziert.

LPS 0.075 Endotoxinämie: 0,075 mg LPS / kgKG / h i.v.

LPS 0.75 Endotoxinämie: 0,750 mg LPS / kgKG / h i.v.

LPS 1.5 Endotoxinämie: 1,500 mg LPS / kgKG / h i.v.

2.3.7 Kreislauf- und Volumenmanagement

Zur basalen Flüssigkeitssubstitution wurden, angepasst an die hämodynamische Situation, kontinuierlich zwischen 10-14 ml/kgKG/h Vollelektrolytlösung infundiert. Bei persistierender Hypotonie (MAP < 60 mmHg) wurde ein einmaliger Flüssigkeitsbolus von zwei Millilitern Vollelektrolytlösung i.v. gegeben und die Infusionsrate bis auf max. 40 ml/kgKG/h gesteigert.

Falls dies zur Stabilisierung des Blutdrucks nicht ausreichend war, wurde mit einer kontinuierlichen Noradrenalin-Applikation (0,03 - 1,6 µg/kg/min) i.v. begonnen.

Die Ketamin-Dosis wurde im narkotischen Dosisbereich entsprechend adjustiert, um einer Kreislaufdepression entgegenzuwirken und eine Spontanatmung zu verhindern.

2.4 Versuchsende

Nach 6 Stunden Beatmungsdauer wurden abschließende physiologische Messungen durchgeführt und den Tieren 6 ml Vollblutproben entnommen. Der PEEP wurde dabei auf 2 mmH₂O reduziert, um eine Vergleichbarkeit mit der Baseline-Messung zu gewährleisten.

Durch Vertiefung der intravenösen Narkose wurden die Tiere euthanasiert und unmittelbar nach Kreislaufstillstand gewogen.

Die sofortige Organentnahme erfolgte über eine mediane Laparotomie und Thorakotomie. Nach Eröffnung des Abdomens wurden die Tiere durch Inzision der inferioren V. cava exsanguiniert. Nachdem das Diaphragma entlang des Pars costalis von abdominal nach thorakal eröffnet war, wurden als nächstes Trachea, Lungen und Herz als Paket entnommen und zugeschnitten. Die rechten Lungenlappen wurden umgehend in flüssigem Stickstoff

schockgefroren und in Kryo-Tubes bei -80°C für weitere Untersuchungen gelagert. Der komplette linke Lungenflügel wurde für die histologische Aufarbeitung in 4% Formalin fixiert.

2.4.1 Plasma-Proben

Bei Versuchsbeginn (Baseline) wurde 1 ml und bei Versuchsende 6 ml Vollblut in mit Lithiumheparin beschichtete Probenröhrchen entnommen. Unmittelbar nach der Entnahme erfolgte eine Zentrifugation mit 10.000 U/min über 15 min, anschließend wurde das Plasma abpipettiert und bei -20°C gelagert.

2.4.2 Histologische Untersuchungen: Schnittebenen

Vor dem Zuschnitt wurde auf den in vivo anterior liegenden Lungenanteilen die viszerale Pleura mit Tusche markiert, um eine korrekte Lagezuordnung bei Paraffineinbettung und späterer Auswertung unter dem Mikroskop zu gewährleisten.

Um eine der interindividuellen Lungengröße anatomisch angepasste, jeweils gleichartige Schnittebene zu erhalten, wurde in der Transversalebene wie folgt geschnitten:

Schnitt B erfolgte im Bereich des Hilus auf Höhe der linken Arteria pulmonalis

Schnitt A halbierte das mit Schnitt B entstandene apikale Lungenstück

Schnitt D / E erfolgte 5-6 mm oberhalb des basalen Lungenendes

Schnitt C halbierte das zwischen Schnitt B und D entstandene Lungenstück

Auf den so erhaltenen Schnitten A bis E wurden in den folgenden histologischen Untersuchungen jeweils 1 mediales (m) und je 2 anteriore (a) und posteriore (p) Areale ausgewertet.

Für die Messungen wurde jeweils ein repräsentatives Gesichtsfeld ausgewählt in dem möglichst viel alveoläres Parenchym abgebildet war.

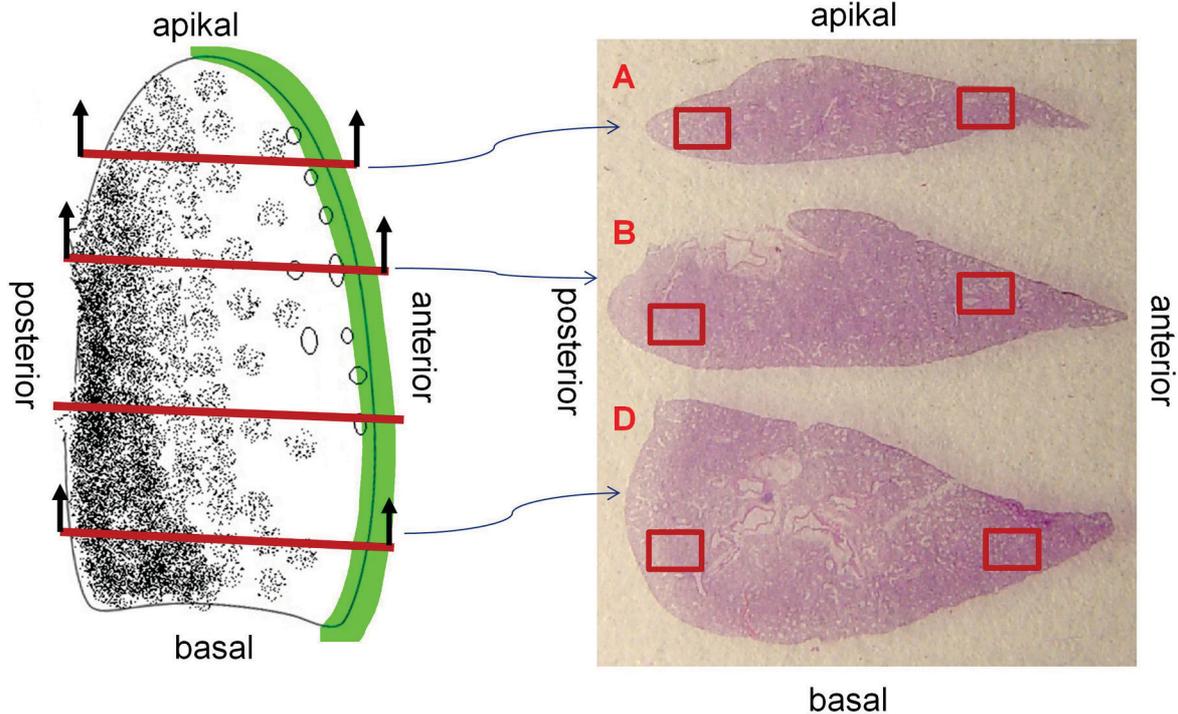


Abbildung 11: Schnittebenen A-D des linken Lungenflügels und Übersicht des histologischen Präparats (HE-Färbung)
Tuschemarkierung ist grün dargestellt.

Diese Vorgehensweise wurde neu entwickelt, um pathophysiologische Veränderungen des Lungenparenchyms auch bei inhomogener Verteilung systematisch zu erfassen.

2.4.3 Paraffineinbettung und Mikrotomschnitt

Das formalinfixierte Gewebe wurde in einzelnen Kapseln in einem Einbettungsautomat (Leica TP1020) zuerst in Alkohol aufsteigender Konzentration dehydriert, aus absolutem Ethanol in Xylol überführt und anschließend mit heißem Paraffinwachs imprägniert. Die in Paraffin eingebetteten Organproben wurden gemäß der beschriebenen Schnittebenen ausgeblockt und anschließend mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM 2165) in 3µm dicke Scheiben geschnitten, welche im gewärmten Wasserbad gestreckt und auf beschichtete Objektträger (Super Frost Objektträger) aufgezogen wurden.

2.4.4 Hämatoxylin-Eosin Färbung (HE-Färbung)

Die getrockneten Schnitte wurden 3-fach in Xylol und anschließend in absteigender Alkoholreihe entparaffinisiert und mit Hämatoxylin-Eosin nach Laborstandard gefärbt. Zur Konservierung wurden die Schnitte mit Entellan® und einem Deckglas bedeckt.

2.4.5 Histologische Beurteilung des Lungenparenchyms

Das Ausmaß der pathologischen Veränderungen wurde in den HE-gefärbten Lungenschnitten anhand einer fünfstufigen Punkteskala nach den in der folgenden Tabelle dargestellten Kriterien bewertet^{60, 245, 246}.

Histologische Beurteilung des Lungenparenchyms	
Atelektasen:	
0	normal, weniger als 10% der Alveolen kollabiert
1:	mehr als 10% der Alveolen kollabiert
2:	mehr als 25% der Alveolen kollabiert
3:	mehr als 50% der Alveolen kollabiert, Alveolarsepten erkennbar
4:	mehr als 75% der Alveolen kollabiert, Alveolarsepten verstrichen
Emphysem: (Overinflation)	
0:	keine oder 100% Atelektasen
1:	mehrere Alveolen 2x so groß wie der Durchschnitt in der Umgebung
2:	mehrere Alveolen 4x so groß wie der Durchschnitt in der Umgebung
3:	mehrere Alveolen 8x so groß wie der Durchschnitt in der Umgebung
4:	große Bullae
Inflammation:	
Innerhalb des untersuchten Gesichtsfeldes (100x SF18) wurden in 3 Arealen in stärkerer Vergrößerung (400x SF18) die vorhandenen Leukozyten gezählt.	
0:	≤10 Leu. / GF 400x
1:	10-20 Leu. / GF 400x
2:	20-30 Leu. / GF 400x
3:	30-40 Leu. / GF 400x
4:	>40 Leu. / GF 400x
Ödeme:	
Die Beurteilung erfolgte anhand der intraalveolären hyalinen Membranen und oder anhand der Breite der Ödeme in der perivaskulären Adventitia / Interstitium.	
0:	keine
1:	leicht
2:	mittel
3:	stark
4:	extrem
Hämorrhagie:	
0:	keine, oder <10 extravasale Erythrozyten
1:	einzelne Erythrozyten (>10) extravasal / intraalveolär
2:	an mehreren Stellen extravasale / intraalveoläre Erythrozyten
3:	Gefäßdefekt mit starker Extravasation von Erythrozyten
4:	in mehr als 50% des Gesichtsfelds extravasale Erythrozyten (100x SF18)

Tabelle 7: Scoring System zur Auswertung der histopathologischen Veränderungen

2.4.6 Immunohistochemie

Zur spezifischen Darstellung der untersuchten Proteine wurden die histologischen Schnitte mittels indirekter Immunohistochemie (IHC) nach der Avidin-Biotin-Methode²⁴⁷ angefärbt und ausgewertet.

Die aufgezogenen Schnitte wurden dazu zuerst über Xylol und in absteigendem Ethanol entparaffiniert. Anschließend mussten die im formalinfixierten Gewebe vernetzten antigenen Proteinstrukturen zunächst wieder demaskiert werden. Dieses sogenannte Antigen-Retrieval erfolgte in 0,1 M Natrium-Citrat-Puffer-Lösung, worin die Schnitte in einem Mikrowellenofen über 20 min gekocht wurden. Nach dem Abkühlen und zwischen allen folgenden Blockadeschritten wurde mehrfach in 10 mM Tris-Puffer-Lösung (TBS) bei pH 8,0 gewaschen. Die endogene Peroxidase-Aktivität konnte durch 30-minütige Inkubation in Methanol-Lösung, die zu 2% Wasserstoffperoxid enthielt, blockiert werden. Durch 15-min Inkubation in einer feuchten Kammer mit Avidin, Waschen und Inkubation mit Biotin, wurde endogenes Biotin blockiert. Anschließend wurde mit Pferde-Serum inkubiert, um zufällige Antigenübereinstimmungen im Schnitt mit den Sekundärantikörpern zu blockieren. Zur Kontrolle der suffizienten Blockade aller endogenen Reagibilitäten wurde bei jeder Färbeserie eine Negativkontrolle mitgefärbt, bei der alle Schritte bis auf den primären Antikörper ausgeführt wurden.

Nach durchgeführter Blockade und Waschen in TBS wurden die Schnitte mit dem 1:100 verdünnten Primärantikörper (polyklonaler Maus-Ig) gegen α -Aktin (sc-130617; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) über 12 h in einer feuchten Kammer bei +4°C inkubiert.

Nach doppeltem Abwaschen wurde biotinierter horse-anti-mouse Sekundärantikörper (BA-2000; Vector Laboratories, USA) 1:200 verdünnt aufgetropft und die Schnitte 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach doppeltem Waschen in TBS konnten die Schnitte entwickelt werden.

Mit frisch angesetzter ABC-Lösung, die aus Avidin-Peroxidase-Komplexen mit sehr hoher Affinität zum Biotin auf den Sekundärantikörpern besteht, wurde 30 min inkubiert und abgewaschen. Zum Schluss wurde mit Wasserstoffperoxid (H_2O_2) versetztes 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) in gepufferter Lösung zugegeben. Durch Oxidation an den Peroxidasekomplexen entsteht in der Anwesenheit von H_2O_2 aus DAB ein brauner Niederschlag als Nachweisreaktion für die an Zielantigene gebundenen Primärantikörper.

Zur besseren histologischen Übersicht wurden die Schnitte anschließend noch, wie unter 2.4.4 beschrieben, mit Hämatoxylin gefärbt und mit Entellan eingedeckelt.

2.4.7 Bilddatenanalyse

Für die Bilddatenanalyse wurden alle IHC gefärbten Schnitte auf einem BX51-Mikroskop über ein Ultraplan-Apochromat Objektiv in 200-facher Vergrößerung im Hellfeld mit einer Color-View2 Digitalkamera unter gleichen Einstellungen fotografiert und mit der Software Cell^F imaging (alles von Olympus, Tokyo, Japan) ausgewertet.

Pro Tier wurden 10 nicht überlappende Bilder innerhalb der apikalen Schnittebene A und der basalen Ebene D (siehe 2.4.2) jeweils zwei anteriore, ein mediales und zwei posteriore Bilder zufällig ausgewählt und gespeichert.

Zur Quantifizierung der α -Aktin (α -SM1) positiven Strukturen haben wir die durch DAB orange-braun gefärbte Fläche gemessen, indem zunächst die roten Bildanteile mit einem Grün-Filter kontrastiert und anschließend mit einer Farbspektrum-Analyse jener Spektralbereich gemessen wurde, der nahezu exakt den IHC positiv markierten Bereich erfasste.

In einem zweiten Schritt erfolgte die Messung der auf den Schnitten leeren Flächen, wofür zunächst feine zelluläre Strukturen durch einen kontrastierenden Despeckle-Filter (DEC-Filter)²⁴⁸ verstärkt wurden und anschließend mit einer Farbspektrum Analyse näherungsweise der Luft-Flächenwert (% Air Space) bestimmt werden konnte.

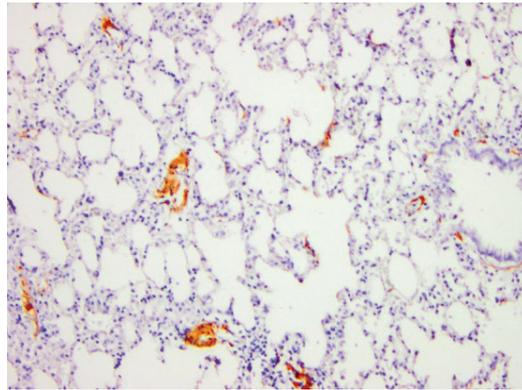


Abbildung 12: Originalbild, alveolares Parenchym α -SM1 IHC, 200-fach

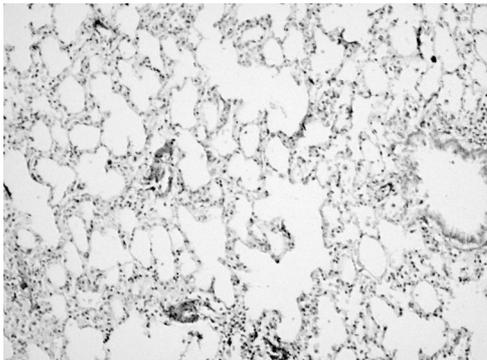


Abbildung 13: Grünfilter

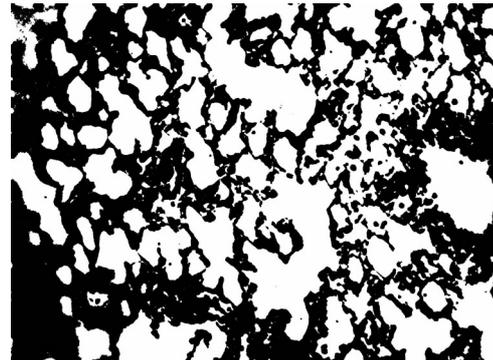


Abbildung 14: DEC Filter

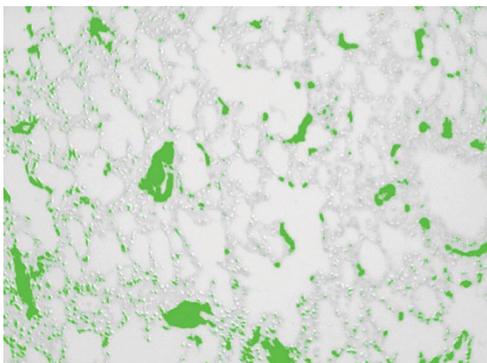


Abbildung 15: Messung der α -SM1 + Fläche (grün)

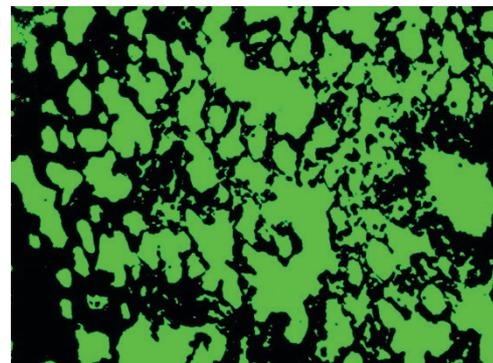


Abbildung 16: Messung des Air Space (grün)

Die gemessenen α -SM1-Werte wurden um den, je nach Bild und Schnittebene, sehr variablen, alveolären Luftanteil rechnerisch korrigiert, sodass sich die Angabe des α -SM1 Anteils auf 100% Parenchym bezog:

$$\alpha\text{-SM1 Fläche korrigiert [\%]} = \left(\frac{\alpha\text{-SM1 Fläche gemessen [\%]}}{(100 - \text{alveoläre Luft [\%]})} \right) \times 100$$

Abbildung 17: Formel zur Berechnung des korrigierten α -SM1 Anteils

2.5 Messung der Zytokinkonzentrationen aus Plasmaproben

Aus den bei Versuchsende entnommenen Plasmaproben wurden die Konzentrationen der folgenden rattenspezifischen proinflammatorischen Zytokine ab der angegebenen Nachweisgrenze (MDD) bestimmt:

TNF α	Rat Tumor-Nekrose-Faktor- α	MDD: 5 pg/ml
IL1 β	Rat Interleukin 1 β	MDD: 5 pg/ml
IL6	Rat Interleukin 6	MDD: 21 pg/ml
CINC-1	Rat cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1	MDD: 1,1 pg/ml

Die Messungen wurden durch einen quantitativen Sandwich-Enzymimmunoassay (Quantikine[®] ELISA Testsystem) der Firma R&D Systems gemäß deren Angaben durchgeführt und mit dem Microplate Reader Infinite M 200 PRO der Firma Tecan spektralphotometrisch gemessen und berechnet.

Die Proben wurden auf Mikrotiterplatten mit vorgelegten coat-Antikörpern gegeben und zwischen den Inkubationsschritten mehrfach gewaschen und ausgeklopft. Nach Inkubation mit Primär- und Sekundärantikörper wurde die chromogene Nachweisreaktion durch mit Wasserstoffperoxid (H₂O₂) versetztem Tetramethylbenzidin (TMB) an den peroxidasebesetzten Sekundärantikörpern erzeugt, mittels verdünnter Salzsäure gestoppt und die Extinktion des TMB gemessen.

Für jede Mikroplatte wurden Standardextinktionskurven aus den mitgelieferten, rekombinanten Zytokinen bekannter Konzentrationen neu erstellt und von jeder Plasmaprobe 3 Ansätze gemessen, woraus die jeweilige Zytokinkonzentration als Mittelwert berechnet werden konnte.

2.6 RNA-Expressionsanalyse

2.6.1 Isolation der Ribonukleinsäuren

Die RNA-Isolation aus den schockgefrorenen und bei -80°C gelagerten Organproben erfolgte mit der Single-Step Methode nach Chomczynski und Sacchi²⁴⁹.

Das tiefgekühlte Gewebe wurde in ca. 100 mg wiegende Probewürfel aus alveolarem Parenchym geschnitten, in TRIzol® Reagenz (Invitrogen) gegeben und homogenisiert, um die zytosolischen Bestandteile aufzuschließen und mittels des enthaltenen Phenols und der Thiocyanate die endogenen Ribonukleasen zu inhibieren. Nach einer Reaktionszeit von 15 min erfolgte eine Phasentrennung durch Zugabe von Chloroform, Mischen und Zentrifugation. Die RNA-enhaltende wässrige Phase wurde mit Isopropanol zu einem Nukleinsäure-Pellet präzipitiert und in wiederholten Aufreinigungsschritten mit 75% Ethanol gewaschen. Nach 5- bis 10-minütiger Lufttrocknung wurde die isolierte RNA in 30µl RNase-freiem Wasser gelöst und für weitere Analysen bei -80°C zwischengelagert.

2.6.2 Entfernung endogener DNA und DNase

Um eventuell enthaltene zelluläre DNA (aus der Interphase der Phasentrennung) zu spalten und endogene DNasen aus den RNA Proben zu inaktivieren, wurde ein DNA-free Kit der Firma Applied Biosystems verwendet.

Zunächst wurden die RNA-Proben mit rekombinant hergestellten DNase-I 1:50 versetzt, gemischt und nach 20-minütiger Inkubationszeit ein DNase deaktivierendes Reagenz aus dem Kit 1:25 zugegeben, gemischt und 2 Minuten gewartet. Anschließend wurde 1,5 min bei 10.000 U/min zentrifugiert und der DNA- und DNase-freie Überstand in neue, hochreine Eppendorf-Tubes pipettiert.

2.6.3 Messung und Angleichen der RNA Konzentration

Die spektralphotometrische Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben erfolgte auf einer NanoQuant Plante™ in einem Microplate Reader Typ Infinite M 200 PRO (Tecan) indem bei Absorptionsmaximum $\lambda=260$ nm Nukleinsäuren und bei $\lambda=280$ nm Proteine gemessen wurden. Aus der gemessenen optischen Dichte (OD) wurde die RNA-Konzentration [ng/µl] = $OD_{260} \times 40$ ng/µl berechnet. Die Quotienten aus OD_{260} und OD_{280} der verwendeten Proben waren alle $> 2,0$, sodass keine relevanten Verunreinigungen mit Proteinen oder genomischer DNA vorlagen.

2.6.4 cDNA-Synthese durch Reverse Transkriptase

Zur cDNA-Synthese aus den isolierten RNA-Proben wurde ein kommerzielles High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit mit RNase Inhibitor von Applied Biosystems verwendet.

Gemäß dem Protokoll des Herstellers wurden auf Eis in hochreine Reagenzgefäße je 1 µg RNA in 10 µl nukleasefreiem Wasser gelöst und dann mit je 10 µl des Mastermix (Buffer, dNTP Mix, RT Random Primers, Reverse Transcriptase, RNase Inhibitor, Nuclease-free H₂O) zugegeben und gemixt. Anschließend wurde in einem peqSTAR 2X Thermocycler (Firma PEQLAB) mit folgendem Programm prozessiert:

25°C: 10 min, 37°C: 120 min, 85°C: 5 min.

2.6.5 Real-Time-quantitative-Polymerase-Chain-Reaction (q-PCR)

Die quantitative Analyse der RNA-Expression erfolgte durch Echtzeitmessung der amplifizierten DNA aus einer Polymerase-Kettenreaktion mit ausgewählten Primern nach der Methode von Schmittgen TD et al.²⁵⁰.

Folgende für *Rattus norvegicus* spezifische Primer des TaqMan® Gene Expression Assay (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurden verwendet:

β-Actin	(Rat Actb)	Rn00667869_m1
CINC-1	(Rat Cxcl1)	Rn00578225_m1
Col1a1	(Rat COL I)	Rn01463848_m1
Col3a1	(Rat COL III)	Rn01437681_m1
IL1β	(Rat Il1b)	Rn00676330_m1
IL6	(Rat Il6)	Rn99999011_m1
TNFα	(Rat Tnf)	Rn99999017_m1

Auf 96-well Platten wurden 25 ng cDNA-Probe in 9 µl mit 1 µl TaqMan® Assay Primer (Sense und Antisense) und 10 µl Fast Advanced Master Mix angesetzt. Jeder Parameter wurde 3-fach angesetzt und gemessen. Zudem wurde für jeden Primer und Mastermix eine Negativkontrolle angesetzt. Eine Amplifikation des β-Actin-Gens wurde als Positivkontrolle der PCR gewertet.

Die Proben wurden in einem 7900HT Fast Real-Time PCR System (Life Technologies GmbH) vollautomatisiert gemäß den Angaben des Herstellers prozessiert und die entstehende DNA durch die Fluoreszenz der TaqMan-Sonden gemessen. Im exponentiellen Teil der Amplifikationskurven wurde der Schwellenwert zur Messung in Bezug zur Baseline gesetzt und die Steigung in Relation zur Anzahl der durchgeführten Amplifikationszyklen.

Zur Bestimmung der basalen Expressionsrate (endogene Kontrolle) wurde als Housekeeping Gen in allen Gruppen β -Actin gemessen und die Expression der eingesetzten Primer (Zielparameter) in Relation zur Expression in der nativen Kontrollgruppe berechnet. Die relative Expression (Fold Change) der untersuchten Gene wurde nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode (Livak, K. J. et al.) berechnet²⁵¹.

C_t = Anzahl der PCR Zyklen

$\Delta C_t = C_{t \text{ getestes Gen}} - C_{t \text{ endogene Kontrolle}}$

$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t \text{ Probe 1}} - \Delta C_{t \text{ Kalibrator}}$

Fold Change = $2^{(-\Delta\Delta C_t)}$ (= Relative quantification = RQ)

2.7 Statistische Analysen

Zur Planung der Experimente wurde anhand von vorhergehenden Studiendaten^{29, 162} die Testhypothese aufgestellt, dass im pulmonalen Parenchym die Expression von Prokollagen 3 mit steigender LPS-induzierter systemischer Inflammation absinken wird (H_1) oder kein Unterschied zur unbehandelten Gruppe besteht (H_0) und daraus der Stichprobenumfang berechnet. Bei einer Gruppengröße von 8 Tieren ergab sich eine Teststärke (Power) von $1-\beta = 0,8$, um für die o.g. Hypothese ein Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ zu erreichen. Dabei wurde eine Effektgröße von $d = 2,2$ berücksichtigt und multiple Vergleiche ($n = 3$) ($\alpha^* = 0,0167$, α^* Bonferroni-Ungleichung) angestellt.

Die physiologischen, histologischen und biochemischen Daten aus den Versuchen wurden auf Normalität und Homogenität der Varianzen mittels Shapiro-Wilk-Test (Normalverteilung der Grundgesamtheit einer Stichprobe) und Levene-Test (Gleichheit der Varianzen) getestet. Beide Bedingungen wurden in den physiologischen Datensätzen erfüllt, sodass eine einfaktorielle ANOVA (Varianzanalyse) erfolgte, die ggf. mit Holm-Sidak's post-hoc Test ergänzt wurde.

Die physiologischen Daten werden als Mittelwert \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Die Daten der Lungenhistologie und die biochemischen Messwerte werden als Mediane mit 25-75% Quartilen angegeben und nach Kruskal-Wallis getestet, gefolgt von Tukey's post-hoc Test zur Angabe der Whisker.

Korrelationen wurden mit Spearman's Rangkorrelationskoeffizienten bestimmt.

Statistische Analysen wurden mit der Software SigmaPlot 11.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) berechnet und dargestellt.

Weitere statistische Auswertungen wurden mit der Software SAS 9.4 (SAS Institute Inc. Cary, NC, USA) durchgeführt und grafisch dargestellt.

Zur Darstellung der histologischen Untersuchungen wurde zur Testung der Signifikanz ein Bonferroni-korrigierter T-Test verwendet.

Bei allen Tests wurde das Signifikanzniveau ab $p \leq 0,05$ angenommen.

3 ERGEBNISSE

Alle 32 narkotisierten und beatmeten Tiere überlebten bis zum Ende des Experiments.

Aus den kontinuierlich aufgezeichneten Messdaten wurden die Zeitpunkte Baseline (BL) 10 min nach Beginn der mechanischen Ventilation und Ende (End) nach 6 Stunden Beatmung statistisch ausgewertet.

Alle 3 LPS-Gruppen starteten unter den gleichen Vorbehandlungen zum Zeitpunkt BL, daher sind die 24 Datensätze zusammengefasst dargestellt (LPS all BL).

3.1 Physiologische Daten

3.1.1 Beatmung

Am Ende des Versuchs lag der Horowitz-Index (p_{aO_2} / F_{iO_2}) der behandelten Gruppen LPS 0.75 ($329,19 \pm 88,1$ mmHg; $p < 0,05$) und LPS 1.5 ($318,38 \pm 45,1$ mmHg; $p < 0,05$) jeweils signifikant niedriger als in der unbehandelten Gruppe UI ($487,25 \pm 25,3$ mmHg) und der Gruppe LPS 0.075 ($437,19 \pm 67,8$ mmHg).

Die übrigen Beatmungsparameter unterschieden sich nicht signifikant voneinander und lagen in den im Protokoll festgelegten Bereichen. Dabei wurde das Tidalvolumen V_t kontinuierlich auf $V_t 6$ ml/kgKG adjustiert, die maximale Abweichung lag bei $\pm 0,04$ ml/kgKG. Nach dem initialen Recruitment und decremental PEEP-Trial verbesserte sich die dynamische Compliance des respiratorischen Systems zunächst in allen Gruppen. Im Verlauf der nächsten 4 Stunden fiel sie in allen Gruppen ab und erreichte dann ein konstantes Niveau. Dies ist in den Verlaufsgrafiken der pulmonalen Parameter ersichtlich (s. Abbildung 18).

	UI BL (n = 8)	UI End (n = 8)	LPS all BL (n = 24)	LPS 0.075 End (n = 8)	LPS 0.75 End (n = 8)	LPS 1.5 End (n=8)
AF [1/min]	100,00 ± 0,0	100,00 ± 0,0	100,00 ± 0,0	101,13 ± 3,0	100,25 ± 0,7	100,75 ± 2,1
P_{insp} [cmH ₂ O]	13,13 ± 2,8	13,63 ± 0,9	10,62 ± 1,3	14,38 ± 2,4	14,13 ± 1,2	13,75 ± 1,1
PEEP [cmH ₂ O]	1,99 ± 0,0	1,98 ± 0,0	1,97 ± 0,1	2,25 ± 0,7	1,99 ± 0,0	2,25 ± 0,7
OL- PEEP [cmH ₂ O]	-	3,74 ± 0,7	-	3,5 ± 0,9	2,75 ± 1,0	3,75 ± 0,7
E_{rs} [$\frac{\text{ml}}{\text{cmH}_2\text{O}}$]	3,28 ± 0,7	3,46 ± 0,3	2,87 ± 0,4	4,06 ± 0,8	3,99 ± 0,4	3,95 ± 0,4
E_{cw} [$\frac{\text{ml}}{\text{cmH}_2\text{O}}$]	1,08 ± 0,8	1,21 ± 0,6	1,05 ± 0,2	1,16 ± 0,3	1,18 ± 0,3	1,58 ± 0,3
E_L [$\frac{\text{ml}}{\text{cmH}_2\text{O}}$]	2,46 ± 0,6	2,62 ± 0,3	1,83 ± 0,4	3,00 ± 0,7	3,05 ± 0,3	2,84 ± 0,4
paO₂ FiO₂ [mmHg]	423,68 ± 39,6	487,25 ± 25,3	493,96 ± 30,1	437,19 ± 67,8	329,19 ± 88,1 ^{B,D}	318,38 ± 45,1 ^{C,E}

Tabelle 8 : Beatmungsparameter

Angegeben ist obenstehend der Mittelwert und darunter die Standardabweichung (±).

A: p < 0,05 UI End vs. LPS 0.075

B: p < 0,05 UI End vs. LPS 0.75

C: p < 0,05 UI End vs. LPS 1.5

D: p < 0,05 LPS 0.075 vs. LPS 0.75

E: p < 0,05 LPS 0.075 vs. LPS 1.5

3.1.2 Beatmungsparameter im Verlauf

Verlauf der pulmonalen Compliance

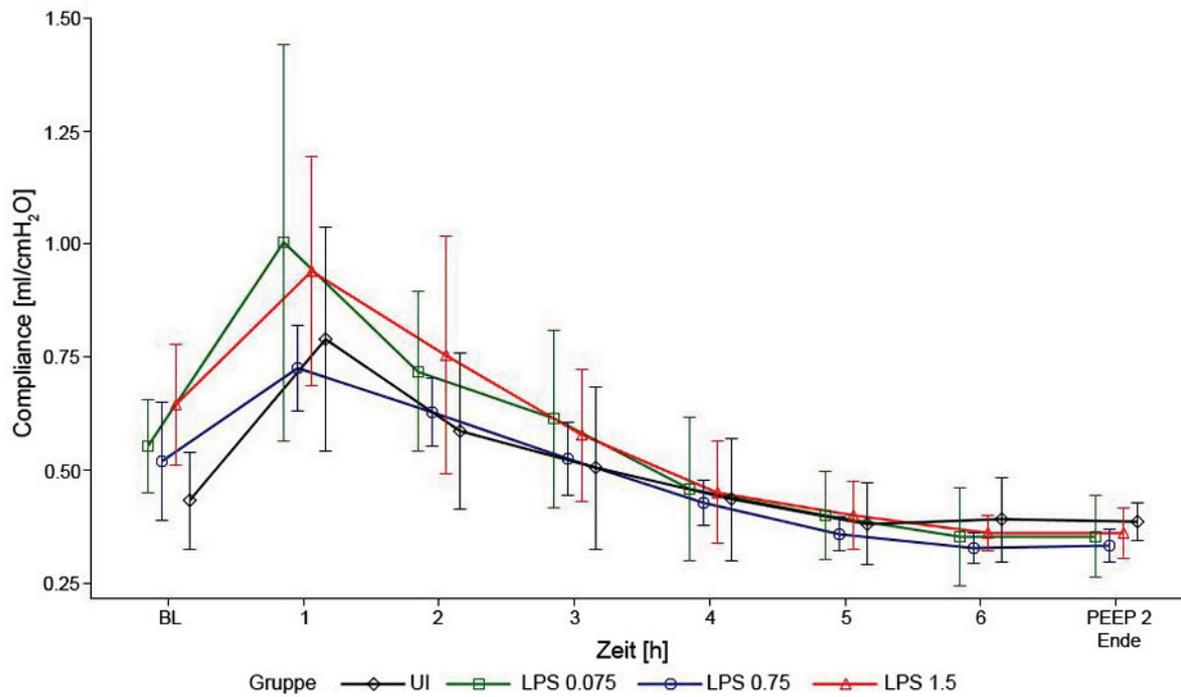


Abbildung 18: Verlauf der pulmonalen Compliance über die Zeit

Messwerte angegeben mit Symbolen für Mittelwerte und Standardabweichung als Whisker.

Verlauf des Horowitz-Quotienten

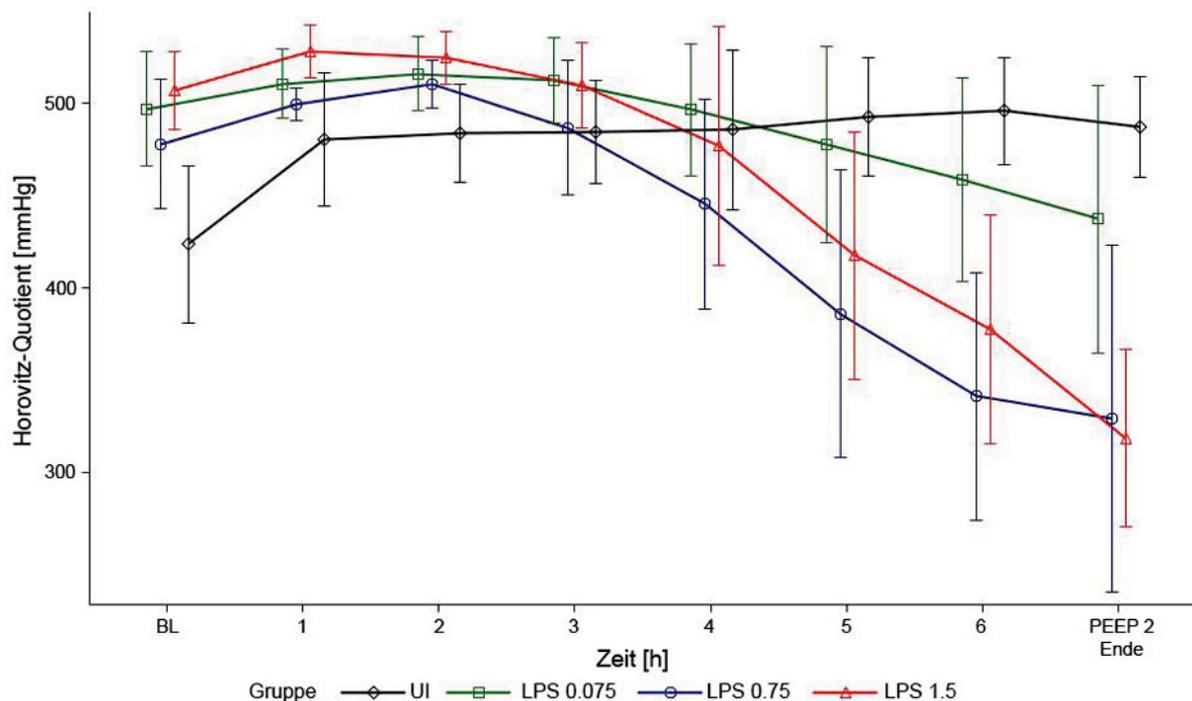


Abbildung 19: Verlauf des Horowitz-Quotienten über die Zeit

Messwerte angegeben mit Symbolen für Mittelwerte und Standardabweichung als Whisker.

3.1.3 Hämodynamik und Flüssigkeitsbilanz

Die Herzfrequenz der septischen Tiere LPS BL ($354,00 \pm 52,6$ 1/min) lag initial signifikant höher ($p = 1 \times 10^{-7}$) als diejenige der scheinbehandelten Tiere (UI) ($205,5 \pm 35,1$ 1/min). Am Ende des Experiments wurden, verglichen mit UI End ($194,25 \pm 15,6$ 1/min), in den Gruppen LPS 0.75 ($248,25 \pm 15,6$ 1/min; $p < 0,05$) und LPS 1.5 ($246,38 \pm 54,5$ 1/min; $p < 0,05$) ebenfalls signifikant schnellere Herzfrequenzen gemessen. Komplementäre Veränderungen wurden bei den Blutdruckmessungen festgestellt: Verglichen mit UI End ($74,69 \pm 5,8$ mmHg) hatten die Gruppen LPS 0.75 ($63,75 \pm 6,6$ mmHg; $p < 0,05$) und LPS 1.5 ($62,19 \pm 5,5$; $p < 0,05$) bei Versuchsende signifikant niedrigere MAP-Werte. Der Zielwert des MAP von ≥ 60 mmHg konnte durch Volumengaben und Katecholamine auch in den ausgeprägt septischen Phasen des Versuchs in allen Gruppen gehalten werden. Der zur Stabilisierung notwendige Bedarf an Volumen und Katecholamin nahm mit steigender LPS-Dosis zu und unterschied sich in den beiden LPS-höchstdosierten Gruppen nicht mehr signifikant.

Hämodynamik und Flüssigkeitsbilanz

	UI BL (n = 8)	UI End (n = 8)	LPS all BL (n = 24)	LPS 0.075 End (n = 8)	LPS 0.75 End (n = 8)	LPS 1.5 End (n=8)
HF [1/min]	205,5 ± 35,1	194,25 ± 15,6	354,00 ^G ± 52,6	210,75 ± 15,7	248,25 ^B ± 15,6	246,38 ^C ± 54,5
MAP [mmHg]	84,88 ± 13,5	74,69 ± 5,8	99,90 ± 13,6	66,25 ± 5,8	63,75 ^B ± 6,6	62,19 ^C ± 5,5
Gewichts- zunahme [g]	-	51,88 ± 16,7	-	94,69 ^A ± 11,0	133,5 ^{B,D} ± 16,4	131,88 ^{C,E} ± 18,4
Max. Nor- epinephrin [µg/gKG/min]	-	0,00 ± 0	-	21,56 ± 45,8	75,91 ^B ± 44,4	61,99 ^C ± 49,2
MW Ketamin [mg/kgKG/h]		83,78 ± 10,91		104,23 ± 12,18	101,43 ± 6,52	105,31 ± 5,39

Tabelle 9: Hämodynamische Parameter

Angegeben sind der Mittelwert (oben) ± Standardabweichung (darunter)

A: p < 0,05 UI End vs. LPS 0.075

B: p < 0,05 UI End vs. LPS 0.75

C: p < 0,05 UI End vs. LPS 1.5

D: p < 0,05 LPS 0.075 vs. LPS 0.75

E: p < 0,05 LPS 0.075 vs. LPS 1.5

F: p < 0,05 LPS 0.75 vs. LPS 1.5

G: p < 0,05 UI BL vs. LPS all BL

3.1.4 Blutgasanalysen

Bei den LPS-behandelten Tieren kam es im Verlauf der 6-stündigen Beatmungsdauer zu einem Abfall des arteriellen Sauerstoffpartialdrucks bei gleicher F_iO_2 und simultan zu einem Anstieg des CO_2 -Partialdrucks bei gleichen Atemminutenvolumina. Der pH-Wert der Tiere mit Sepsis (LPS all BL) lag bereits bei der ersten Messung im leicht azidotischen Bereich und blieb gegen Versuchsende signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe UI.

	UI BL (n = 8)	UI End (n = 8)	LPS all BL (n = 24)	LPS 0.075 End (n = 8)	LPS 0.75 End (n = 8)	LPS 1.5 End (n=8)
P_aO_2/F_iO_2 [mmHg]	423,68 ± 39,6	487,25 ± 25,3	493,96 ± 30,1	437,19 ± 67,8	329,19 ^{B,D} ± 88,1	318,38 ^{C,E} ± 45,1
P_aO_2 [mmHg]	169,471 ±15,84	193,571 ±11,68	±	174,875 ±27,14	131,675 ±35,25	127,35 ±18,03
P_aCO_2 [mmHg]	43,9 ±4,4	43,14 ±3,6	51,34 ^F ± 5,8	50,06 ±5,2	57,35 ^{B,D} ±5,8	55,33 ^C ±5,0
pH [-log(H ⁺)]	7,352 ±0,04	7,364 ±0,03	7,30 ± 0,0	7,339 ±0,06	7,268 ^B ±0,05	7,305 ^C ±0,05
S_aO_2 [%]	94,957 ±1,52	96,8 ±0,33	±	95,287 ±1,09	91,55 ±3,49	84,162 ±22,51
HCO_3^- [mmol/l]	22,638 ±1,66	23,214 ±1,73	±	24,212 ±1,86	22,687 ±1,78	24 ±2,30
BE [mmol/l]	-1,888 ±2,06	-1,285 ±2,16	±	0,0875 ±2,20	-1,637 ±2,23	-0,075 ±2,74
Hb [g/dl]	15,587 ±1,03	11,315 ±1,28	±	10,075 ±1,13	8,387 ±0,79	9,862 ±0,93

Tabelle 10: Blutgasanalysen

Angegeben ist der Mittelwert (oben) ± Standardabweichung (darunter)

A: p < 0,05 UI End vs. LPS 0.075

B: p < 0,05 UI End vs. LPS 0.75

C: p < 0,05 UI End vs. LPS 1.5

D: p < 0,05 LPS 0.075 vs. LPS 0.75

E: p < 0,05 LPS 0.075 vs. LPS 1.5

F: p < 0,05 UI BL vs. LPS all BL

3.1.5 Zytokinkonzentrationen im Plasma (ELISA)

Mit steigender LPS-Dosierung wurde bei Versuchsende ein signifikanter Anstieg der gemessenen proinflammatorischen Parameter im Vergleich zur UI-Gruppe festgestellt. Durch Verdoppelung der LPS-Dosis von 0,75 auf 1,5 mg/kg/h konnte nur für Interleukin 1 β ein weiterer, signifikanter Anstieg festgestellt werden.

Die TNF- α und Il-1 β Konzentrationen lagen in der UI BL-Gruppe unterhalb der minimalen Nachweisgrenze (MDD) von 5 pg/ml.

	UI End (n = 8)	LPS 0.075 End (n = 8)	LPS 0.75 End (n = 8)	LPS 1.5 End (n = 8)
TNF-α [pg/ml]	< 5 ^{MDD} (0,0/0,0)	11,4^A (8,9/14,6)	31,7^B (21,8/49,6)	29,4^C (23,5/42,1)
Interleukin 1β [pg/ml]	< 5 ^{MDD} (0,0/0,0)	31,2^A (27,7/40,9)	24,9^{B,D} (16,5/53,8)	89,6^{C,E,F} (46,0/107,9)
Interleukin 6 [pg/ml]	99,9 (78,6/136,6)	2937,0^A (1421,0/4111,0)	15096,0^{B,D} (6307,0/18831,3)	5202,0^{C,F} (4357,5/6389,5)
CINC-1 [pg/ml]	389,0 (356,9/522,4)	5229,5^A (4276,8/7941,8)	26490,5^{B,D} (15526,3/33194,5)	15790,0^C (12884,5/22755,5)

Tabelle 11: Zytokinkonzentrationen im Plasma

Messwerte angegeben als Median und darunter die 0,25-Quantile und 0,75-Quantile ($Q_{0.25}$ / $Q_{0.75}$)

A: p < 0,05 UI vs. LPS 0.075

B: p < 0,05 UI vs. LPS 0.75

C: p < 0,05 UI vs. LPS 1.5

D: p < 0,05 LPS 0.075 vs. LPS 0.75

E: p < 0,05 LPS 0.075 vs. LPS 1.5

F: p < 0,05 LPS 0.75 vs. LPS 1.5

MDD = < Minimum detectable dose

3.2 Untersuchungen des Lungenparenchyms

3.2.1 Histologische Auswertung HE-Färbung: Lungenschädigungsindex

Der erfasste histologische Gesamtschädigungsindex der Lunge stieg im Vergleich zur Gruppe UI in allen LPS-Gruppen (LPS 0.075; LPS 0.75; LPS 1.5) signifikant an.

In den LPS-Gruppen ergab sich eine signifikante Steigerung der pulmonalen Schädigung nur zwischen LPS 0.075 und LPS 0.75.

[Punktwerte 0-4]	UI	LPS 0.075	LPS 0.75	LPS 1.5
Hämorrhagie:	0,0 (0,0/0,3)	0,4^A (0,0/0,8)	0,9^B (0,3/1,6)	0,3^C (0,0/1,0)
Inflammation:	0,3 (0,0/0,8)	2,8^A (2,4/3,3)	3,8^{B, D} (3,3/4,0)	3,3^C (2,5/3,6)
Atelektasen:	1,5 (0,3/2,5)	2,4^A (1,8/3,3)	2,8^B (2,0/3,5)	2,4^C (2,0/3,3)
Emphysem:	0,6 (0,3/1,1)	1,0 (0,4/1,8)	1,0 (0,3/1,5)	1,0 (0,5/1,3)
Ödeme:	0,5 (0,3/0,8)	1,00^A (0,8/1,5)	1,50^B (1,00/1,81)	1,25^C (0,9/1,6)
Lungen- schädigungs- index	3,0 (1,5/4,6)	7,8^A (6,7/8,6)	9,8^{B, D} (8,7/11,3)	8,0^{C, F} (7,2/9,8)

Tabelle 12: Histologische Lungenschädigungsindices

Messwerte angegeben als Median und darunter die 0,25-Quantile und 0,75-Quantile ($Q_{0,25}$ / $Q_{0,75}$)

A: $p < 0,05$ UI vs. LPS 0.075

B: $p < 0,05$ UI vs. LPS 0.75

C: $p < 0,05$ UI vs. LPS 1.5

D: $p < 0,05$ LPS 0.075 vs. LPS 0.75

E: $p < 0,05$ LPS 0.075 vs. LPS 1.5

F: $p < 0,05$ LPS 0.75 vs. LPS 1.5

3.2.2 Differenzierte histologische Auswertung

Nach 6-stündiger maschineller Ventilation in Rückenlage fanden sich regional unterschiedliche, beatmungsassoziierte pulmonale Veränderungen, die in den lungengeschädigten Gruppen aggravierten.

Bei der Analyse der Atelektasen konnte eine signifikante Zunahme in den posterior gelegenen Lungenarealen festgestellt werden.

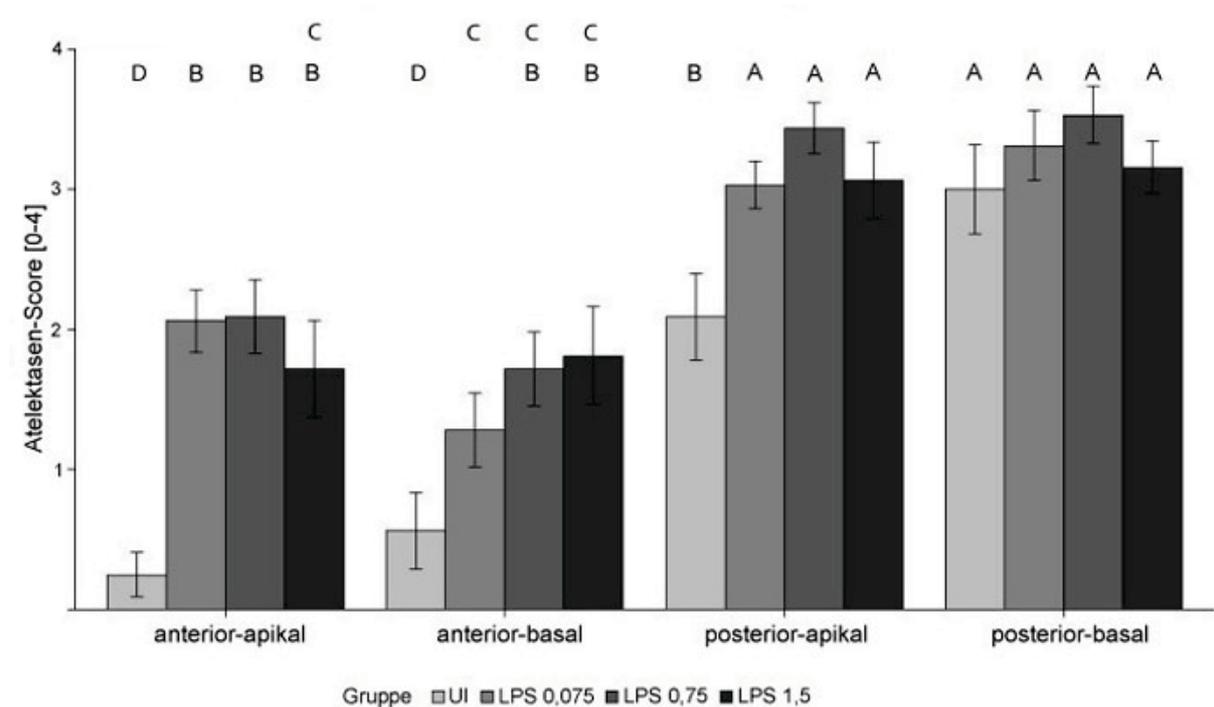


Abbildung 20: Mittelwerte des Atelektasen-Score; nach pulmonaler Lokalisation und Gruppe

Messwerte angegeben mit Balken für Mittelwerte und Standardabweichung als Whisker.

Balken mit verschiedenen Buchstaben A - D haben einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$)

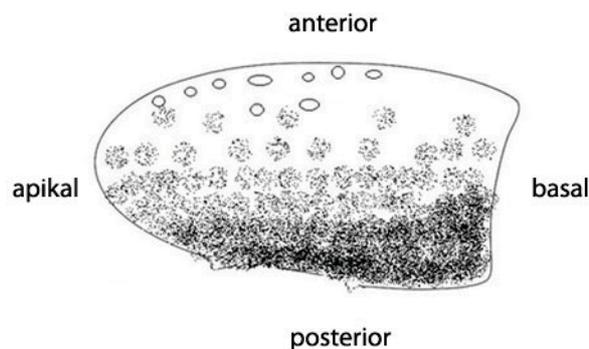


Abbildung 21: Schematische Darstellung der in vivo-Lage der linken Lunge während der Beatmung in Rückenlage.

Emphyseme sind als kleine Kreise und Atelektasen als grau-schwarze Punkte in loco typico dargestellt.

Konträr dazu verhielten sich die Emphyseme, die in den posterior-basalen Arealen kaum auftraten und zur anterior-apikalen Lokalisation hin deutlich zunahmen.

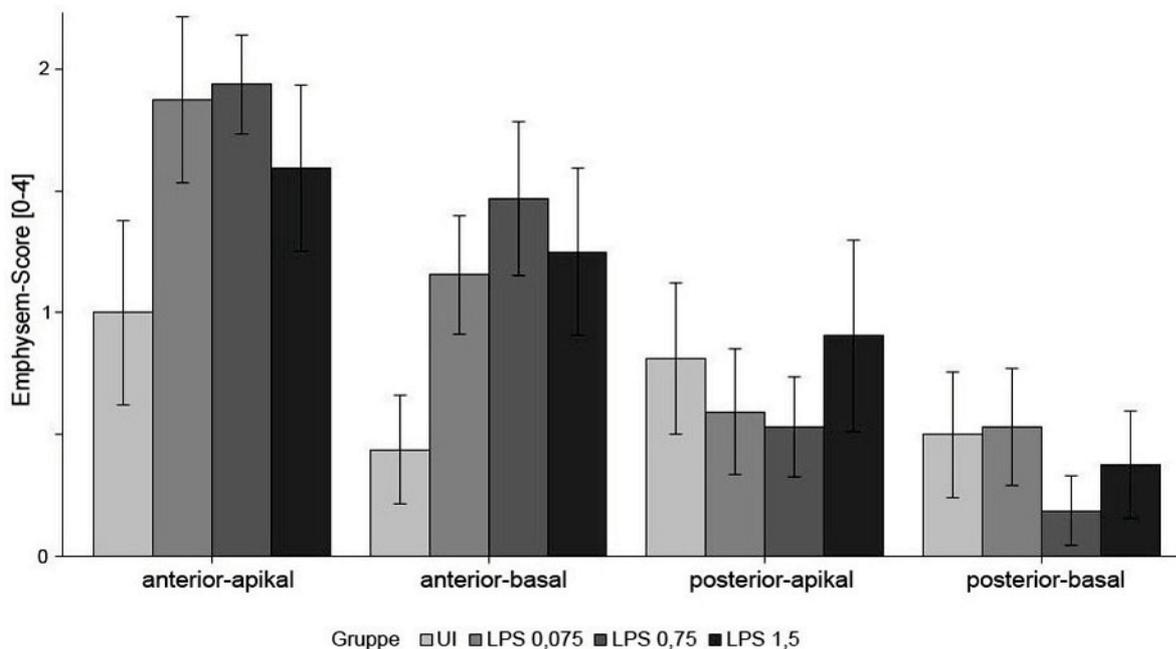


Abbildung 22: Mittelwerte des Emphysem-Scores nach pulmonaler Lokalisation und Gruppe
Messwerte angegeben mit Balken für Mittelwerte und Standardabweichung als Whisker.

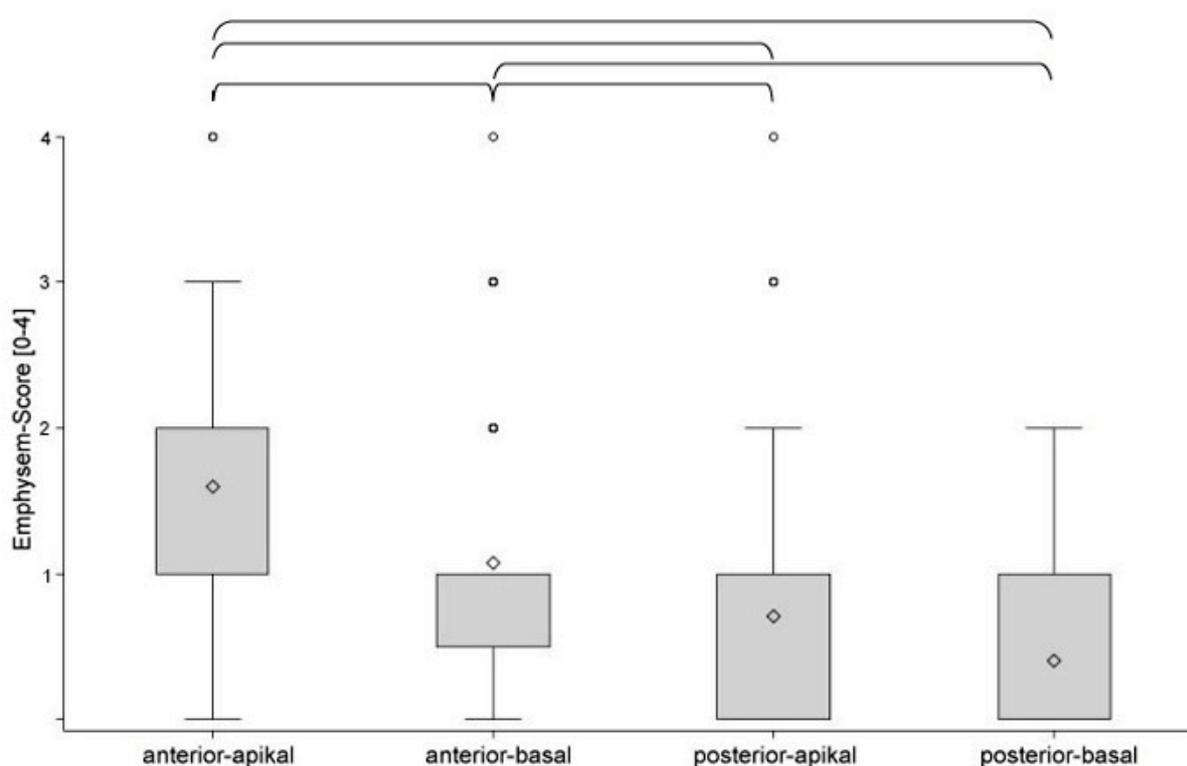


Abbildung 23: Emphysem-Score nach pulmonaler Lokalisation
Dargestellt sind der Median (Raute) und die Interquartilsabstände (Box, Whiskers).
Balken haben einen statistisch signifikanten Unterschied ($p < 0,05$).

3.2.3 Immunohistochemie

Bei der digitalen Bilddatenauswertung wurde bei den Gruppen LPS 0.75 und LPS 1.5 eine signifikante Abnahme des α -SMA-positiven Anteils des Lungenparenchyms registriert. Analog zu den vorhergehend untersuchten profibrotischen mRNA- Expressionsparametern konnte durch eine Verdopplung der LPS Dosis (LPS 0.75 gegen LPS 1.5) kein stärkerer Effekt erzielt werden.

Bei der Verteilung von α -SM1 ergaben sich nach Air-space-Korrektur keine regionalen Unterschiede.

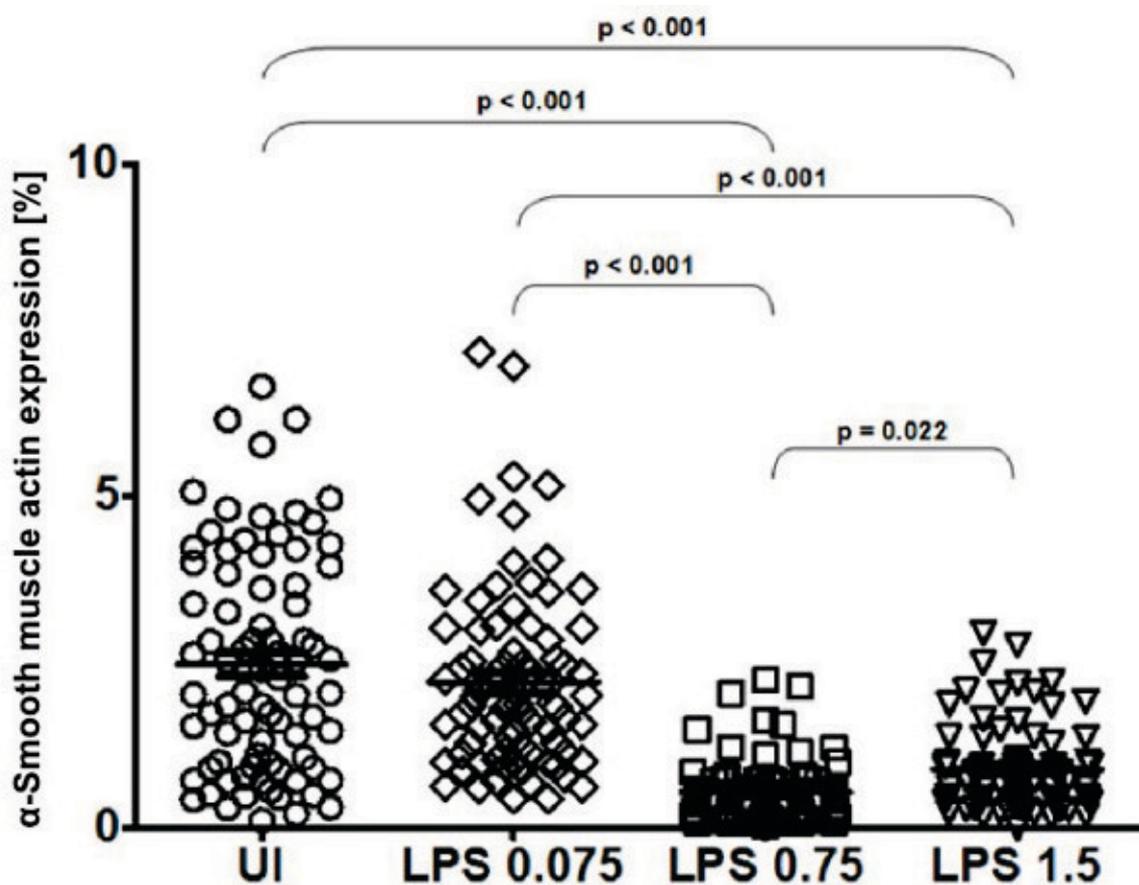


Abbildung 24: Prozentualer Anteil des α -SMA-positiven Lungenparenchyms

Einzelne Messwerte als Punkte und der Median jeweils als Querbalken dargestellt. (je Gruppe 80 Messpunkte)

p-Werte über den Klammern.

Bei der systematischen Analyse der α -SMA-positiven Areale konnten keine signifikanten regionalen Unterschiede im pulmonalen Parenchym festgestellt werden.

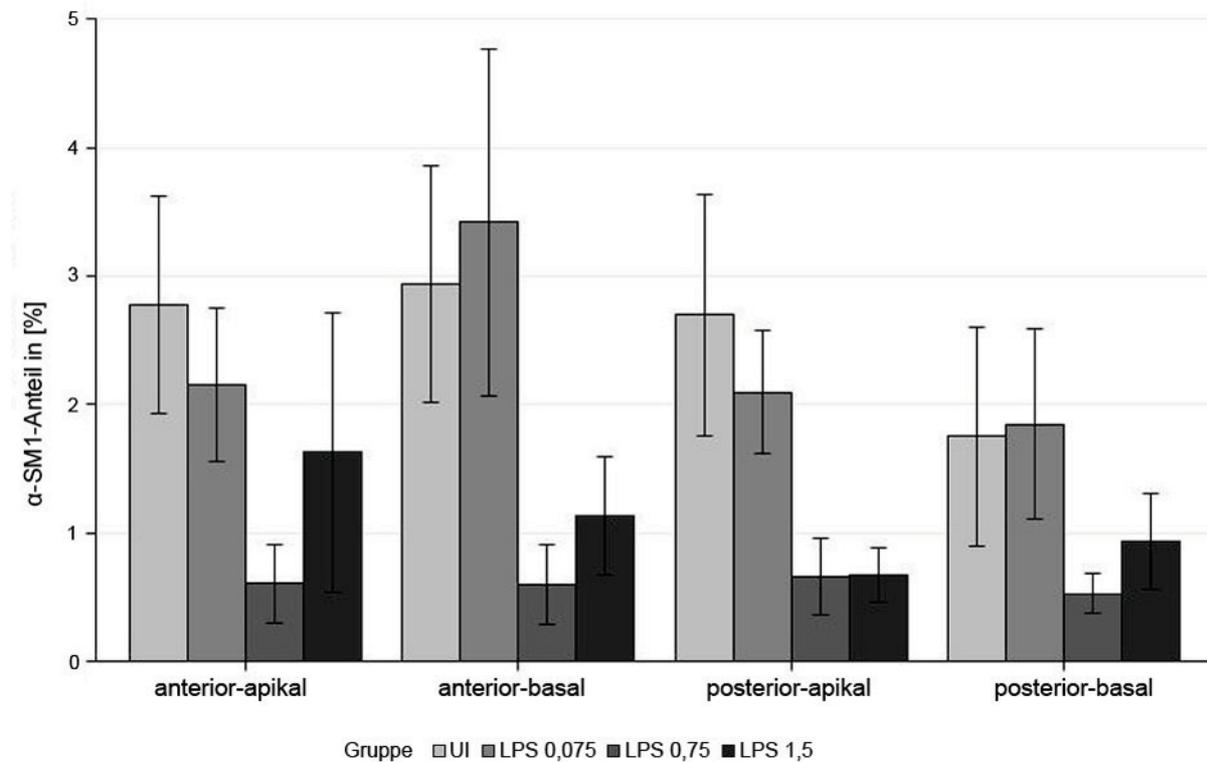


Abbildung 25: Anteil des α -SMA positiven Lungengewebes nach pulmonaler Lokalisation und Gruppe
Messwerte angegeben mit Balken für Mittelwerte und Standardabweichung als Whisker.

3.3 RNA-Expressions-Analysen

3.3.1 Pro-inflammatorische mRNA Expression im pulmonalen Parenchym

Die mRNA-Expressionsraten der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , Interleukin 1 β , Interleukin 6 und CINC-1 stiegen bis zur LPS-Konzentration von 0,75 mg/kgKG/h signifikant an. Eine weitere Steigerung der LPS-Dosis auf 1,5 mg/kgKG/h führte lediglich bei CINC-1 zu einer signifikanten Zunahme.

In den folgenden Diagrammen sind jeweils der Median (Strich in Box) die 25-75% Quartile (Box) und die Werteverteilung der obersten und untersten Ergebnisse (Whiskers) gezeigt, p-Werte über den Klammern.

Die jeweiligen Expressionsraten sind zum Housekeeping-Gen β -Aktin normalisiert und als Fold Change zu der Expression in unbehandelten Tieren angegeben.

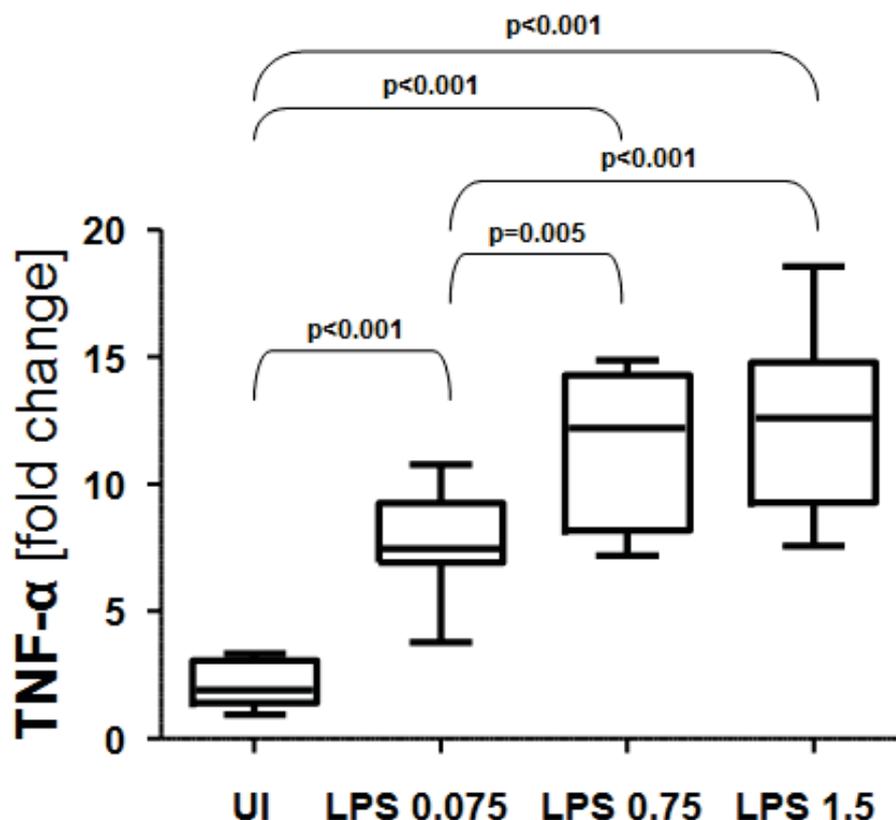


Abbildung 26: mRNA-Expression des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) im Lungengewebe

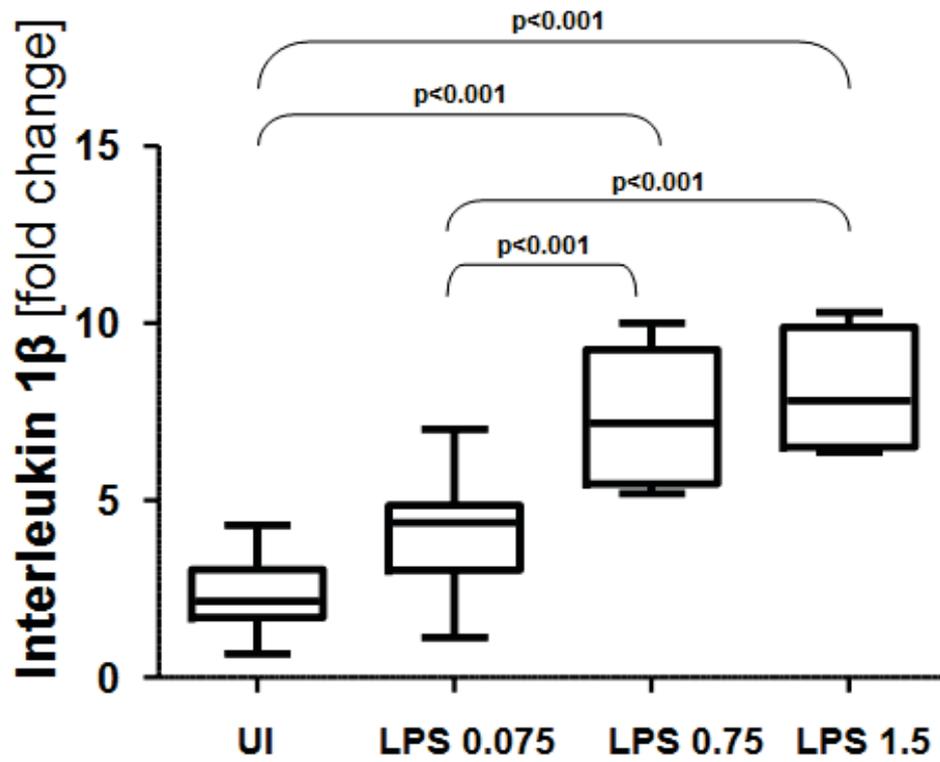


Abbildung 27: mRNA-Expression von Interleukin 1β im Lungengewebe

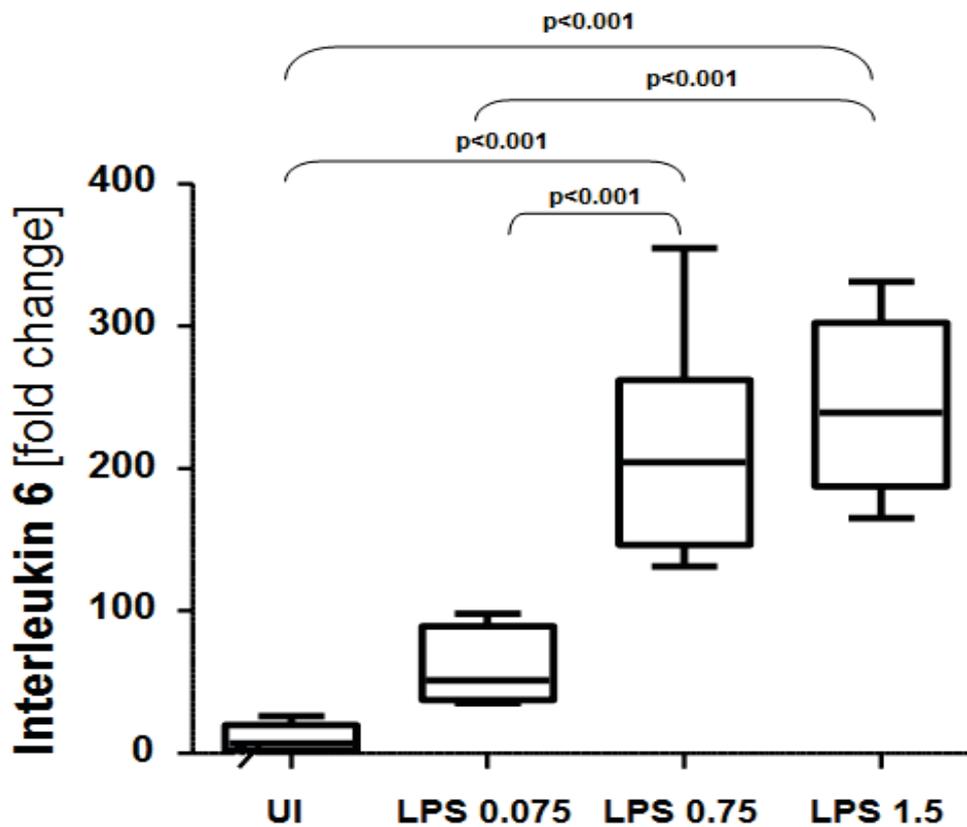


Abbildung 28: mRNA-Expression von Interleukin 6 im Lungengewebe

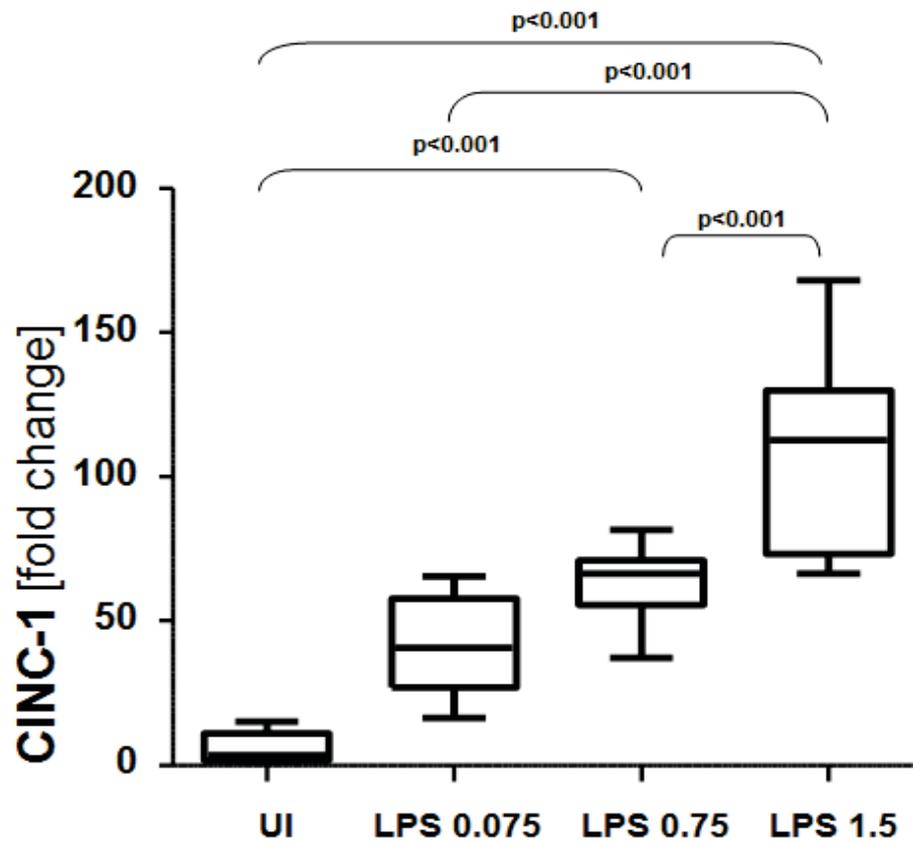


Abbildung 29: mRNA-Expression des Zytokin-induzierten neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) im Lungengewebe

3.3.2 Pro-fibrotische mRNA Expression im pulmonalen Parenchym

In allen LPS-behandelten Gruppen kam es zu einem signifikanten Abfall der RNA-Expression von Prokollagen I und III im Vergleich zur Gruppe UI. Durch Dosissteigerung konnten zwischen den LPS-behandelten Gruppen keine weiteren signifikanten Unterschiede festgestellt werden.

Die jeweiligen Expressionsraten sind zum Housekeeping-Gen β -Aktin normalisiert und als Fold Change zu der Expression in unbehandelten Tieren angegeben.

Dargestellt sind der Median (Strich in Box) und die Werteverteilung der Ergebnisse (mittlere 50% in Box, weitere Werte in Whiskers), p-Werte finden sich über den Klammern.

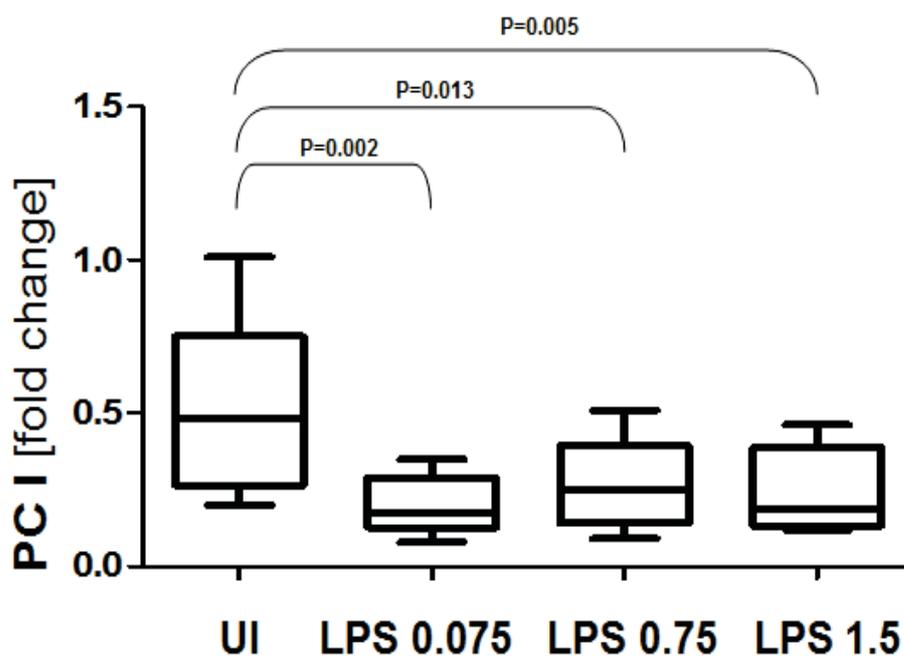


Abbildung 30: mRNA-Expression von Prokollagen I (PC I) im Lungengewebe

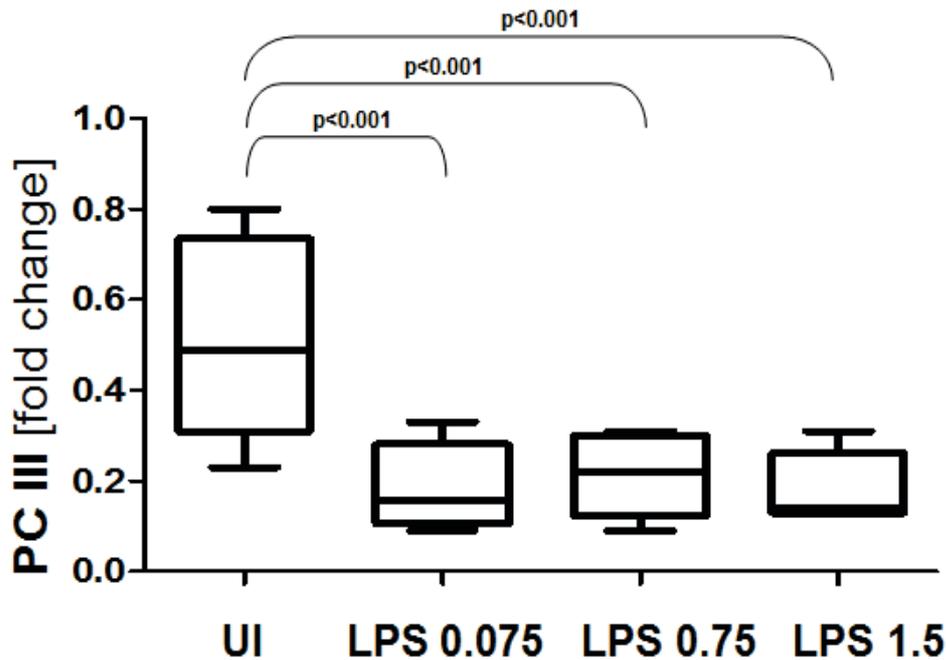


Abbildung 31: mRNA-Expression von Prokollagen III (PC III) im Lungengewebe

3.3.3 Korrelationsanalysen der pulmonalen mRNA Expression

In einer Korrelationsanalyse der analysierten Parameter zueinander fand sich für Prokollagen I und III eine stark positive Korrelation:

PC I gegen PCIII: $r^2 = 0,902$ $p = 0,000002$

Zwischen PC III und den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α , IL 6 und CINC besteht eine negative Korrelation:

TNF- α gegen PCIII: $r^2 = -0,5091$ $p = 0,00145$

IL 6 gegen PCIII: $r^2 = -0,3672$ $p = 0,0345$

CINC gegen PCIII: $r^2 = -0,432$ $p = 0,0138$

Darüber hinaus wurden keine signifikanten Korrelationen gefunden.

4 DISKUSSION

Ziel der vorliegenden Studie war es, die LPS-dosisabhängigen Auswirkungen der systemischen Inflammationsreaktion auf die initiale pulmonale Fibrosierung unter lungenprotektiver Beatmung am in vivo ARDS-Rattenmodell zu untersuchen.

Die primären Endpunkte umfassten die Korrelation zwischen pulmonaler Inflammation (gemessen an proinflammatorischen Zytokinen und histologisch am Lung Injury Score) und Fibrosierung (gemessen an Prokollagen-Expression und α -SMA reaktiven Zellen).

Die proinflammatorischen Zytokine²⁵² (IL-1 β , IL-6, TNF- α und CINC-1) stiegen sowohl im Plasma als auch in der pulmonalen RNA-Expression signifikant an. Der Lungenschädigungsindex^{60, 245} zeigte ebenfalls eine statistisch signifikante Zunahme mit steigender LPS-Gabe von 0,075 auf 0,75 mg/kg/h. Eine weitere Steigerung der LPS-Dosis auf 1,5 mg/kg/h führte jedoch nicht mehr zu einer signifikant vermehrten Zytokinexpression oder Parenchymschädigung.

Bei der Messung der mRNA-Expression²⁵¹ im pulmonalen Parenchym konnte in allen Gruppen mit Endotoxinämie eine verminderte Expression der Prokollagene PC-I und PC-III festgestellt werden.

In den histologischen Messungen wurde dazu korrespondierend ein verminderter Anteil der α -SMA reaktiven Zellen gemessen, der als Marker einer verminderten Myofibroblastenaktivität^{159, 192} gilt.

4.1 Inflammationsreaktion unter Endotoxinämie

In unserer Untersuchung konnte durch sequenzielle intraperitoneale²⁵³ und intravenöse²⁹ Infusion von aufgereinigten Lipopolysacchariden (LPS)¹²⁶ eine systemische Inflammationsreaktion induziert werden^{29, 254, 255}, die zu einer hämodynamischen Instabilität und einer respiratorischen Insuffizienz führte²⁴².

Die Induktion von ARDS durch LPS ist im experimentellen Setting etabliert^{29, 242, 246, 256, 257} und bietet im Gegensatz zur Verwendung von lebenden Bakterien^{246, 258} oder OP-Techniken, wie der Caecum-Perforation^{259, 260}, einen gut titrierbaren, standardisierten inflammatorischen Reiz^{134, 242}.

Durch Steigerung der Dosis des kontinuierlich intravenös verabreichten LPS wurde in diesem Experiment eine Zunahme des septischen Schocks festgestellt. Dies manifestierte sich primär im Anstieg der proinflammatorischen Zytokine sowie sekundär durch steigende Norepinephrin-Dosen, die zur hämodynamischen Stabilisierung notwendig wurden (s. 3.1.2).

Ersteres wurde explizit gezeigt durch Messungen der plasmatischen Konzentration und der pulmonalen mRNA Expressionsraten der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , Interleukin 1 β , Interleukin 6 und CINC-1 (s. 3.1.5 und 3.3).

In den Versuchen konnte festgestellt werden, dass es mit Steigerung der LPS-Dosis von 0,075 mg/kg/h auf 0,75 mg/kg/h zu einer Steigerung der Inflammationsreaktion kam. Durch eine weitere Verdopplung der LPS-Dosis auf 1,5 mg/kg/h konnte jedoch kein weiterer Anstieg der Inflammationsreaktion induziert werden; sowohl hinsichtlich der plasmatischen Konzentrationen (ELISA) der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-6 und CINC-1 als auch der mRNA-Expressionsraten im Lungengewebe von TNF- α , IL-6, IL-1 β bestanden in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Lediglich für die plasmatischen Konzentrationen von IL-1 β und die Expression von CINC-1 wurden unter Steigerung der LPS-Dosis signifikant höhere Werte beobachtet.

In klinischen Studien gingen stark erhöhte Konzentrationen der o.g. proinflammatorischen Zytokine mit einer erhöhten Mortalität einher⁵⁹. Während bei gesunden Menschen bereits im äußerst niedrig dosierten Bereich von 0,4 bis 0,8 μ g/kgKG LPS-dosisabhängige Effekte beobachtet wurden²⁶¹, haben andere Spezies eine sehr unterschiedliche, zum Teil deutlich niedrigere Sensitivität für LPS²⁵⁷. Im Vergleich mit anderen Experimenten mit LPS²⁶² an Rattus

norvegicus domesticus aus unserer Arbeitsgruppe wurden in dieser Untersuchung sehr hohe Zytokinspiegel von IL-6 im Serum generiert.

IL-6 [pg/ml Serum]	LPS-Dosis [mg/kgKG]	LPS-Typ und Quelle	Studie
617 ± 334 Mittelwert ± Standardabweichung	i.v. 0,025 mg/kg/h x 96 h ohne Beatmung	LPS aus E. coli O55:B5 Sigma-Aldrich, Germany	²⁶² n = 6
14395 (9300/54967) Median (Interquartilsabstand)	i.p. 1 mg/kg 24 h vor i.v. 1 mg/kg/h x 6 h	LPS aus E. coli O55:B5 Fluka (Buchs, Schweiz)	²⁹ n = 8
15096 (6307/18831) Median (Interquartilsabstand)	i.p. 0,5 mg 24h vor i.v. 0,75 mg/kg/h x 6 h	LPS aus E. coli O55:B5 Sigma-Aldrich, Germany	²³⁸ n = 8
5202 (4357,5/6389) Median (Interquartilsabstand)	i.p. 0,5 mg 24h vor i.v. 1,5 mg/kg/h x 6 h	LPS aus E. coli O55:B5 Sigma-Aldrich, Germany	²³⁸ n = 8

Tabelle 13: LPS-dosisabhängige Effekte auf IL-6 im Vergleich verschiedener Studien^{29, 238, 262}

Da es sich bei den oben aufgezeigten Studien zum Teil um unterschiedliche LPS-Chargen handelt und es bei LPS eine hohe Variabilität der Dosis-Wirkungs-Relation gibt, sind die absoluten Dosen nicht direkt mit vorangegangenen Experimenten vergleichbar²⁴². Die Potenz des LPS ist von Bakterienstamm, Kulturbedingungen^{125, 126} und Extraktionsverfahren²⁶³ abhängig. Sie wird in Endotoxine-Units (EU) angegeben und mittels des Limulus-Lysate-Assay gemessen²⁶⁴. In unserem Versuch wurde LPS mit einer Potenz von 5 EU/ng verwendet.

Unter der Voraussetzung, dass alle Tiere die 6-stündige Untersuchung überleben sollten, erwies sich in vorangegangenen Untersuchungen mit der verwendeten LPS-Charge eine Infusionsrate von 1,5 mg LPS/kgKG/h als die höchstmögliche Dosis.

Die experimentellen Daten unseres Versuches lassen die Vermutung zu, dass in den beiden hochdosierten Gruppen (LPS 0.75 und LPS 1.5) durch die LPS Dosissteigerung keine wesentliche Aggravation des inflammatorischen Effektes mehr erreicht werden konnte. Während bei vielen tierexperimentell induzierten ARDS-Modellen durch steigende Dosen von LPS stets eine Zunahme der Inflammationsreaktion gemessen wurde^{132, 265-267}, ist bei unserer Studie möglicherweise ein Ceiling-Effekt unter höchstdosiertem LPS im schweren septischen Schock aufgetreten. Um einen Ceiling- oder Sättigungs-Effekt zu beweisen, hätte es jedoch höherer Fallzahlen und weiterer Gruppen mit feinerer Abstufung der Dosis bedurft, um eine Dosis-Wirkungskurve²⁶⁸ zu erstellen.

4.2 Pathophysiologische Veränderungen unter Endotoxinämie

4.2.1 Beatmungsparameter

Unter Verwendung eines standardisierten lungenprotektiven Beatmungsprotokolls^{29, 162, 269} im Sinne einer „open lung strategy“^{48, 270} fanden sich in der Auswertung der Beatmungsparameter keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Das Ausmaß der Inflammation hatte während der 6-stündigen Untersuchungsdauer keine signifikanten Auswirkungen auf die Atemmechanik.

In einer vorangegangenen Arbeit aus der Arbeitsgruppe wurden bereits die zeitlichen Effekte einer lungenprotektiven Beatmung untersucht¹⁶². Hier zeigte sich, dass die initial durch ein Recruitment-Manöver²¹⁷ gewonnene Verbesserung der Compliance unter Anwendung eines open lung PEEP⁴⁸ dennoch unter länger andauernder Beatmung teilweise wieder verloren ging¹⁶². Dies ließ sich auch in unserer Studie replizieren (s. 3.1.2), stand aber nicht im Fokus unserer Untersuchung. Mit zunehmender Beatmungsdauer fanden sich auch unter lungenprotektiven Tidalvolumina von 6 ml/kgKG in geringem Maß pulmonale Emphyse¹⁶². Vorangegangene Experimente zur lungenprotektiven Beatmung haben gezeigt, dass niedrige Tidalvolumina zu einer reduzierten Distension beitragen, was die Lungenschädigung durch Volutrauma minimiert^{40, 86, 229}. In klinischen Studien konnte klar die Überlegenheit einer lungenprotektiven Ventilation mit niedrigen Tidalvolumina von 6 ml/kgKG belegt werden und ist in der ARDS-Therapie etabliert^{31, 40, 271}.

Die klinische Anwendung eines OL-Konzepts ist seit der Veröffentlichung des ART-Trial, das unter OL-Ventilation eine erhöhte Mortalität zeigte²³¹, in kontroverser Diskussion^{232, 233} (s. 1.3.5). Andere RCT-Studien konnten bei der Anwendung an ARDS Patienten keinen signifikanten Mortalitätsunterschied zeigen^{50, 234}. Dies wurde auch in einem Cochrane Review mittels Metaanalyse bestätigt²³⁵.

Das angewandte ARDS-Modell erzeugte durch extrapulmonale Lungenschädigung bei allen LPS-behandelten Gruppen eine signifikante Oxygenierungsstörung. Die Horowitz-Quotienten der mit 0,75 mg/kg/h und 1,5 mg/kg/h LPS behandelten Gruppen lagen nach 6 Stunden jeweils signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Bei einem Minimum von $318,38 \pm 45,1$ mmHg wurden jedoch die ARDS Kriterien⁶⁶ hinsichtlich eines $HQ < 300$ mmHg nicht ganz erfüllt. Dennoch handelte es sich bei den LPS-Gruppen um schwer septische Tiere, die ohne hohe Katecholamin-Dosen und Volumengaben die Experimentdauer von 6

Stunden nicht überlebt hätten (s. 4.2.2). Mit hoher Wahrscheinlichkeit hätte eine länger als 6 Stunden andauernde Beobachtungsdauer im Experiment die progredient abfallenden HQ-Werte in den ARDS-Bereich²⁴² geführt (s. 3.1.2 Abbildung 19), gleichzeitig aber eine peri-experimentelle Mortalität bedingt.

In vorangegangenen Untersuchungen unter ähnlichen experimentellen Bedingungen wurden nach 6 Stunden ein HQ von minimal 347 ± 108 mmHg erreicht²⁹. Als wichtigster Grund für die verhältnismäßig gute Oxygenierung ist mutmaßlich die von Anfang an konsequent umgesetzte lungenprotektive Ventilation^{29,48} anzusehen.

Bei der Messung der physiologischen Parameter wurde ebenfalls eine Hyperkapnie festgestellt, die bis zur LPS-Dosis von 0,75 mg/kgKG/h progredient verlief und eine milde respiratorische Azidose verursachte. Im Sinne eines modernen, lungenprotektiven Beatmungsprotokolls wurde eine permissive Hyperkapnie akzeptiert und wäre, gemäß Versuchsprotokoll, erst ab einem pH > 7,30 durch Anpassung der Atemfrequenz korrigiert worden. Dies war bei einem AMV von 100×6 ml/kgKG/min bei keinem der Tiere notwendig (physiologische AF der Ratte: 70 - 115 / min)²⁷².

Erklärbar ist die beobachtete Hyperkapnie auch durch die global beeinträchtigte pulmonale Diffusionsstörung¹⁰³, die infolge der gesteigerten Inflammation entstand.

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die hier im Kleintiermodell angewandte Beatmungsstrategie^{29,162} geeignet ist, auch unter einer schweren Inflammationsreaktion mit beginnendem ARDS über die Dauer von 6 h einen suffizienten Gasaustausch zu gewährleisten.

Um experimentell eine stärkere pulmonale Diffusionsstörung mit niedrigen Horovitz-Quotienten zu generieren, wäre ein primäres ARDS-Modell durch die endobronchiale Inhalation von LPS²⁶⁵ oder eine endobronchiale Lavage zur Reduktion des Surfactant²⁷³ eine potentere und schnellere Methode gewesen als die hier angewandte systemische Endotoxinämie²⁵⁷, welche diesen Effekt erst nach einiger Zeit ausprägt. Inhalative Methoden einschließlich endobronchialer Applikation bedingen allerdings häufiger ein inhomogenes intrapulmonales Schädigungsmuster, welches für die Messung der Fibrosierung in unsere Falle nachteilig gewesen wäre²⁴³.

4.2.2 Hämodynamik

Alle mit intraperitonealen LPS vorbehandelten Tiere hatten, als Ausdruck des septischen Schockgeschehens⁹⁰, signifikant schlechtere Ausgangsparameter in Bezug auf Herzfrequenz und MAP-Werte.

Nach 2-3 h intravenöser LPS-Infusion wurden steigende Volumengaben und Norepinephrin-Dosen zur Aufrechterhaltung eines mittleren arteriellen Blutdrucks von > 65 mmHg notwendig.

Die Gewichtszunahme am Versuchsende kann als Surrogatparameter für die infundierte Volumenmenge betrachtet werden, da während des Versuchs, bis auf wenige mg gelöster Substanzen, im Wesentlichen isotone Lösung infundiert wurde.

Die physiologische Wasseraufnahme einer gesunden Ratte²⁷² liegt normalerweise bei 80-150 ml/kg/d (= 3,33 - 6,25 ml/kg/h). Die Versuchstiere der Kontrollgruppe hatten eine durchschnittliche Gewichtszunahme von 51,88 g / 6 h, was bei einem Ausgangskörpergewicht von 530 ± 24 g eine durchschnittliche Infusionsmenge von 16,31 ml/kgKG/h ergibt. Im septischen Schock stieg die infundierte Flüssigkeitsmenge bis auf 133,5 g / 6 h an, was einer durchschnittlichen Volumenzufuhr von 41,98 ml/kgKG/h entspricht.

Aus experimentellen Daten einer kolloid-induzierten Hypervolämie im septischen Schock²⁵⁹ sowie aus klinischen Daten¹¹³ ist bekannt, dass eine vermehrte Flüssigkeitsgabe im ARDS die pulmonale Diffusionsstörung weiter aggravieren kann.

Die im Versuch angewandte Schocktherapie wurde an die in der humanen Intensivmedizin angewandten Therapiestrategien wie die Sepsis-Guidelines angelehnt. In diesen Guidelines wird bei einem septischen Schock eine initiale Flüssigkeitsgabe von mindestens 30 ml/kgKG/3h empfohlen^{90, 274}. Bei persistierender Hypotonie sind weitere Gaben von Vollelektrolytlösungen und Vasopressoren vorgesehen⁹⁰.

Nach Versuchsprotokoll erfolgten die Volumengaben und der Katecholamin-Einsatz ausschließlich, um den geforderten minimalen arteriellen Mitteldruck von 65 mmHg aufrechtzuerhalten. Die hierzu aufgewendeten, sehr hohen Flüssigkeitsmengen sind Ausdruck für eine generalisierte LPS-induzierte endovaskuläre Permeabilitätsstörung^{142, 156} mit konsekutiver Ausbildung von Ödemen in allen Organen^{113, 275}.

4.3 Inflammationsabhängige Veränderungen im pulmonalen Parenchym

4.3.1 Histologie

In der histologischen Aufarbeitung des Lungengewebes wurden in allen Gruppen mit intravenöser Endotoxinämie die für ein ARDS typischen Pathologien wie Akkumulation von Leukozyten¹⁵⁰, Schädigung der endothelialen Membranen mit Ausbildung eines Ödems¹¹³ und pulmonale Einblutungen infolge von vaskulären Schäden durch endotheliale Leckage und pulmonal-arterielle Embolien festgestellt⁸⁰. Alle diese pathologischen Veränderungen wurden als semiquantitativer Lungenschädigungsindex zusammengefasst^{60, 245, 246} und waren in den LPS-behandelten Gruppen signifikant häufiger, wobei der LSI bis zur Dosis von 0,75 mg LPS/kgKG/h signifikant anstieg, jedoch mit Steigerung der Dosis auf 1,5 mg LPS/kgKG/h kein weiterer Anstieg mehr erreicht werden konnte. Insgesamt korrelierten die hier erhobenen Messwerte positiv mit den bereits oben erwähnten Inflammationsparametern, wie etwa Interleukine, und negativ mit dem α -SMA positiven Gewebeanteil.

Unter konsequenter Anwendung einer lungenprotektiven Beatmung mittels des open lung approach²²⁶ wurden insgesamt nur sehr wenige mit einem VILI assoziierte Pathologien^{85, 201}, wie durch Hyperinflation verursachte Emphyse, in den Lungen beobachtet. Dies korrelierte mit Daten vorheriger Studien im gleichen Setting¹⁶².

Im ARDS kann eine intra- und interlobare Variabilität^{242, 276} der pathologischen Veränderungen bestehen^{49, 205, 229, 277}. Die für die histologischen Analysen mit Formalin konservierten, rechten Lungenflügel wurden systematisch dreidimensional aufgearbeitet. Durch dieses Vorgehen konnte aufgezeigt werden, dass hyper- oder hypoventilierte Areale der Lunge genauso orthostatischen Einflüssen unterlagen, wie dies in der humanen Intensivmedizin^{49, 215} und in anderen Tierexperimenten²²⁵ beobachtet wurde.

Spätestens seitdem durch Einsatz der Bauchlagerung²⁷⁸ bei hypoxämischen ARDS Patienten eine Reduktion in der Mortalität bewiesen werden konnte^{42, 279}, ist der orthostatische Effekt auf die ventilierte Lunge allgemein anerkannt²⁷⁹. Dass dies auch im kleintierexperimentellen Setting unter lungenprotektiver Beatmung von Bedeutung ist, konnte durch die differenzierte histologische Auswertung gezeigt werden.

Von den hier gemessenen Aspekten des LSI wurde lediglich die Emphysebildung nicht signifikant durch die Inflammationsreaktion beeinflusst (3.2.1). Allerdings fanden sich hier loko-regionale Unterschiede.

Nach 6 h Beatmung in Rückenlage zeigte sich in den dorsal gelegenen Lungenabschnitten eine signifikante Zunahme der Atelektasen im Vergleich zu den anterior gelegenen Abschnitten (3.2.2). Zudem bestanden signifikante LPS-abhängige Unterschiede im Vergleich zur gesunden, nur beatmeten Gruppe. Bei differenzierter Analyse nach Gruppe und Lokalisation konnte mit steigender LPS-Dosis eine tendenziell zunehmende Atelektasenbildung festgestellt werden. Dies ist am ehesten durch zunehmende Gewebsinfiltration durch inflammatorische Zellen und Ödembildung erklärbar. Erneut bildete lediglich die letzte Gruppe mit 1,5 mg LPS/kgKG/h eine Ausnahme.

In der Zone zwischen Atelektasen und ventilierten Lungenarealen entsteht durch atemzyklisches Kollabieren und Rekrutieren der Alveolen ein Atelektrauma²⁰⁸ mit vermehrten intrapulmonalen Scherkräften^{207, 208, 245}. Durch ein Recruitment-Manöver²¹⁸ nach Initiierung der Beatmung und einen individuell optimierten PEEP^{48, 225-227, 245} können diese Effekte minimiert werden (s. 1.3.5). Der zur Rekrutierung notwendige hohe Beatmungsdruck hat wiederum hämodynamische Nebenwirkungen²²⁷ und kann pulmonale Schäden verursachen²²⁹ und sollte daher nicht zu häufig angewendet werden.

In unserem Experiment wurde nur zu Beginn ein Recruitment-Manöver durchgeführt, welches auch unter einem schweren septischen Schockgeschehen eine suffiziente Oxygenierung gewährleisten konnte. Über die Versuchsdauer von 6 h wurde die Bildung der dorsobasalen Atelektasen minimiert, konnte jedoch ohne weitere Rekrutierungs- oder Lagerungsmanöver nicht gänzlich vermieden werden.

Inflammation und Fibrosierung (α -SMA-Anteil) zeigten sich, unter der im Versuch applizierten Endotoxinämie, homogen über das pulmonale Gewebe verteilt. Diese Unterschiede waren, anders als die zuvor erwähnte Emphysem- und Atelektasenverteilung, nicht von der Lungenregion, sondern nur von der LPS-Dosis abhängig.

Der Anteil an α -SMA-positivem Lungengewebe reduzierte sich in unseren Versuchen bei den septischen Gruppen 0,75 und 1,5 mg/kgKG/h signifikant (3.2.3). Unter 0,075 mg/kg/h LPS i.v. wurde ein leichter, jedoch nicht signifikanter Abfall registriert. Insgesamt wurde im Versuch durch Applikation von LPS sowohl eine Suppression von α -SMA auf den Zellen als auch eine signifikante Verminderung der Prokollagene I und III im Parenchym gemessen. Alle untersuchten profibrotischen Faktoren minderten sich bis zur LPS-Dosis von 0,75 mg/kgKG/h in ähnlichem Umfang.

Allerdings muss bedacht werden, dass es sich bei der Fibrosierung um einen Langzeitprozess handelt¹⁹². In unserer Studie erfolgte die Messung bereits nach 30 Stunden. Andere Arbeiten untersuchten einen längeren Zeitraum von bis zu 15 Tagen nach intratrachealer LPS-Applikation und registrierten ab dem 3. Tag einen deutlichen Anstieg der durch α -SMA markierten Myofibroblasten¹¹⁶. Hier wiederum korrelierte studienintern die gemessene Fibrosierungsaktivität ebenfalls mit den Expressionsanalysen der profibrotischen Proteine¹¹⁶.

Eine ebenfalls verminderte Expression von α -SMA nach Gabe von LPS wurde in einer Zellkulturstudie von glatten Muskelzellen aus der Aorta von humanen OP-Präparaten und aus Ratten registriert, wobei die mRNA-Expression Promotor-vermittelt durch LPS inhibiert wird²⁸⁰.

In unserer Untersuchung wurde zwar nicht zwischen den α -SMA positiven Zelltypen differenziert, jedoch erfolgten die Messungen im alveolaren Parenchym in Feldern ohne größere Gefäße. Alveolär vorkommende α -SMA positive Zellen sind zumeist Myofibroblasten^{192, 281}, die im ARDS auch in der BAL¹⁹¹ in steigender Anzahl registriert werden¹⁷⁴. In vitro unterbindet LPS die Migration von alveolären Myofibroblasten²⁸¹. Andererseits können Marker der epithelial-mesenchymalen Transformation^{62, 186, 188} wie TGF- β 1, das bei Umbau und Reparaturprozessen im Gewebe freigesetzt wird, die Expression von α -SMA steigern^{182, 191, 258}. Diese wurden in unserer Studie jedoch nicht miterfasst.

Im Gegensatz zu unseren Experimenten wurde in anderen in-vivo-Untersuchungen zur pulmonalen Fibrosierung zumeist keine bis zum Messzeitpunkt andauernde LPS-Applikation durchgeführt.

In den Ergebnissen unserer Studie wurden, einhergehend mit der reduzierten Expressionsrate von Prokollagenen I und III, verminderte Anteile an α -SMA positiven Zellen im Lungenparenchym der LPS-behandelten Gruppen im Vergleich zur beatmeten Kontrollgruppe festgestellt. Dabei stellt sich die Frage, ob die zuvor vorhandenen α -SMA positiven Myofibrozyten ausgewandert sind¹⁹⁰ oder ob sie ortsständig geblieben sind und lediglich ein verändertes Expressionsmuster für die Unterschiede verantwortlich ist²⁸⁰. Nach Durchsicht der α -SM1-gefärbten Schnitte fällt auf, dass in den LPS-Gruppen auch die Zellen der glatten Gefäßmuskulatur schwächer α -SMA-positiv sind als in den Kontrollgruppen.²⁸⁰. Dies kann anhand der von uns bisher durchgeführten Messungen noch nicht klar beantwortet werden.

Eine weitere Möglichkeit, Art und Ausmaß der Fibrosierung darzustellen, wäre zum Beispiel eine Masson-Goldner-Färbung²⁸² gewesen. Diese dient lediglich der Darstellung der intrapulmonalen Kollagensegmente. Zur differenzierten Messung der Kollagene I und III im pulmonalen Parenchym können auch immunohistochemische Methoden genutzt werden. In einer Autopsie-Studie mit immunhistologischer Aufarbeitung fibrosierter Lungen wurde neben der deutlichen Zunahme von Kollagen I und V ebenfalls eine Abnahme von Kollagen III im Gewebe festgestellt^{167, 170}, wobei mortalitätsassoziiert insbesondere langzeitbeatmete Patienten in fortgeschrittenen ARDS-Stadien untersucht werden konnten.

In einer anderen Autopsie-Studie wurde histologisch gezeigt, dass in der Spätphase des ARDS, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit extrapulmonaler Mortalitätsursache, vermehrt Kollagenfibrillen als elastische Fasern vorhanden sind¹⁶³. In den Spätstadien des ARDS kommen häufiger Typ-I-Kollagen-Fasern vor¹⁷⁰, welche eine vermehrte Dicke und Quervernetzung aufweisen²⁸³.

Beim primären (pulmonal induzierten) ARDS ist dies ausgeprägter als beim sekundären ARDS¹⁶³. Prokollagene wurden in diesen Studien nicht gemessen.

Eine direkte Kollagen-Messung oder eine Messung seiner Abbauprodukte wäre in zukünftigen Studien über frühe ARDS-Stadien gegebenenfalls sehr interessant, um zu differenzieren, ob zunächst eine Degeneration desselben stattfindet. (Vergleiche auch 4.3.2).

4.3.2 Pathobiochemie

Bemerkenswerterweise nahm im Gegensatz zu den Ergebnissen aus verschiedenen anderen experimentellen Studien^{168, 178, 179, 258, 277, 284} in unseren Versuchen die mRNA-Expression von Prokollagen Typ I und III in den septischen Tieren unter protektiver mechanischer Ventilation ab. Vorherige Daten aus unserer Arbeitsgruppe zeigten kongruente Ergebnisse bezüglich der Expressionsreduktion von Prokollagenen in den ersten 30 h eines LPS-induzierten ARDS²⁹ nach 6 h lungenprotektiver Beatmung¹⁶².

In den anderen erwähnten Modellen unterschieden sich einerseits der Modus der LPS-Applikation (intratracheal^{179, 284} bzw. rein intraperitoneal²⁷⁷ oder rein intravenös²⁵⁸) und andererseits der Beobachtungszeitraum (1 h 15 min¹⁷⁸, 26 h²⁷⁷, 4 Tage bis 8 Wochen¹⁷⁹, 24 h bis 17 Monate²⁵⁸) und der Beatmungsmodus. In der Studie von Carvalho et al. zeigten alle Beatmungsgruppen einen leichten Anstieg der PC-III-mRNA-Expression¹⁷⁸. Allerdings war selbst der protektivste der drei genutzten Beatmungsmodi mit einem Tidalvolumen von 8 ml/kgKG + PEEP 12 cmH₂O noch wesentlich aggressiver als unsere lungenprotektiven Bedingungen mit 6 ml/kgKG + individuellen PEEP von durchschnittlich 3,75 cmH₂O.

Eine Hypothese zur Erklärung der von uns erhobenen Daten ist, dass die Fibrosierungsreaktion in der frühen Phase mehr von der Ventilationsstrategie als von der Inflamationsreaktion abhängig ist. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass andere Studien gezeigt haben, dass unter Beatmung mit hohen Tidalvolumina oder ohne optimierte PEEP-Level^{29, 245} die Prokollagen-III-mRNA Expression stark ansteigt^{178, 181, 285}.

Der Vergleich mit klinischen Studien an Patienten wird dadurch erschwert, dass nicht immer Biopsie-Proben zur Verfügung stehen, um die mRNA-Expression im Parenchym zu messen. Stattdessen wird in einem Großteil der Arbeiten die Proteinkonzentration von Prokollagenen^{58, 161, 172, 187} oder deren Spaltprodukten, den C- oder N-terminalen-Peptiden des Prokollagens^{158, 159, 171} aus der bronchoalveolären Lavage^{58, 158, 160, 171, 172, 187} oder aus dem Serum^{58, 158, 168} gemessen (s. 0).

Aus Messungen der BAL von ARDS Patienten weiß man, dass sowohl Prokollagene und deren Spaltprodukte als auch Produkte der Kollagendegeneration (charakteristische $\frac{3}{4}$ und $\frac{1}{4}$ Kollagen-Fragmente)²⁸⁶ im ARDS vermehrt anfallen. Letzteres ist bedingt durch eine vermehrte Aktivität der Kollagenasen, die zu den Matrix-Metalloproteasen gehören^{145, 146}.

Bereits 1999 fanden Lynne Armstrong et al. in der BAL von Patienten mit schwerem ARDS signifikant erhöhte Prokollagenbestandteile (N-terminale-Peptide des Prokollagens I) und

erniedrigte Mengen von Kollagen-Fragmenten¹⁷⁵. Im Gegensatz dazu hatte ihre Patientengruppe „at Risk“, die man nach aktueller ARDS Definition⁶⁶ als mildes ARDS bezeichnen würde, zwar signifikant höhere Mengen von Kollagen-Fragmenten, aber normale NT-PC-I-Konzentrationen¹⁷⁵. Diese Daten suggerieren, dass eine Balance zwischen Synthese und Degeneration von Kollagenen besteht, die sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Phase des ARDS verändert^{62, 175} und vom Beatmungsmodus abhängig ist^{62, 178, 182, 285}. Hierzu passen die von uns gemachten Beobachtungen der signifikant erniedrigten Expression von PC-I mRNA Expression unter lungenprotektiver Beatmung bei einem beginnenden ARDS.

Eine Erklärungshypothese hierzu ist, dass in frühen ARDS-Stadien zunächst das bereits vorhandene Kollagen im Gewebe mittels MMPs destruiert wird^{146, 287}, um die Migration von Entzündungszellen ins Gewebe zuzulassen¹⁴⁵.

Diese vermehrte Destruktion der extrazellulären Matrix^{80, 183} induziert zu einem späteren Zeitpunkt die vermehrte Bildung von Prokollagenen im Rahmen der Reparaturprozesse des Gewebes, welche einhergehen mit einer erhöhten Prokollagen-Expression, die durch mechanischen Stress^{178, 196} amplifiziert werden kann^{62, 166}.

Primär kommt es im pulmonalen Parenchym unter LPS-induziertem Stress zu einer Reduktion der Genexpression²⁸⁸, da sich der Organismus in einer katabolen Notsituation mit Hypoxie²⁸⁹ und respiratorischer Azidose befindet²⁹⁰. In einer Studie von Nardelli et al. wurden Ratten in einem Paraquat-induzierten ARDS über 1h lungenprotektiv beatmet²⁸⁹. Dabei wurde unter Hyperkapnie ($p_a\text{CO}_2$ 60-70mmHg) eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von IL-1 β , IL-6 und PC III gezeigt. Der am ehesten durch die respiratorische Azidose vermittelte Effekt konnte durch Pufferung abgemildert werden. Dies ist die einzige uns bekannte Studie, die eine ähnliche Verminderung der Prokollagenexpression in der primären Phase des ARDS zeigte, wobei sich, differierend zu unseren Ergebnissen, alle und nicht ausschließlich die profibrotischen Expressionsraten verminderten.

Die sekundäre Gewebsreparatur, die assoziiert ist mit einer vermehrten Prokollagen-Produktion, mündet schlussendlich in einer Fibrosierung^{62, 291}. Natürlich bestehen in der Realität in Daten klinischer Studien fließende Übergänge zwischen diesen Prozessen und den Phasen des ARDS (s. 1.3), lediglich in experimentellen Arbeiten²⁹² ist eine höhere zeitliche Trennschärfe gegeben²⁹³. Um aber die Ergebnisse unserer Untersuchung

diesbezüglich besser einordnen zu können, hätte es einerseits der Analyse der Kollagen-Fragmente oder andererseits eines längeren Beobachtungszeitraums bedurft. Zusätzlich hätte eine Analyse eines weiteren Surrogat-Parameters der Kollagenbildung, wie der Aminosäure Hydroxyprolin, ergänzt werden können. Hydroxyprolin ist ein Hauptbestandteil des Kollagens und ein vermehrter Gehalt ist ein Surrogat-Parameter für eine vermehrte Kollagenmenge im Gewebe und konnte im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transformation in durch Volutrauma geschädigten Lungen nachgewiesen werden¹⁸². Möglicherweise lässt sich eine Überexpression von Prokollagenen und Fibroproliferation erst nach mehreren Tagen^{190, 193, 258} in der abklingenden, post-inflammatorischen Phase feststellen^{62, 171, 177, 294}.

Andere Arbeiten zeigten bei Patienten in frühen Phasen des ARDS eine erhöhte Expression und Konzentrationen von PC III^{118, 178} und PC I^{133, 175, 179}.

In den klinischen Studien von Marshall et al. und von Chesnutt et al. wurden 24 h nach ARDS-Diagnose in der BAL^{118, 158} und im Serum¹⁵⁸ signifikant erhöhte Konzentrationen von Bestandteilen des Prokollagen III Proteins gemessen¹⁵⁸. Der Einschluss in die Studie erfolgte innerhalb von 24 h nach Diagnose des ARDS auf der Intensivstation bei beatmeten Patienten¹⁵⁸. Limitierend im Vergleich mit experimentellen Arbeiten ist der unscharf definierte Beginn des schädigenden Ereignisses, welches unter Umständen mehrere Tage zurückliegen könnte, bis die Patienten auf die Intensivstation aufgenommen wurden und sich das Vollbild eines ARDS entwickelte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Prokollagen-III-Proteinkonzentration im Serum auch nach erhöhter Destruktion von extrapulmonalem Gewebe ansteigen kann²⁹⁵.

Die profibrotischen Einflüsse nicht-protektiver Beatmung wurden in zahlreichen Arbeiten dargelegt^{62, 180, 296}. Bei einer Paraquat-induzierten Lungenschädigung an Ratten führte eine assistierte im Vergleich zur kontrollierten Beatmung ebenfalls zu einer Reduktion der mRNA-Expression von Prokollagen-III²⁹⁷.

In vorangegangenen Experimenten unserer Arbeitsgruppe hatte, beim Vergleich von niedrigem PEEP gegenüber OL-PEEP oder HFO, der Beatmungsmodus nach 6h keinen signifikanten Effekt auf die Prokollagenexpression²⁹. Lediglich die Induktion eines akuten Lungenschadens mit LPS führte zu einer signifikanten Minderung der PC-III Expression²⁹. Um die Reliabilität und eventuelle dosisabhängige Effekte zu untersuchen, wurde schließlich diese Arbeit initiiert.

Aus vorhergehenden Untersuchungen ist des Weiteren bekannt, dass mit steigender Dauer der mechanischen Ventilation eine Inflammationsreaktion mit pulmonaler Schädigung⁸⁶ induziert wird, die ebenfalls mit einem Rückgang der pulmonalen Expression von Prokollagen I und III korrelierte¹⁶².

Aktuell wird davon ausgegangen, dass das Spaltprodukt des Prokollagens aus der extrazellulären Kollagensynthese, das N-terminale-Peptid des Prokollagen Typ III in der BAL einen frühen, reliablen Marker für eine aktive pulmonale Fibrosierung darstellt¹⁷¹ (s. 1.3.3). Im experimentellen Setting ist die Messung von mRNA der Prokollagene aus dem pulmonalen Parenchym etabliert^{259, 285, 296}.

Um die Veränderungen der RNA-Expressionsraten im Vergleich zu der nativen (nicht beatmeten) Kontrollgruppe zu quantifizieren, wurde in unserer Studie die relative Expression [Fold Change] berechnet. Dabei wird von allen Proben die basal vorhandene Expressionsrate des Housekeeping-Gen β -Aktin gemessen und zu der jeweiligen Probe normalisiert ($2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode)²⁵¹. In vorangegangenen Versuchen¹⁶² konnte gezeigt werden, dass sich β -Aktin gut als endogene Kontrolle eignet, da dessen Expression mit der anderer basal exprimierter Gene, wie Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, vergleichbar ist²⁵¹. Mit der Herstellung des Bezugs zur nativen Kontrollgruppe werden metabolisch assoziierte Effekte auf die Genexpressionsraten normalisiert.

Vorausgegangene Studien^{29, 162} der Arbeitsgruppe hatten hinsichtlich der parenchymatösen RNA-Repressionsraten keine signifikanten Unterschiede zwischen Ober- und Unterlappen des rechten Lungenflügels ergeben, weshalb in dieser Studie nur an einem Ort, nämlich im rechten Unterlappen, gemessen wurde.

In statistischen Analysen unserer Versuchsdaten wurden zwischen der Menge der exprimierten mRNA von Prokollagen III und der Expression der proinflammatorischen Zytokine (TNF- α , IL-6 und CINC) im pulmonalen Parenchym jeweils signifikante, negative Korrelationen festgestellt.

Diese Ergebnisse lassen einen Zusammenhang zwischen der LPS-induzierten Inflammationsreaktion und der Suppression der Prokollagenexpression vermuten. Vollkommen unklar bleiben jedoch die Mechanismen der herabgesetzten mRNA-Expression. Denkbar wären direkte, LPS-vermittelte Effekte via Toll-like-Rezeptoren^{123, 294, 298} auf die fibrozytäre Genregulation und Expression. Möglicherweise sind auch steigende Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , aus aktivierten

Leukozyten²⁹⁹ und eine Zunahme der parenchymalen Apoptoserate^{137, 300} oder temporär verminderte mesenchymale Transformationsfaktoren¹⁸⁴ verantwortlich. Da weitere Analysen von Einzelfaktoren wie etwa Versuche an isolierten Zellkulturen oder Färbung von apoptotischen Zellen fehlen, kann aus diesen Daten diesbezüglich kein Schluss gezogen werden.

Im Gegensatz zu unseren Daten fanden Madtes et al. in BAL-Untersuchungen von ARDS-Patienten einen synergistischen Zusammenhang zwischen erhöhten TNF- α und PC-III Proteinkonzentrationen, die beide mit erhöhter Mortalität assoziiert waren¹⁸⁷.

4.4 Schlussfolgerungen

Erwartungsgemäß wurde durch gesteigerte LPS-Dosen eine erhöhte Inflammationsreaktion sowohl pulmonal als auch systemisch induziert, was sich durch eine vermehrte Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-1, IL-6, TNF- α und CINC-1) und einen Anstieg des Lungenschädigungsindex manifestierte.

Laut unseren Daten bewirkt eine LPS-Dosissteigerung in den beiden höchstdosierten LPS-Gruppen weder eine weitere Verschlechterung des Lungenschädigungsindex noch eine Aggravation der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion. Da sich in der Literatur auch gegenteilige Resultate mit kontinuierlicher Verschlechterung finden, müsste die Hypothese, dass es sich um einen Ceiling-Effekt handelt, durch weitere Experimente mit Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Kurve validiert werden.

Im Gegensatz zu den bisher veröffentlichten Studien über Fibrosierung unter LPS erfolgte die Applikation von LPS in dieser Untersuchung kontinuierlich bis zum Versuchsende. Die meisten Studien zur pulmonalen Fibrosierung geben nach initialer Schädigung keine weiteren LPS, was jedoch nicht dem klinischen Verlauf einer schweren Sepsis mit kontinuierlicher bakterieller LPS-Produktion entspricht. Bei dem hier genutzten Modell wurden im septischen Schock, ähnlich wie unter intensivmedizinischen Bedingungen, eine hohe Flüssigkeitssubstitution und Katecholamingaben notwendig. Allerdings hat dieser Versuchsablauf eine erhöhte Mortalität durch Multiorganversagen v. a. bei LPS-Dosen von 1,5 mg/kg zur Folge, was die Versuchsdauer auf 6 h einschränkt. Unbeantwortet bleibt daher durch unsere Ergebnisse die Frage, wie sich die untersuchten Parameter in späteren Stadien des ARDS verhalten.

Mittels der vorliegenden Studie konnte erneut demonstriert werden, dass sich die open lung strategy mit V_t 6 ml/kgKG und OL-PEEP im ARDS zur lungenprotektiven Beatmung mit Gewährleistung einer suffizienten Oxygenierung eignet. Auch im septischen Schock konnte ein Horovitz-Quotient von über 300 mmHg erreicht werden. Bei einer Versuchsdauer von mehr als 6 h wäre der HQ wahrscheinlich unter die Grenze eines milden ARDS von 300 mmHg gefallen (s. 3.1.2).

Zur rapiden Induktion einer schweren Oxygenierungsstörung sind Modelle des primären ARDS durch endobronchiale Applikation von schädigenden Agentien besser geeignet, haben aber den Nachteil einer inhomogenen Verteilung. Daher wurde für unseren Versuch ein sekundäres ARDS-Modell gewählt.

Innerhalb der 6 h Untersuchungsdauer reduziert sich die Compliance. Dabei unterlag die Versuchstierlunge, genau wie aus der humanen Intensivmedizin bereits bekannt, nach 6 h Ventilation leichten gravitationsbedingten Effekten. Wie erwartet kam es zu einer dorsobasalen Atelektasenbildung und anterio-apikalen Emphysembildung, was mittels histologischer Untersuchungen bewiesen wurde. Allerdings verhinderte die lungenprotektive Beatmung weitgehend die Bildung größerer Atelektasen. Die o. g. Effekte wurden durch die Inflammation tendenziell verstärkt.

Alle LPS-behandelten Gruppen zeigten eine Zunahme des Lungenschädigungsindex. Die Verteilung der Myofibrozyten in den untersuchten Lungen, gemessen als α -SMA positive Fläche, zeigte keine loko-regionären Unterschiede. Mit höheren LPS-Dosen und damit einhergehender, steigender Inflammationsreaktion nahm der Anteil der α -SMA-positiven Fläche ab. Unklar bleibt, ob dies durch LPS-vermittelte Apoptose, Auswanderung der Fibrozyten oder verminderte α -SMA-Expression auf den Zellen bedingt ist. Der letztgenannte Effekt ist bei glatten Gefäßmuskelzellen bereits beobachtet worden.

Eine direkte Messung des Kollagengehaltes im Gewebe, z.B. via Hydroxyprolin oder Anfärbung von Kollagen-Fibrillen im Gewebe, wurde nicht durchgeführt. Dies hätte aufzeigen können, ob das Kollagen unter der akuten Inflammationsreaktion mit der Aktivität von MMPs im Gewebe abgenommen hat. Kollagenfragmente als Produkte der MMP wurden ebenfalls nicht gemessen. Aus theoretischen Aspekten könnte man in der untersuchten Initialphase des ARDS eine Abnahme des Kollagengehalts und konsekutive Erhöhung der Abbauprodukte erwarten.

Eine Messung der mRNA von Prokollagenen ist im klinischen und experimentellen Setting als reliabler Marker einer frühen pulmonalen Fibrosierungsreaktion etabliert. Die relative mRNA-Expression von PC-I und PC-III nahm unter unseren Versuchsbedingungen in allen LPS-behandelten Gruppen ab. Andere Studien konnten zeigen, dass insbesondere durch mechanischen Stress infolge lungenschädigender Beatmung eine Zunahme der Prokollagenexpression erfolgt. Die im Gegensatz dazu in unserem Versuch verminderten Expressionsraten von Prokollagen könnten durch einen direkten Effekt auf die Transkription der Zellen zustande kommen, entweder LPS-vermittelt oder durch die Hyperkapnie im ARDS bedingt.

Mittels statistischer Analysen ließ sich eine inverse Korrelation zwischen IL-6 und PC-III bestätigen, wie sie in vorherigen Experimenten unter den gleichen Versuchsbedingungen bereits gezeigt wurde.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Das akute Lungenversagen (ARDS) ist ein komplexes Krankheitsbild mit therapierefraktärer Hypoxie, welche durch pathologische Veränderungen im Lungenparenchym ausgelöst wird. Dazu zählen Inflammationsreaktionen, Ventilations- und Perfusionsstörungen unterschiedlichster Ursachen.

Im entzündlich veränderten Gewebe sind die interstitiellen Strukturen der Lungen besonders vulnerabel. Schäden an der Basalmembran entstehen infolge mechanischer Belastung, wie dies insbesondere bei Dyspnoe und künstlicher Beatmung der Fall ist. Wenn Schäden an Basalmembran, Kollagengerüst und elastischen Fasern entstanden sind, kommt in der Folge ein Reparaturprozess in Gang, der bei überschießender Reaktion oder fehlender Reorganisation der strukturellen Integrität des funktionellen pulmonalen Parenchyms in eine Lungenfibrose münden kann. Bei vielen Patienten tritt daher unter künstlicher Beatmung eine gravierende pulmonale Fibrose auf, die trotz moderner intensivmedizinischer Verfahren mit funktionellen Einschränkungen und einer hohen Mortalität einhergeht.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkung einer Lipopolysaccharid-induzierten Sepsis auf die pulmonale Fibrose in der Initialphase des akuten Lungenversagens unter protektiver mechanischer Ventilation (open-lung strategy) zu erforschen.

In einer prospektiven, randomisierten und kontrollierten Studie an 40 Ratten, wovon 8 als native und 8 als beatmete Kontrolle dienten, wurde bei 24 Tieren eine LPS-getriggerte Peritonitis ausgelöst durch eine Initialgabe von 0,5 mg/kgKG. Nach 24 h wurden die Tiere tracheotomiert und lungenprotektiv beatmet. Ab diesem Zeitpunkt erhielten sie eine von drei verschiedenen kontinuierlich intravenös applizierten LPS-Dosen, die einen septischen Schock induzierten. In dieser Phase wurden über 6 h hämodynamische und respiratorische Parameter erhoben. Das Ausmaß der Inflammationsreaktion wurde anhand der Expression der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, TNF- α und CINC-1 im pulmonalen Parenchym sowie deren Serumkonzentration gemessen. Die pulmonale Schädigung wurde anhand des Lung Injury Score erfasst. Die Quantifizierung der Fibrosierung erfolgte mittels Messung der mRNA Expression von Prokollagen I und III und des prozentualen Anteils an α -SMA positiven Zellen.

Eine Erhöhung der LPS-Dosis führte erwartungsgemäß zu einem signifikanten Anstieg der proinflammatorischen Zytokine, sowohl im Plasma als auch in der pulmonalen mRNA-Expression. Auch der Lung Injury Score stieg mit zunehmender LPS-Gabe von 0,075 auf 0,75 mg/kg/h signifikant an. Eine Steigerung der LPS-Dosis auf 1,5 mg/kg/h führte allerdings nicht, wie erwartet, zu einer signifikant vermehrten Zytokinexpression oder Parenchymschädigung. In allen Gruppen mit Endotoxinämie wurde im pulmonalen Parenchym eine verminderte mRNA-Expression der Prokollagene PC-I und PC-III und ein verminderter Anteil an α -SMA positiven Zellen gemessen. Nach unseren Daten scheint es also in der initialen Phase eines Endotoxin-induzierten sekundären ARDS im untersuchten in vivo Modell zunächst eine Herabregulation der profibrotischen Mechanismen zu geben.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. Lassen, HC: A preliminary report on the 1952 epidemic of poliomyelitis in Copenhagen with special reference to the treatment of acute respiratory insufficiency. *Lancet*, 1: 37-41, 1953.
2. Ibsen, B: The anaesthetist's viewpoint on the treatment of respiratory complications in poliomyelitis during the epidemics in Copenhagen 1952. *Proc R Soc Med*, 1954.
3. Reisner-Senelar, L: The birth of intensive care medicine: Bjorn Ibsen's records. *Intensive care medicine*, 37: 1084-1086, 2011.
4. Price, JL: The evolution of breathing machines. *Medical history*, 6: 67-72, 1962.
5. Slutsky, AS: History of Mechanical Ventilation. From Vesalius to Ventilator-induced Lung Injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191: 1106-1115, 2015.
6. L., SJ: JAMES LORRAIN SMITH, M.A., M.D., LL.D., D.Sc. F.R.C.P.Ed., F.R.S., F.R.S.Ed. *British Medical Journal*, 1: 773-776, 1931.
7. Cedergren, B, Gyllensten, L, Wersall, J: Pulmonary damage caused by oxygen poisoning: an electron-microscopic study in mice. *Acta paediatrica*, 48: 477-494, 1959.
8. Hyde, RW, Rawson, AJ: Unintentional iatrogenic oxygen pneumonitis--response to therapy. *Annals of internal medicine*, 71: 517-531, 1969.
9. Cullen, DJ, Caldera, DL: The incidence of ventilator-induced pulmonary barotrauma in critically ill patients. *Anesthesiology*, 50: 185-190, 1979.
10. Slutsky, AS, Ranieri, VM: Ventilator-induced lung injury. *N Engl J Med*, 369: 2126-2136, 2014.
11. Avery, ME: Surfactant deficiency in hyaline membrane disease: the story of discovery. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161: 1074-1075, 2000.
12. Donald, I: Neonatal respiration and hyaline membrane. *British journal of anaesthesia*, 29: 553-569, 1957.
13. Ashbaugh, DG, Bigelow, DB, Petty, TL, Levine, BE: Acute respiratory distress in adults. *Lancet*, 2: 319-323, 1967.
14. Gattinoni, L, Quintel, M: Fifty Years of Research in ARDS Why Is Acute Respiratory Distress Syndrome So Important for Critical Care? *American journal of respiratory and critical care medicine*, 194: 1051-1052, 2016.
15. Villar, J, Slutsky, AS: GOLDEN anniversary of the acute respiratory distress syndrome: still much work to do! *Current opinion in critical care*, 2016.
16. Petty, TL, Ashbaugh, DG: The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. *Chest*, 60: 233-239, 1971.
17. Heller, H: Treatment of respiratory distress in poliomyelitis with iron lung apparatus. *Harefuah*, 34: 31, 1948.
18. Moon, VH: The pathology of secondary shock. *The American journal of pathology*, 24: 235-273, 1948.
19. Brandt, L: [The history of endotracheal anesthesia, with special regard to the development of the endotracheal tube]. *Der Anaesthetist*, 35: 523-530, 1986.
20. Bernard, G: Acute Lung Failure — Our Evolving Understanding of ARDS. *New England Journal of Medicine*, 377: 507-509, 2017.
21. Hill, JD, O'Brien, TG, Murray, JJ, Dontigny, L, Bramson, ML, Osborn, JJ, Gerbode, F: Prolonged extracorporeal oxygenation for acute post-traumatic respiratory failure

- (shock-lung syndrome). Use of the Bramson membrane lung. *N Engl J Med*, 286: 629-634, 1972.
22. Browdie, DA, Deane, R, Shinozaki, T, Morgan, J, DeMeules, JE, Coffin, LH, Davis, JH: Adult respiratory distress syndrome (ARDS), sepsis, and extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *The Journal of trauma*, 17: 579-586, 1977.
 23. Lewandowski, K: Extracorporeal membrane oxygenation for severe acute respiratory failure. *Critical care*, 4: 156-168, 2000.
 24. Clark, LC, Jr., Gollan, F: Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science*, 152: 1755-1756, 1966.
 25. Quintel, M, van Ackern, K: Partial liquid ventilation (PLV) in acute respiratory failure. *Acta anaesthesiologica Scandinavica Supplementum*, 109: 73-74, 1996.
 26. Tsagogiorgas, C, Alb, M, Herrmann, P, Quintel, M, Meinhardt, JP: Cardiopulmonary function and oxygen delivery during total liquid ventilation. *Pediatric pulmonology*, 46: 964-975, 2011.
 27. Slutsky, AS, Drazen, FM, Ingram, RH, Jr., Kamm, RD, Shapiro, AH, Fredberg, JJ, Loring, SH, Lehr, J: Effective pulmonary ventilation with small-volume oscillations at high frequency. *Science*, 209: 609-671, 1980.
 28. Young, D, Lamb, SE, Shah, S, MacKenzie, I, Tunnicliffe, W, Lall, R, Rowan, K, Cuthbertson, BH, Group, OS: High-frequency oscillation for acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 368: 806-813, 2013.
 29. Krebs, J, Pelosi, P, Tsagogiorgas, C, Zoeller, L, Rocco, PR, Yard, B, Luecke, T: Open lung approach associated with high-frequency oscillatory or low tidal volume mechanical ventilation improves respiratory function and minimizes lung injury in healthy and injured rats. *Critical care*, 14: R183, 2010.
 30. Luecke, T, Herrmann, P, Quintel, M: High frequency oscillatory ventilation as therapy for acute lung injury and ARDS. *Der Anaesthetist*, 49: 972-980, 2000.
 31. Gattinoni, L, Quintel, M: How ARDS should be treated. *Critical care*, 20: 86, 2016.
 32. Skogby, M, Mellgren, K, Adrian, K, Friberg, LG, Chevalier, JY, Mellgren, G: Induced cell trauma during in vitro perfusion: a comparison between two different perfusion systems. *Artificial organs*, 22: 1045-1051, 1998.
 33. Larm, O, Larsson, R, Olsson, P: A new non-thrombogenic surface prepared by selective covalent binding of heparin via a modified reducing terminal residue. *Biomaterials, medical devices, and artificial organs*, 11: 161-173, 1983.
 34. Mielck, F, Quintel, M: Extracorporeal membrane oxygenation. *Current opinion in critical care*, 11: 87-93, 2005.
 35. Kluge, S, Muller, T, Pfeifer, M: Current approaches to the treatment of severe hypoxic respiratory insufficiency (acute lung injury; acute respiratory distress syndrome). *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 136: 186-189, 2011.
 36. Weber-Carstens, S, Goldmann, A, Quintel, M, Kalenka, A, Kluge, S, Peters, J, Putensen, C, Muller, T, Rosseau, S, Zwissler, B, Moerer, O: Extracorporeal lung support in H1N1 provoked acute respiratory failure: the experience of the German ARDS Network. *Deutsches Arzteblatt international*, 110: 543-549, 2013.
 37. Peek, GJ, Mugford, M, Tiruvoipati, R, Wilson, A, Allen, E, Thalanany, MM, Hibbert, CL, Truesdale, A, Clemens, F, Cooper, N, Firmin, RK, Elbourne, D: Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*, 374: 1351-1363, 2009.
 38. Fan, E, Del Sorbo, L, Goligher, EC, Hodgson, CL, Munshi, L, Walkey, AJ, Adhikari, NKJ, Amato, MBP, Branson, R, Brower, RG, Ferguson, ND, Gajic, O, Gattinoni, L, Hess, D,

- Mancebo, J, Meade, MO, McAuley, DF, Pesenti, A, Ranieri, VM, Rubenfeld, GD, Rubin, E, Seckel, M, Slutsky, AS, Talmor, D, Thompson, BT, Wunsch, H, Uleryk, E, Brozek, J, Brochard, LJ: An Official American Thoracic Society/European Society of Intensive Care Medicine/Society of Critical Care Medicine Clinical Practice Guideline: Mechanical Ventilation in Adult Patients with Acute Respiratory Distress Syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 195: 1253-1263, 2017.
39. Combes, A, Hajage, D, Capellier, G, Demoule, A, Lavoue, S, Guervilly, C, Da Silva, D, Zafrani, L, Tirot, P, Veber, B, Maury, E, Levy, B, Cohen, Y, Richard, C, Kalfon, P, Bouadma, L, Mehdaoui, H, Beduneau, G, Lebreton, G, Brochard, L, Ferguson, ND, Fan, E, Slutsky, AS, Brodie, D, Mercat, A: Extracorporeal Membrane Oxygenation for Severe Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med*, 378: 1965-1975, 2018.
40. ARDS-Network: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. . *N Engl J Med*, 342: 1301-1308, 2000.
41. DGAI, DGfAul: S3-Leitlinieline Invasive Beatmung und Einsatz extrakorporaler Verfahren bei akuter respiratorischer Insuffizienz. *Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF)*, 001/021, 2017.
42. Guerin, C: Prone ventilation in acute respiratory distress syndrome. *European respiratory review : an official journal of the European Respiratory Society*, 23: 249-257, 2014.
43. Guerin, C, Reignier, J, Richard, JC, Beuret, P, Gacouin, A, Boulain, T, Mercier, E, Badet, M, Mercat, A, Baudin, O, Clavel, M, Chatellier, D, Jaber, S, Rosselli, S, Mancebo, J, Sirodot, M, Hilbert, G, Bengler, C, Richecoeur, J, Gainnier, M, Bayle, F, Bourdin, G, Leray, V, Girard, R, Baboi, L, Ayzac, L: Prone positioning in severe acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 368: 2159-2168, 2013.
44. Artigas, A, Bernard, GR, Carlet, J, Dreyfuss, D, Gattinoni, L, Hudson, L, Lamy, M, Marini, JJ, Matthay, MA, Pinsky, MR, Spragg, R, Suter, PM: The American-European Consensus Conference on ARDS, part 2. Ventilatory, pharmacologic, supportive therapy, study design strategies and issues related to recovery and remodeling. *Intensive care medicine*, 24: 378-398, 1998.
45. Papazian, L, Forel, JM, Gacouin, A, Penot-Ragon, C, Perrin, G, Loundou, A, Jaber, S, Arnal, JM, Perez, D, Seghboyan, JM, Constantin, JM, Courant, P, Lefrant, JY, Guerin, C, Prat, G, Morange, S, Roch, A: Neuromuscular blockers in early acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 363: 1107-1116, 2010.
46. Patel, BK, Wolfe, KS, Pohlman, AS, Hall, JB, Kress, JP: Effect of Noninvasive Ventilation Delivered by Helmet vs Face Mask on the Rate of Endotracheal Intubation in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 315: 2435-2441, 2016.
47. Ou, X, Hua, Y, Liu, J, Gong, C, Zhao, W: Effect of high-flow nasal cannula oxygen therapy in adults with acute hypoxemic respiratory failure: a meta-analysis of randomized controlled trials. *CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne*, 189: E260-e267, 2017.
48. Amato, MB, Barbas, CS, Medeiros, DM, Schettino Gde, P, Lorenzi Filho, G, Kairalla, RA, Deheinzelin, D, Morais, C, Fernandes Ede, O, Takagaki, TY, et al.: Beneficial effects of the "open lung approach" with low distending pressures in acute respiratory distress syndrome. A prospective randomized study on mechanical ventilation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 152: 1835-1846, 1995.

49. Gattinoni, L, Caironi, P, Cressoni, M, Chiumello, D, Ranieri, VM, Quintel, M, Russo, S, Patroniti, N, Cornejo, R, Bugedo, G: Lung recruitment in patients with the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 354: 1775-1786, 2006.
50. Kacmarek, RM, Villar, J, Sulemanji, D, Montiel, R, Ferrando, C, Blanco, J, Koh, Y, Soler, JA, Martinez, D, Hernandez, M, Tucci, M, Borges, JB, Lubillo, S, Santos, A, Araujo, JB, Amato, MB, Suarez-Sipmann, F: Open Lung Approach for the Acute Respiratory Distress Syndrome: A Pilot, Randomized Controlled Trial. *Critical care medicine*, 44: 32-42, 2016.
51. Bellani, G, Laffey, JG, Pham, T, Fan, E, Brochard, L, Esteban, A, Gattinoni, L, van Haren, F, Larsson, A, McAuley, DF, Ranieri, M, Rubenfeld, G, Thompson, BT, Wrigge, H, Slutsky, AS, Pesenti, A: Epidemiology, Patterns of Care, and Mortality for Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome in Intensive Care Units in 50 Countries. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 315: 788-800, 2016.
52. Hecker, M, Weigand, MA, Mayer, K: Acute respiratory distress syndrome. *Der Internist*, 53: 557-566, 2012.
53. Del Sorbo, L, Slutsky, AS: Acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Current opinion in critical care*, 17: 1-6, 2011.
54. Jain, M: Fibroproliferative ARDS in the Era of low-tidal-volume ventilation. *Chest*, 146: 1140-1142, 2014.
55. Kim, WY, Suh, HJ, Hong, SB, Koh, Y, Lim, CM: Diaphragm dysfunction assessed by ultrasonography: influence on weaning from mechanical ventilation. *Critical care medicine*, 39: 2627-2630, 2011.
56. Doodoo-Schittko, F, Brandstetter, S, Blecha, S, Thomann-Hackner, K, Brandl, M, Knuttel, H, Bein, T, Apfelbacher, C: Determinants of Quality of Life and Return to Work Following Acute Respiratory Distress Syndrome. *Deutsches Arzteblatt international*, 114: 103-109, 2017.
57. Herridge, MS, Tansey, CM, Matte, A, Tomlinson, G, Diaz-Granados, N, Cooper, A, Guest, CB, Mazer, CD, Mehta, S, Stewart, TE, Kudlow, P, Cook, D, Slutsky, AS, Cheung, AM: Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 364: 1293-1304, 2011.
58. Entzian, P, Huckstadt, A, Kreipe, H, Barth, J: Determination of serum concentrations of type III procollagen peptide in mechanically ventilated patients. Pronounced augmented concentrations in the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 142: 1079-1082, 1990.
59. Meduri, GU, Headley, S, Kohler, G, Stentz, F, Tolley, E, Umberger, R, Leeper, K: Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest*, 107: 1062-1073, 1995.
60. Martin, C, Papazian, L, Payan, MJ, Saux, P, Gouin, F: Pulmonary fibrosis correlates with outcome in adult respiratory distress syndrome. A study in mechanically ventilated patients. *Chest*, 107: 196-200, 1995.
61. Burnham, EL, Janssen, WJ, Riches, DW, Moss, M, Downey, GP: The fibroproliferative response in acute respiratory distress syndrome: mechanisms and clinical significance. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 43: 276-285, 2014.
62. Cabrera-Benitez, NE, Laffey, JG, Parotto, M, Spieth, PM, Villar, J, Zhang, H, Slutsky, AS: Mechanical ventilation-associated lung fibrosis in acute respiratory distress syndrome: a significant contributor to poor outcome. *Anesthesiology*, 121: 189-198, 2014.
63. Murray, JF, Matthay, MA, Luce, JM, Flick, MR: An expanded definition of the adult respiratory distress syndrome. *Am Rev Respir Dis*, 138: 720-723, 1988.

64. Bernard, GR, Artigas, A, Brigham, KL, Carlet, J, Falke, K, Hudson, L, Lamy, M, Legall, JR, Morris, A, Spragg, R: The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 149: 818-824, 1994.
65. Bernard, GR, Artigas, A, Brigham, KL, Carlet, J, Falke, K, Hudson, L, Lamy, M, LeGall, JR, Morris, A, Spragg, R: Report of the American-European Consensus conference on acute respiratory distress syndrome: definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. Consensus Committee. *Journal of critical care*, 9: 72-81, 1994.
66. ARDS-Definition Task Force, Ranieri, VM, Rubenfeld, GD, Thompson, BT, Ferguson, ND, Caldwell, E, Fan, E, Camporota, L, Slutsky, AS: Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 307: 2526-2533, 2012.
67. Ferguson, ND, Fan, E, Camporota, L, Antonelli, M, Anzueto, A, Beale, R, Brochard, L, Brower, R, Esteban, A, Gattinoni, L, Rhodes, A, Slutsky, AS, Vincent, JL, Rubenfeld, GD, Thompson, BT, Ranieri, VM: The Berlin definition of ARDS: an expanded rationale, justification, and supplementary material. *Intensive care medicine*, 38: 1573-1582, 2012.
68. Andreas W. Reske, UG: Pathophysiologie des Lungenversagens *Anästh Intensivmed* 2018;59:249-264, 2018: 249-264, 2018.
69. Villar, J, Blanco, J, Anon, JM, Santos-Bouza, A, Blanch, L, Ambros, A, Gandia, F, Carriedo, D, Mosteiro, F, Basaldua, S, Fernandez, RL, Kacmarek, RM: The ALIEN study: incidence and outcome of acute respiratory distress syndrome in the era of lung protective ventilation. *Intensive care medicine*, 37: 1932-1941, 2011.
70. Linko, R, Okkonen, M, Pettila, V, Perttila, J, Parviainen, I, Ruokonen, E, Tenhunen, J, Alakokko, T, Varpula, T: Acute respiratory failure in intensive care units. FINNALL: a prospective cohort study. *Intensive care medicine*, 35: 1352-1361, 2009.
71. Sigurdsson, MI, Sigvaldason, K, Gunnarsson, TS, Moller, A, Sigurdsson, GH: Acute respiratory distress syndrome: nationwide changes in incidence, treatment and mortality over 23 years. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 57: 37-45, 2013.
72. Brun-Buisson, C, Minelli, C, Bertolini, G, Brazzi, L, Pimentel, J, Lewandowski, K, Bion, J, Romand, JA, Villar, J, Thorsteinsson, A, Damas, P, Armaganidis, A, Lemaire, F: Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Results from the ALIVE study. *Intensive care medicine*, 30: 51-61, 2004.
73. Rubenfeld, GD, Caldwell, E, Peabody, E, Weaver, J, Martin, DP, Neff, M, Stern, EJ, Hudson, LD: Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med*, 353: 1685-1693, 2005.
74. Li, G, Malinchoc, M, Cartin-Ceba, R, Venkata, CV, Kor, DJ, Peters, SG, Hubmayr, RD, Gajic, O: Eight-year trend of acute respiratory distress syndrome: a population-based study in Olmsted County, Minnesota. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183: 59-66, 2011.
75. Villar, J, Sulemanji, D, Kacmarek, RM: The acute respiratory distress syndrome: incidence and mortality, has it changed? *Current opinion in critical care*, 20: 3-9, 2014.
76. Buregeya, E, Fowler, RA, Talmor, DS, Twagirumugabe, T, Kiviri, W, Riviello, ED: Acute respiratory distress syndrome in the global context. *Global heart*, 9: 289-295, 2014.
77. Máca, J, Jor, O, Holub, M, Sklienka, P, Burša, F, Burda, M, Janout, V, Ševčík, P: Past and Present ARDS Mortality Rates: A Systematic Review. *Respiratory care*, 62: 113-122, 2017.
78. Doodoo-Schittko, F, Brandstetter, S, Brandl, M, Blecha, S, Quintel, M, Weber-Carstens, S, Kluge, S, Meybohm, P, Rolfes, C, Ellger, B, Bach, F, Welte, T, Muders, T, Thomann-Hackner, K, Bein, T, Apfelbacher, C: Characteristics and provision of care of patients with the acute respiratory distress syndrome: descriptive findings from the DACAPO

- cohort baseline and comparison with international findings. *Journal of thoracic disease*, 9: 818-830, 2017.
79. Sensen, B, Braune, S, de Heer, G, Bein, T, Kluge, S: [Life after ARDS]. *Medizinische Klinik, Intensivmedizin und Notfallmedizin*, 112: 605-611, 2017.
 80. Thompson, BT, Chambers, RC, Liu, KD: Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 377: 562-572 + Supplement, 2017.
 81. Ware, LB, Matthay, MA: The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 342: 1334-1349, 2000.
 82. Perl, M, Lomas-Neira, J, Venet, F, Chung, CS, Ayala, A: Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. *Expert review of respiratory medicine*, 5: 115-126, 2011.
 83. Katzenstein, AL, Bloor, CM, Leibow, AA: Diffuse alveolar damage--the role of oxygen, shock, and related factors. A review. *The American journal of pathology*, 85: 209-228, 1976.
 84. Thille, AW, Esteban, A, Fernandez-Segoviano, P, Rodriguez, JM, Aramburu, JA, Vargas-Erazuriz, P, Martin-Pellicer, A, Lorente, JA, Frutos-Vivar, F: Chronology of histological lesions in acute respiratory distress syndrome with diffuse alveolar damage: a prospective cohort study of clinical autopsies. *The Lancet Respiratory medicine*, 1: 395-401, 2013.
 85. Bachofen, M, Weibel, ER: Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis*, 116: 589-615, 1977.
 86. Dreyfuss, D, Saumon, G: Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157: 294-323, 1998.
 87. Slutsky, AS, Ranieri, VM: Ventilator-induced lung injury. *N Engl J Med*, 370: 980, 2014.
 88. Gattinoni, L, Bombino, M, Pelosi, P, Lissoni, A, Pesenti, A, Fumagalli, R, Tagliabue, M: Lung structure and function in different stages of severe adult respiratory distress syndrome. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 271: 1772-1779, 1994.
 89. Shaver, CM, Bastarache, JA: Clinical and biological heterogeneity in acute respiratory distress syndrome: direct versus indirect lung injury. *Clinics in chest medicine*, 35: 639-653, 2014.
 90. Rhodes, A, Evans, LE, Alhazzani, W, Levy, MM, Antonelli, M, Ferrer, R, Kumar, A, Sevransky, JE, Sprung, CL, Nunnally, ME, Rochwerg, B, Rubenfeld, GD, Angus, DC, Annane, D, Beale, RJ, Bellingham, GJ, Bernard, GR, Chiche, JD, Coopersmith, C, De Backer, DP, French, CJ, Fujishima, S, Gerlach, H, Hidalgo, JL, Hollenberg, SM, Jones, AE, Karnad, DR, Kleinpell, RM, Koh, Y, Lisboa, TC, Machado, FR, Marini, JJ, Marshall, JC, Mazuski, JE, McIntyre, LA, McLean, AS, Mehta, S, Moreno, RP, Myburgh, J, Navalesi, P, Nishida, O, Osborn, TM, Perner, A, Plunkett, CM, Ranieri, M, Schorr, CA, Seckel, MA, Seymour, CW, Shieh, L, Shukri, KA, Simpson, SQ, Singer, M, Thompson, BT, Townsend, SR, Van der Poll, T, Vincent, JL, Wiersinga, WJ, Zimmerman, JL, Dellinger, RP: Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Critical care medicine*, 45: 486-552, 2017.
 91. Bellani, G, Laffey, JG, Pham, T, Madotto, F, Fan, E, Brochard, L, Esteban, A, Gattinoni, L, Bumbasirevic, V, Piquilloud, L, van Haren, F, Larsson, A, McAuley, DF, Bauer, PR, Arabi, YM, Ranieri, MM, Antonelli, M, Rubenfeld, GD, Thompson, BT, Wrigge, H, Slutsky, AS, Pesenti, A: Non-invasive Ventilation of Patients with ARDS: Insights from the LUNG SAFE Study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 2016.
 92. Raghu, G, Collard, HR, Egan, JJ, Martinez, FJ, Behr, J, Brown, KK, Colby, TV, Cordier, JF, Flaherty, KR, Lasky, JA, Lynch, DA, Ryu, JH, Swigris, JJ, Wells, AU, Ancochea, J, Bouros, D, Carvalho, C, Costabel, U, Ebina, M, Hansell, DM, Johkoh, T, Kim, DS, King, TE, Jr., Kondoh, Y, Myers, J, Muller, NL, Nicholson, AG, Richeldi, L, Selman, M, Dudden, RF, Griss,

- BS, Protzko, SL, Schunemann, HJ, Fibrosis, AEJACoIP: An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 183: 788-824, 2011.
93. Hellmich, B, Loffler, C: [What are the indications for rescue procedures? : Systemic rheumatic diseases in the intensive care unit]. *Zeitschrift fur Rheumatologie*, 2019.
94. Arondi, S, Valsecchi, A, Borghesi, A, Monti, S: Pulmonary sarcoidosis presenting with acute respiratory distress syndrome. *Annals of thoracic medicine*, 11: 79-81, 2016.
95. Kroegel, C, Foerster, M, Quickert, S, Slevogt, H, Neumann, T: Vaskulitiden und eosinophile Lungenerkrankungen. *Zeitschrift fur Rheumatologie*, 77, 2018.
96. Osho, AA, Castleberry, AW, Yerokun, BA, Mulvihill, MS, Rucker, J, Snyder, LD, Davis, RD, Hartwig, MG: Clinical predictors and outcome implications of early readmission in lung transplant recipients. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*, 36: 546-553, 2017.
97. Kleber, C, Giesecke, MT, Tsokos, M, Haas, NP, Buschmann, CT: Trauma-related preventable deaths in Berlin 2010: need to change prehospital management strategies and trauma management education. *World journal of surgery*, 37: 1154-1161, 2013.
98. Fremont, RD, Koyama, T, Calfee, CS, Wu, W, Dossett, LA, Bossert, FR, Mitchell, D, Wickersham, N, Bernard, GR, Matthay, MA, May, AK, Ware, LB: Acute lung injury in patients with traumatic injuries: utility of a panel of biomarkers for diagnosis and pathogenesis. *The Journal of trauma*, 68: 1121-1127, 2010.
99. Duarte, AG: ARDS in pregnancy. *Clinical obstetrics and gynecology*, 57: 862-870, 2014.
100. Plotz, J, Krone, HA: Amniotic fluid embolism. *Der Anaesthetist*, 38: 76-80, 1989.
101. Gordon, E, South, M, McDougall, PN, Dargaville, PA: Blood aspiration syndrome as a cause of respiratory distress in the newborn infant. *The Journal of pediatrics*, 142: 200-202, 2003.
102. Rastan, AJ, Lachmann, N, Walther, T, Doll, N, Gradistanac, T, Gommert, JF, Lehmann, S, Wittekind, C, Mohr, FW: Autopsy findings in patients on postcardiotomy extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). *The International journal of artificial organs*, 29: 1121-1131, 2006.
103. Crimi, E, Slutsky, AS: Inflammation and the acute respiratory distress syndrome. *Best practice & research Clinical anaesthesiology*, 18: 477-492, 2004.
104. Christiani, DC: Vaping-Induced Lung Injury. *N Engl J Med*, 2019.
105. Maybauer, MO, Rehberg, S, Traber, DL, Herndon, DN, Maybauer, DM: Pathophysiology of acute lung injury in severe burn and smoke inhalation injury. *Der Anaesthetist*, 58: 805-812, 2009.
106. Layden, JE, Ghinai, I, Pray, I, Kimball, A, Layer, M, Tenforde, MW, Navon, L, Hoots, B, Salvatore, PP, Elderbrook, M, Haupt, T, Kanne, J, Patel, MT, Saathoff-Huber, L, King, BA, Schier, JG, Mikosz, CA, Meiman, J: Pulmonary Illness Related to E-Cigarette Use in Illinois and Wisconsin - Final Report. *N Engl J Med*, 382: 903-916, 2020.
107. McCullough, B, Schneider, S, Greene, ND, Johanson, WG, Jr.: Bleomycin-induced lung injury in baboons: alteration of cells and immunoglobulins recoverable by bronchoalveolar lavage. *Lung*, 155: 337-358, 1978.
108. Clark, JM, Lambertsen, CJ, Gelfand, R, Flores, ND, Pisarello, JB, Rossman, MD, Elias, JA: Effects of prolonged oxygen exposure at 1.5, 2.0, or 2.5 ATA on pulmonary function in men (predictive studies V). *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*, 86: 243-259, 1999.

109. Greenberg, K, Kohl, B: ECMO used successfully in a near fatal case of opioid-induced acute respiratory distress syndrome. *The American journal of emergency medicine*, 36: 343.e345-343.e346, 2018.
110. Levine, M, Skolnik, AB, Ruha, AM, Bosak, A, Menke, N, Pizon, AF: Complications following antidotal use of intravenous lipid emulsion therapy. *Journal of medical toxicology: official journal of the American College of Medical Toxicology*, 10: 10-14, 2014.
111. Adir, Y, Bove, AA: Lung injury related to extreme environments. *European respiratory review: an official journal of the European Respiratory Society*, 23: 416-426, 2014.
112. Fulkerson, WJ, McLendon, RE, Prosnitz, LR: Adult respiratory distress syndrome after limited thoracic radiotherapy. *Cancer*, 57: 1941-1946, 1986.
113. Gattinoni, L, Cressoni, M, Brazzi, L: Fluids in ARDS: from onset through recovery. *Current opinion in critical care*, 20: 373-377, 2014.
114. Cranshaw, JH, Griffiths, MJD: Inflammatory processes in the acute respiratory distress syndrome. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 14: 66-73, 2003.
115. Anderson, WR, Thielen, K: Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Ultrastructural pathology*, 16: 615-628, 1992.
116. Domenici, L, Pieri, L, Gallè, MB, Romagnoli, P, Adembri, C: Evolution of endotoxin-induced lung injury in the rat beyond the acute phase. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 71: 59-69, 2004.
117. Zapol, WM, Trelstad, RL, Coffey, JW, Tsai, I, Salvador, RA: Pulmonary fibrosis in severe acute respiratory failure. *Am Rev Respir Dis*, 119: 547-554, 1979.
118. Chesnutt, AN, Matthay, MA, Tibayan, FA, Clark, JG: Early detection of type III procollagen peptide in acute lung injury. Pathogenetic and prognostic significance. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 156: 840-845, 1997.
119. Xiang, M, Fan, J: Pattern recognition receptor-dependent mechanisms of acute lung injury. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)*, 16: 69-82, 2010.
120. Chan, JK, Roth, J, Oppenheim, JJ, Tracey, KJ, Vogl, T, Feldmann, M, Horwood, N, Nanchahal, J: Alarmins: awaiting a clinical response. *The Journal of clinical investigation*, 122: 2711-2719, 2012.
121. Bianchi, ME: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *Journal of leukocyte biology*, 81: 1-5, 2007.
122. Takeuchi, O, Akira, S: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140: 805-820, 2010.
123. Balamayooran, T, Balamayooran, G, Jeyaseelan, S: Review: Toll-like receptors and NOD-like receptors in pulmonary antibacterial immunity. *Innate immunity*, 16: 201-210, 2010.
124. Angus, DC, van der Poll, T: Severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*, 369: 840-851, 2013.
125. Raetz, CR: Biochemistry of endotoxins. *Annual review of biochemistry*, 59: 129-170, 1990.
126. Raetz, CR, Ulevitch, RJ, Wright, SD, Sibley, CH, Ding, A, Nathan, CF: Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 5: 2652-2660, 1991.
127. Wright, SD, Ramos, RA, Tobias, PS, Ulevitch, RJ, Mathison, JC: CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science*, 249: 1431-1433, 1990.

128. Yang, RB, Mark, MR, Gray, A, Huang, A, Xie, MH, Zhang, M, Goddard, A, Wood, WI, Gurney, AL, Godowski, PJ: Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. *Nature*, 395: 284-288, 1998.
129. Drenth, JP, van der Meer, JW: The inflammasome--a linebacker of innate defense. *N Engl J Med*, 355: 730-732, 2006.
130. Friedman, R, Hughes, AL: Molecular evolution of the NF-kappaB signaling system. *Immunogenetics*, 53: 964-974, 2002.
131. Han, S, Mallampalli, RK: The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation. *Journal of immunology*, 194: 855-860, 2015.
132. Finney, SJ, Leaver, SK, Evans, TW, Burke-Gaffney, A: Differences in lipopolysaccharide- and lipoteichoic acid-induced cytokine/chemokine expression. *Intensive care medicine*, 38: 324-332, 2012.
133. Pittet, JF, Mackersie, RC, Martin, TR, Matthay, MA: Biological markers of acute lung injury: prognostic and pathogenetic significance. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 155: 1187-1205, 1997.
134. Lopez-Aguilar, J, Quilez, ME, Marti-Sistac, O, Garcia-Martin, C, Fuster, G, Puig, F, Flores, C, Villar, J, Artigas, A, Blanch, L: Early physiological and biological features in three animal models of induced acute lung injury. *Intensive care medicine*, 36: 347-355, 2010.
135. Lundblad, LK, Thompson-Figueroa, J, Leclair, T, Sullivan, MJ, Poynter, ME, Irvin, CG, Bates, JH: Tumor necrosis factor-alpha overexpression in lung disease: a single cause behind a complex phenotype. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 171: 1363-1370, 2005.
136. Huang, Y, Crawford, M, Higuera-Castro, N, Nana-Sinkam, P, Ghadiali, SN: miR-146a regulates mechanotransduction and pressure-induced inflammation in small airway epithelium. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 26: 3351-3364, 2012.
137. Kawasaki, M, Kuwano, K, Hagimoto, N, Matsuba, T, Kunitake, R, Tanaka, T, Maeyama, T, Hara, N: Protection from lethal apoptosis in lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice by a caspase inhibitor. *The American journal of pathology*, 157: 597-603, 2000.
138. Hehlhans, T, Pfeffer, K: The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*, 115: 1-20, 2005.
139. Nakagawa, H, Komorita, N, Shibata, F, Ikesue, A, Konishi, K, Fujioka, M, Kato, H: Identification of cytokine-induced neutrophil chemoattractants (CINC), rat GRO/CINC-2 alpha and CINC-2 beta, produced by granulation tissue in culture: purification, complete amino acid sequences and characterization. *The Biochemical journal*, 301 (Pt 2): 545-550, 1994.
140. Dijkstra, CD, Döpp, EA, Joling, P, Kraal, G: The heterogeneity of mononuclear phagocytes in lymphoid organs: distinct macrophage subpopulations in the rat recognized by monoclonal antibodies ED1, ED2 and ED3. *Immunology*, 54: 589-599, 1985.
141. Fink, MP: Role of reactive oxygen and nitrogen species in acute respiratory distress syndrome. *Current opinion in critical care*, 8: 6-11, 2002.
142. Orfanos, SE, Mavrommati, I, Korovesi, I, Roussos, C: Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive care medicine*, 30: 1702-1714, 2004.

143. Levy, MM, Fink, MP, Marshall, JC, Abraham, E, Angus, D, Cook, D, Cohen, J, Opal, SM, Vincent, JL, Ramsay, G: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Critical care medicine*, 31: 1250-1256, 2003.
144. Singer, M, Deutschman, CS, Seymour, CW, Shankar-Hari, M, Annane, D, Bauer, M, Bellomo, R, Bernard, GR, Chiche, JD, Coopersmith, CM, Hotchkiss, RS, Levy, MM, Marshall, JC, Martin, GS, Opal, SM, Rubenfeld, GD, van der Poll, T, Vincent, JL, Angus, DC: The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 315: 801-810, 2016.
145. Davey, A, McAuley, DF, O'Kane, CM: Matrix metalloproteinases in acute lung injury: mediators of injury and drivers of repair. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 38: 959-970, 2011.
146. Loffek, S, Schilling, O, Franzke, CW: Series "matrix metalloproteinases in lung health and disease": Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 38: 191-208, 2011.
147. Lee, CT, Fein, AM, Lippmann, M, Holtzman, H, Kimbel, P, Weinbaum, G: Elastolytic activity in pulmonary lavage fluid from patients with adult respiratory-distress syndrome. *N Engl J Med*, 304: 192-196, 1981.
148. Inagawa, R, Okada, H, Takemura, G, Suzuki, K, Takada, C, Yano, H, Ando, Y, Usui, T, Hotta, Y, Miyazaki, N, Tsujimoto, A, Zaikokuji, R, Matsumoto, A, Kawaguchi, T, Doi, T, Yoshida, T, Yoshida, S, Kumada, K, Ushikoshi, H, Toyoda, I, Ogura, S: Ultrastructural Alteration of Pulmonary Capillary Endothelial Glycocalyx During Endotoxemia. *Chest*, 154: 317-325, 2018.
149. Murphy, LS, Wickersham, N, McNeil, JB, Shaver, CM, May, AK, Bastarache, JA, Ware, LB: Endothelial glycocalyx degradation is more severe in patients with non-pulmonary sepsis compared to pulmonary sepsis and associates with risk of ARDS and other organ dysfunction. *Annals of intensive care*, 7: 102, 2017.
150. Elliott, CG, Zimmerman, GA, Orme, JF, Jr., Morris, AH, Mortensen, JD: Granulocyte aggregation in adult respiratory distress syndrome (ARDS)--serial histologic and physiologic observations. *The American journal of the medical sciences*, 289: 70-74, 1985.
151. Willart, MA, Jan de Heer, H, Hammad, H, Soullie, T, Deswarte, K, Clausen, BE, Boon, L, Hoogsteden, HC, Lambrecht, BN: The lung vascular filter as a site of immune induction for T cell responses to large embolic antigen. *The Journal of experimental medicine*, 206: 2823-2835, 2009.
152. Tomashefski, JF, Jr., Davies, P, Boggis, C, Greene, R, Zapol, WM, Reid, LM: The pulmonary vascular lesions of the adult respiratory distress syndrome. *The American journal of pathology*, 112: 112-126, 1983.
153. Kawano, T, Mori, S, Cybulsky, M, Burger, R, Ballin, A, Cutz, E, Bryan, AC: Effect of granulocyte depletion in a ventilated surfactant-depleted lung. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*, 62: 27-33, 1987.
154. Ye, R, Zhao, L, Wang, C, Wu, X, Yan, H: Clinical characteristics of septic pulmonary embolism in adults: a systematic review. *Respiratory medicine*, 108: 1-8, 2014.
155. Hurley, JV: Types of pulmonary microvascular injury. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 384: 269-286, 1982.
156. Myburgh, JA, Mythen, MG: Resuscitation Fluids. *New England Journal of Medicine*, 369: 1243-1251, 2013.

157. Peres e Serra, A, Parra, ER, Eher, E, Capelozzi, VL: Nonhomogeneous immunostaining of hyaline membranes in different manifestations of diffuse alveolar damage. *Clinics*, 61: 497-502, 2006.
158. Marshall, RP, Bellingan, G, Webb, S, Puddicombe, A, Goldsack, N, McAnulty, RJ, Laurent, GJ: Fibroproliferation occurs early in the acute respiratory distress syndrome and impacts on outcome. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 162: 1783-1788, 2000.
159. Quesnel, C, Nardelli, L, Piednoir, P, Lecon, V, Marchal-Somme, J, Lasocki, S, Bouadma, L, Philip, I, Soler, P, Crestani, B, Dehoux, M: Alveolar fibroblasts in acute lung injury: biological behaviour and clinical relevance. *The European respiratory journal : official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology*, 35: 1312-1321, 2010.
160. Quesnel, C, Piednoir, P, Gelly, J, Nardelli, L, Garnier, M, Lecon, V, Lasocki, S, Bouadma, L, Philip, I, Elbim, C, Mentre, F, Soler, P, Crestani, B, Dehoux, M: Alveolar fibrocyte percentage is an independent predictor of poor outcome in patients with acute lung injury. *Crit Care Med*, 2011.
161. Clark, JG, Milberg, JA, Steinberg, KP, Hudson, LD: Type III procollagen peptide in the adult respiratory distress syndrome. Association of increased peptide levels in bronchoalveolar lavage fluid with increased risk for death. *Annals of internal medicine*, 122: 17-23, 1995.
162. Krebs, J, Pelosi, P, Tsagogiorgas, C, Haas, J, Yard, B, Rocco, PR, Luecke, T: Time course of lung inflammatory and fibrogenic responses during protective mechanical ventilation in healthy rats. *Respiratory physiology & neurobiology*, 178: 323-328, 2011.
163. Negri, EM, Hoelz, C, Barbas, CS, Montes, GS, Saldiva, PH, Capelozzi, VL: Acute remodeling of parenchyma in pulmonary and extrapulmonary ARDS. An autopsy study of collagen-elastic system fibers. *Pathology, research and practice*, 198: 355-361, 2002.
164. Idell, S: Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Critical care medicine*, 31: S213-220, 2003.
165. Alberts, B: *Molecular biology of the cell*, New York, Garland Science, 2008.
166. Rocco, PR, Dos Santos, C, Pelosi, P: Lung parenchyma remodeling in acute respiratory distress syndrome. *Minerva anesthesiologica*, 75: 730-740, 2009.
167. Madri, JA, Furthmayr, H: Collagen polymorphism in the lung. An immunochemical study of pulmonary fibrosis. *Human pathology*, 11: 353-366, 1980.
168. Meduri, GU, Tolley, EA, Chinn, A, Stentz, F, Postlethwaite, A: Procollagen types I and III aminoterminal propeptide levels during acute respiratory distress syndrome and in response to methylprednisolone treatment. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 158: 1432-1441, 1998.
169. Hendrickson, CM, Crestani, B, Matthay, MA: Biology and pathology of fibroproliferation following the acute respiratory distress syndrome. *Intensive care medicine*, 41: 147-150, 2015.
170. Bateman, ED, Turner-Warwick, M, Haslam, PL, Adelman-Grill, BC: Cryptogenic fibrosing alveolitis: prediction of fibrogenic activity from immunohistochemical studies of collagen types in lung biopsy specimens. *Thorax*, 38: 93-101, 1983.
171. Forel, JM, Guervilly, C, Hraiech, S, Voillet, F, Thomas, G, Somma, C, Secq, V, Farnarier, C, Payan, MJ, Donati, SY, Perrin, G, Trousse, D, Dizier, S, Chiche, L, Baumstarck, K, Roch, A, Papazian, L: Type III procollagen is a reliable marker of ARDS-associated lung fibroproliferation. *Intensive care medicine*, 41: 1-11, 2015.

172. Kirk, JM, Bateman, ED, Haslam, PL, Laurent, GJ, Turner-Warwick, M: Serum type III procollagen peptide concentration in cryptogenic fibrosing alveolitis and its clinical relevance. *Thorax*, 39: 726-732, 1984.
173. Horslev-Petersen, K: Circulating extracellular matrix components as markers for connective tissue response to inflammation. A clinical and experimental study with special emphasis on serum aminoterminal type III procollagen peptide in rheumatic diseases. *Danish medical bulletin*, 37: 308-329, 1990.
174. Quesnel, C, Piednoir, P, Gelly, J, Nardelli, L, Garnier, M, Lecon, V, Lasocki, S, Bouadma, L, Philip, I, Elbim, C, Mentre, F, Soler, P, Crestani, B, Dehoux, M: Alveolar fibrocyte percentage is an independent predictor of poor outcome in patients with acute lung injury. *Critical care medicine*, 40: 21-28, 2012.
175. Armstrong, L, Thickett, DR, Mansell, JP, Ionescu, M, Hoyle, E, Billingham, RC, Poole, AR, Millar, AB: Changes in collagen turnover in early acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 160: 1910-1915, 1999.
176. Forel, J-M, Guervilly, C, Hraiech, S, Voillet, F, Thomas, G, Somma, C, Secq, V, Farnarier, C, Payan, M-J, Donati, S-Y, Perrin, G, Trousse, D, Dizier, S, Chiche, L, Baumstarck, K, Roch, A, Papazian, L: Type III procollagen is a reliable marker of ARDS-associated lung fibroproliferation. *Intensive care medicine*, 41: 1-11, 2015.
177. Arthur, A, McCall, PJ, Macfie, A, Jolly, L, Kinsella, J, Kirk, A, Shelley, B: Type III procollagen as a biomarker of susceptibility to ARDS? *Intensive care medicine*, 41: 568-569, 2015.
178. de Carvalho, ME, Dolhnikoff, M, Meireles, SI, Reis, LF, Martins, MA, Deheinzelin, D: Effects of overinflation on procollagen type III expression in experimental acute lung injury. *Critical care*, 11: R23, 2007.
179. Hagiwara, S, Iwasaka, H, Matsumoto, S, Noguchi, T, Yoshioka, H: Coexpression of HSP47 gene and type I and type III collagen genes in LPS-induced pulmonary fibrosis in rats. *Lung*, 185: 31-37, 2007.
180. Zhang, R, Pan, Y, Fanelli, V, Wu, S, Luo, AA, Islam, D, Han, B, Mao, P, Ghazarian, M, Zeng, W, Spieth, PM, Wang, D, Khang, J, Mo, H, Liu, X, Uhlig, S, Liu, M, Laffey, J, Slutsky, AS, Li, Y, Zhang, H: Mechanical Stress and the Induction of Lung Fibrosis via the Midkine Signaling Pathway. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 192: 315-323, 2015.
181. Garcia, CS, Rocco, PR, Facchinetti, LD, Lassance, RM, Caruso, P, Deheinzelin, D, Morales, MM, Romero, PV, Faffe, DS, Zin, WA: What increases type III procollagen mRNA levels in lung tissue: stress induced by changes in force or amplitude? *Respiratory physiology & neurobiology*, 144: 59-70, 2004.
182. Cabrera-Benitez, NE, Parotto, M, Post, M, Han, B, Spieth, PM, Cheng, WE, Valladares, F, Villar, J, Liu, M, Sato, M, Zhang, H, Slutsky, AS: Mechanical stress induces lung fibrosis by epithelial-mesenchymal transition. *Critical care medicine*, 40: 510-517, 2012.
183. Bitterman, PB: Pathogenesis of fibrosis in acute lung injury. *The American journal of medicine*, 92: 39s-43s, 1992.
184. Gouda, MM, Shaikh, SB, Bhandary, YP: Inflammatory and Fibrinolytic System in Acute Respiratory Distress Syndrome. *Lung*, 196: 609-616, 2018.
185. Meduri, GU, Eltorky, MA: Understanding ARDS-associated fibroproliferation. *Intensive care medicine*, 41: 517-520, 2015.
186. Kim, KK, Kugler, MC, Wolters, PJ, Robillard, L, Galvez, MG, Brumwell, AN, Sheppard, D, Chapman, HA: Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops *in vivo* during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 13180-13185, 2006.

187. Madtes, DK, Rubenfeld, G, Klima, LD, Milberg, JA, Steinberg, KP, Martin, TR, Raghu, G, Hudson, LD, Clark, JG: Elevated transforming growth factor-alpha levels in bronchoalveolar lavage fluid of patients with acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 158: 424-430, 1998.
188. Kalluri, R, Neilson, EG: Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 112: 1776-1784, 2003.
189. Zuo, F, Kaminski, N, Eugui, E, Allard, J, Yakhini, Z, Ben-Dor, A, Lollini, L, Morris, D, Kim, Y, DeLustro, B, Sheppard, D, Pardo, A, Selman, M, Heller, RA: Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99: 6292-6297, 2002.
190. Phillips, RJ, Burdick, MD, Hong, K, Lutz, MA, Murray, LA, Xue, YY, Belperio, JA, Keane, MP, Strieter, RM: Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 114: 438-446, 2004.
191. Synenki, L, Chandel, NS, Budinger, GR, Donnelly, HK, Topin, J, Eisenbart, J, Jovanovic, B, Jain, M: Bronchoalveolar lavage fluid from patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome induces myofibroblast differentiation. *Critical care medicine*, 35: 842-848, 2007.
192. Vyalov, SL, Gabbiani, G, Kapanci, Y: Rat alveolar myofibroblasts acquire alpha-smooth muscle actin expression during bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The American journal of pathology*, 143: 1754-1765, 1993.
193. Li, H, Du, S, Yang, L, Chen, Y, Huang, W, Zhang, R, Cui, Y, Yang, J, Chen, D, Li, Y, Zhang, S, Zhou, J, Wei, Z, Yao, Z: Rapid pulmonary fibrosis induced by acute lung injury via a lipopolysaccharide three-hit regimen. *Innate immunity*, 15: 143-154, 2009.
194. Brew, N, Hooper, SB, Allison, BJ, Wallace, MJ, Harding, R: Injury and repair in the very immature lung following brief mechanical ventilation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 301: L917-926, 2011.
195. Kotaru, C, Schoonover, KJ, Trudeau, JB, Huynh, ML, Zhou, X, Hu, H, Wenzel, SE: Regional fibroblast heterogeneity in the lung: implications for remodeling. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 173: 1208-1215, 2006.
196. Froese, AR, Shimbori, C, Bellaye, PS, Inman, M, Obex, S, Fatima, S, Jenkins, G, Gauldie, J, Ask, K, Kolb, M: Stretch-induced Activation of Transforming Growth Factor-beta1 in Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 194: 84-96, 2016.
197. Rocco, PR, Souza, AB, Faffe, DS, Passaro, CP, Santos, FB, Negri, EM, Lima, JG, Contador, RS, Capelozzi, VL, Zin, WA: Effect of corticosteroid on lung parenchyma remodeling at an early phase of acute lung injury. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 168: 677-684, 2003.
198. The National Heart, L, Network, BIARDSCT: Efficacy and Safety of Corticosteroids for Persistent Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*, 354: 1671-1684, 2006.
199. Moreno, G, Rodriguez, A, Reyes, LF, Gomez, J, Sole-Violan, J, Diaz, E, Bodi, M, Trefler, S, Guardiola, J, Yebenes, JC, Soriano, A, Garnacho-Montero, J, Socias, L, Del Valle Ortiz, M, Correig, E, Marin-Corral, J, Vallverdu-Vidal, M, Restrepo, MI, Torres, A, Martin-Loeches, I: Corticosteroid treatment in critically ill patients with severe influenza pneumonia: a propensity score matching study. *Intensive care medicine*, 44: 1470-1482, 2018.
200. Macklin M.T., MCC: Malignant interstitial emphysema of the lungs and mediastinum as an important occult complication in many respiratory diseases and other conditions:

- an interpretation of the clinical literature in the light of laboratory experiment. *Medicine*, 23: 281-358, 1944.
201. Gattinoni, L, Protti, A, Caironi, P, Carlesso, E: Ventilator-induced lung injury: the anatomical and physiological framework. *Critical care medicine*, 38: S539-548, 2010.
 202. Kumar, A, Pontoppidan, H, Falke, KJ, Wilson, RS, Laver, MB: Pulmonary barotrauma during mechanical ventilation. *Critical care medicine*, 1: 181-186, 1973.
 203. Amato, MB, Meade, MO, Slutsky, AS, Brochard, L, Costa, EL, Schoenfeld, DA, Stewart, TE, Briel, M, Talmor, D, Mercat, A, Richard, JC, Carvalho, CR, Brower, RG: Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*, 372: 747-755, 2015.
 204. Loring, SH, Malhotra, A: Driving pressure and respiratory mechanics in ARDS. *N Engl J Med*, 372: 776-777, 2015.
 205. Gattinoni, L, Pesenti, A: The concept of "baby lung". *Intensive care medicine*, 31: 776-784, 2005.
 206. Mead, J, Takishima, T, Leith, D: Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J Appl Physiol*, 28: 596-608, 1970.
 207. Halter, JM, Steinberg, JM, Gatto, LA, DiRocco, JD, Pavone, LA, Schiller, HJ, Albert, S, Lee, HM, Carney, D, Nieman, GF: Effect of positive end-expiratory pressure and tidal volume on lung injury induced by alveolar instability. *Critical care*, 11: R20, 2007.
 208. Duggan, M, Kavanagh, BP: Pulmonary atelectasis: a pathogenic perioperative entity. *Anesthesiology*, 102: 838-854, 2005.
 209. Webb, HH, Tierney, DF: Experimental pulmonary edema due to intermittent positive pressure ventilation with high inflation pressures. Protection by positive end-expiratory pressure. *Am Rev Respir Dis*, 110: 556-565, 1974.
 210. Grasso, S, Stripoli, T, De Michele, M, Bruno, F, Moschetta, M, Angelelli, G, Munno, I, Ruggiero, V, Anaclerio, R, Cafarelli, A, Driessen, B, Fiore, T: ARDSnet ventilatory protocol and alveolar hyperinflation: role of positive end-expiratory pressure. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 176: 761-767, 2007.
 211. Matthay, MA, Zimmerman, GA: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 33: 319-327, 2005.
 212. Gattinoni, L, Tonetti, T, Cressoni, M, Cadringer, P, Herrmann, P, Moerer, O, Protti, A, Gotti, M, Chiurazzi, C, Carlesso, E, Chiumello, D, Quintel, M: Ventilator-related causes of lung injury: the mechanical power. *Intensive care medicine*, 42: 1567-1575, 2016.
 213. Tonetti, T, Vasques, F, Rapetti, F, Maiolo, G, Collino, F, Romitti, F, Camporota, L, Cressoni, M, Cadringer, P, Quintel, M, Gattinoni, L: Driving pressure and mechanical power: new targets for VILI prevention. *Annals of translational medicine*, 5: 286, 2017.
 214. Huhle, R, Serpa Neto, A, Schultz, MJ, Gama de Abreu, M: Is mechanical power the final word on ventilator-induced lung injury?-no. *Annals of translational medicine*, 6: 394, 2018.
 215. Ichikado, K, Muranaka, H, Gushima, Y, Kotani, T, Nader, HM, Fujimoto, K, Johkoh, T, Iwamoto, N, Kawamura, K, Nagano, J, Fukuda, K, Hirata, N, Yoshinaga, T, Ichiyasu, H, Tsumura, S, Kohroggi, H, Kawaguchi, A, Yoshioka, M, Sakuma, T, Suga, M: Fibroproliferative changes on high-resolution CT in the acute respiratory distress syndrome predict mortality and ventilator dependency: a prospective observational cohort study. *BMJ open*, 2: e000545, 2012.
 216. Marchioni, A, Tonelli, R, Ball, L, Fantini, R, Castaniere, I, Cerri, S, Luppi, F, Malerba, M, Pelosi, P, Clini, E: Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: lessons learned from acute respiratory distress syndrome? *Critical care*, 22: 80, 2018.

217. Lachmann, B: Open up the lung and keep the lung open. *Intensive care medicine*, 18: 319-321, 1992.
218. Guerin, C, Debord, S, Leray, V, Delannoy, B, Bayle, F, Bourdin, G, Richard, JC: Efficacy and safety of recruitment maneuvers in acute respiratory distress syndrome. *Annals of intensive care*, 1: 9, 2011.
219. Talmor, D, Sarge, T, O'Donnell, CR, Ritz, R, Malhotra, A, Lisbon, A, Loring, SH: Esophageal and transpulmonary pressures in acute respiratory failure. *Critical care medicine*, 34: 1389-1394, 2006.
220. Talmor, D, Sarge, T, Malhotra, A, O'Donnell, CR, Ritz, R, Lisbon, A, Novack, V, Loring, SH: Mechanical ventilation guided by esophageal pressure in acute lung injury. *N Engl J Med*, 359: 2095-2104. doi: 2010.1056/NEJMoa0708638. Epub 0702008 Nov 0708611., 2008.
221. Akoumianaki, E, Maggiore, SM, Valenza, F, Bellani, G, Jubran, A, Loring, SH, Pelosi, P, Talmor, D, Grasso, S, Chiumello, D, Guerin, C, Patroniti, N, Ranieri, VM, Gattinoni, L, Nava, S, Terragni, PP, Pesenti, A, Tobin, M, Mancebo, J, Brochard, L: The application of esophageal pressure measurement in patients with respiratory failure. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 189: 520-531, 2014.
222. Milic-Emili, J, Mead, J, Turner, JM, Glauser, EM: Improved technique for estimating pleural pressure from esophageal balloons. *Journal of Applied Physiology*, 19: 207-211, 1964.
223. Asher, MI, Coates, AL, Collinge, JM, Milic-Emili, J: Measurement of pleural pressure in neonates. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology*, 52: 491-494, 1982.
224. Krebs, J, Pelosi, P, Rocco, PRM, Hagmann, M, Luecke, T: Positive end-expiratory pressure titrated according to respiratory system mechanics or to ARDSNetwork table did not guarantee positive end-expiratory transpulmonary pressure in acute respiratory distress syndrome. *Journal of critical care*, 48: 433-442, 2018.
225. Spieth, PM, Guldner, A, Carvalho, AR, Kasper, M, Pelosi, P, Uhlig, S, Koch, T, Gama de Abreu, M: Open lung approach vs acute respiratory distress syndrome network ventilation in experimental acute lung injury. *British journal of anaesthesia*, 107: 388-397, 2011.
226. Hickling, KG: Best compliance during a decremental, but not incremental, positive end-expiratory pressure trial is related to open-lung positive end-expiratory pressure: a mathematical model of acute respiratory distress syndrome lungs. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 163: 69-78, 2001.
227. Gernoth, C, Wagner, G, Pelosi, P, Luecke, T: Respiratory and haemodynamic changes during decremental open lung positive end-expiratory pressure titration in patients with acute respiratory distress syndrome. *Critical care*, 13: R59, 2009.
228. Retamal, J, Bugedo, G, Larsson, A, Bruhn, A: High PEEP levels are associated with overdistension and tidal recruitment/derecruitment in ARDS patients. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*, 59: 1161-1169, 2015.
229. Terragni, PP, Rosboch, G, Tealdi, A, Corno, E, Menaldo, E, Davini, O, Gandini, G, Herrmann, P, Mascia, L, Quintel, M, Slutsky, AS, Gattinoni, L, Ranieri, VM: Tidal hyperinflation during low tidal volume ventilation in acute respiratory distress syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 175: 160-166, 2007.
230. Guérin, C, Papazian, L, Reignier, J, Ayzac, L, Loundou, A, Forel, JM: Effect of driving pressure on mortality in ARDS patients during lung protective mechanical ventilation in two randomized controlled trials. *Critical care*, 20: 384, 2016.

231. Cavalcanti, AB, Suzumura, EA, Laranjeira, LN, Paisani, DM, Damiani, LP, Guimaraes, HP, Romano, ER, Regenga, MM, Taniguchi, LNT, Teixeira, C, Pinheiro de Oliveira, R, Machado, FR, Diaz-Quijano, FA, Filho, MSA, Maia, IS, Caser, EB, Filho, WO, Borges, MC, Martins, PA, Matsui, M, Ospina-Tascon, GA, Giancursi, TS, Giraldo-Ramirez, ND, Vieira, SRR, Assef, M, Hasan, MS, Szczeklik, W, Rios, F, Amato, MBP, Berwanger, O, Ribeiro de Carvalho, CR: Effect of Lung Recruitment and Titrated Positive End-Expiratory Pressure (PEEP) vs Low PEEP on Mortality in Patients With Acute Respiratory Distress Syndrome: A Randomized Clinical Trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 318: 1335-1345, 2017.
232. Cavalcanti, AB, Amato, MBP, de Carvalho, CRR: Should the ART trial change our practice? *Journal of thoracic disease*, 10: E224-e226, 2018.
233. Villar, J, Suárez-Sipmann, F, Kacmarek, RM: Should the ART trial change our practice? *Journal of thoracic disease*, 9: 4871-4877, 2017.
234. Hodgson, CL, Cooper, DJ, Arabi, Y, King, V, Bersten, A, Bihari, S, Brickell, K, Davies, A, Fahey, C, Fraser, J, McGuinness, S, Murray, L, Parke, R, Paul, E, Tuxen, D, Vallance, S, Young, M, Nichol, A: Maximal Recruitment Open Lung Ventilation in Acute Respiratory Distress Syndrome (PHARLAP). A Phase II, Multicenter Randomized Controlled Clinical Trial. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 200: 1363-1372, 2019.
235. Hodgson, C, Goligher, EC, Young, ME, Keating, JL, Holland, AE, Romero, L, Bradley, SJ, Tuxen, D: Recruitment manoeuvres for adults with acute respiratory distress syndrome receiving mechanical ventilation. *Cochrane database of systematic reviews*, 11: Cd006667, 2016.
236. Beck-Schimmer, B, Schimmer, RC: Perioperative tidal volume and intra-operative open lung strategy in healthy lungs: where are we going? *Best practice & research Clinical anaesthesiology*, 24: 199-210, 2010.
237. Serpa Neto, A, Hemmes, SN, Barbas, CS, Beiderlinden, M, Biehl, M, Binnekade, JM, Canet, J, Fernandez-Bustamante, A, Futier, E, Gajic, O, Hedenstierna, G, Hollmann, MW, Jaber, S, Kozian, A, Licker, M, Lin, WQ, Maslow, AD, Memtsoudis, SG, Reis Miranda, D, Moine, P, Ng, T, Paparella, D, Putensen, C, Ranieri, M, Scavonetto, F, Schilling, T, Schmid, W, Selmo, G, Severgnini, P, Sprung, J, Sundar, S, Talmor, D, Treschan, T, Unzueta, C, Weingarten, TN, Wolthuis, EK, Wrigge, H, Gama de Abreu, M, Pelosi, P, Schultz, MJ: Protective versus Conventional Ventilation for Surgery: A Systematic Review and Individual Patient Data Meta-analysis. *Anesthesiology*, 123: 66-78, 2015.
238. Krebs, J, Kolz, A, Tsagogiorgas, C, Pelosi, P, Rocco, PR, Luecke, T: Effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on initial lung fibrosis during open-lung mechanical ventilation in rats. *Respiratory physiology & neurobiology*, 212-214: 25-32, 2015.
239. Gesellschaft für Versuchstierkunde: Tiergerechte Haltung von Laborratten. *GV SOLAS*, 2004.
240. Gesellschaft für Versuchstierkunde, AfA: Operative Eingriffe bei Versuchstieren. *GV SOLAS*, 2001.
241. Gesellschaft für Versuchstierkunde, TVfT, Ausschuss für Anaesthesie, AuS: Empfehlung Schmerztherapie bei Versuchstieren. *GV-SOLAS*, 2010.
242. Matute-Bello, G, Frevert, CW, Martin, TR: Animal models of acute lung injury. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 295: L379-399, 2008.
243. Moore, BB, Lawson, WE, Oury, TD, Sisson, TH, Raghavendran, K, Hogaboam, CM: Animal models of fibrotic lung disease. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 49: 167-179, 2013.

244. Nishida, T, Suchodolski, K, Schettino, GP, Sedeek, K, Takeuch, M, Kacmarek, RM: Peak volume history and peak pressure-volume curve pressures independently affect the shape of the pressure-volume curve of the respiratory system. *Critical care medicine*, 32: 1358-1364, 2004.
245. Farias, LL, Faffe, DS, Xisto, DG, Santana, MC, Lassance, R, Prota, LF, Amato, MB, Morales, MM, Zin, WA, Rocco, PR: Positive end-expiratory pressure prevents lung mechanical stress caused by recruitment/derecruitment. *J Appl Physiol*, 98: 53-61, 2005.
246. Murakami, K, Bjertnaes, LJ, Schmalstieg, FC, McGuire, R, Cox, RA, Hawkins, HK, Herndon, DN, Traber, LD, Traber, DL: A novel animal model of sepsis after acute lung injury in sheep. *Critical care medicine*, 30: 2083-2090, 2002.
247. Heggeness, MH, Ash, JF: Use of the avidin-biotin complex for the localization of actin and myosin with fluorescence microscopy. *J Cell Biol*, 73: 783-788, 1977.
248. Au - Young, K, Au - Morrison, H: Quantifying Microglia Morphology from Photomicrographs of Immunohistochemistry Prepared Tissue Using ImageJ. *JoVE*: e57648, 2018.
249. Chomczynski, P, Sacchi, N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162: 156-159, 1987.
250. Schmittgen, TD, Livak, KJ: Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nature protocols*, 3: 1101-1108, 2008.
251. Livak, KJ, Schmittgen, TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*, 25: 402-408, 2001.
252. Ware, LB, Koyama, T, Billheimer, DD, Wu, W, Bernard, GR, Thompson, BT, Brower, RG, Standiford, TJ, Martin, TR, Matthay, MA: Prognostic and pathogenetic value of combining clinical and biochemical indices in patients with acute lung injury. *Chest*, 137: 288-296, 2010.
253. Menezes, SL, Bozza, PT, Neto, HC, Laranjeira, AP, Negri, EM, Capelozzi, VL, Zin, WA, Rocco, PR: Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md : 1985)*, 98: 1777-1783, 2005.
254. Menezes, SLS, Bozza, PT, Neto, HCCF, Laranjeira, AP, Negri, EM, Capelozzi, VL, Zin, WA, Rocco, PRM: Pulmonary and extrapulmonary acute lung injury: inflammatory and ultrastructural analyses. *Journal of Applied Physiology*, 98: 1777-1783, 2005.
255. Bellomo, R, Goldsmith, D, Uchino, S, Buckmaster, J, Hart, GK, Opdam, H, Silvester, W, Doolan, L, Gutteridge, G: A prospective before-and-after trial of a medical emergency team. *The Medical journal of Australia*, 179: 283-287, 2003.
256. Smith, PD, Suffredini, AF, Allen, JB, Wahl, LM, Parrillo, JE, Wahl, SM: Endotoxin administration to humans primes alveolar macrophages for increased production of inflammatory mediators. *Journal of clinical immunology*, 14: 141-148, 1994.
257. Wang, HM, Bodenstern, M, Markstaller, K: Overview of the pathology of three widely used animal models of acute lung injury. *European surgical research Europaische chirurgische Forschung Recherches chirurgicales europeennes*, 40: 305-316, 2008.
258. Keshari, RS, Silasi-Mansat, R, Zhu, H, Popescu, NI, Peer, G, Chaaban, H, Lambris, JD, Polf, H, Lupu, C, Kinasewitz, G, Lupu, F: Acute lung injury and fibrosis in a baboon model of Escherichia coli sepsis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 50: 439-450, 2014.
259. Silva, PL, Cruz, FF, Fujisaki, LC, Oliveira, GP, Samary, CS, Ornellas, DS, Maron-Gutierrez, T, Rocha, NN, Goldenberg, R, Garcia, CS, Morales, MM, Capelozzi, VL, Gama de Abreu, M, Pelosi, P, Rocco, PR: Hypervolemia induces and potentiates lung damage after

- recruitment maneuver in a model of sepsis-induced acute lung injury. *Critical care*, 14: R114, 2010.
260. Villar, J, Cabrera-Benitez, NE, Ramos-Nuez, A, Flores, C, Garcia-Hernandez, S, Valladares, F, Lopez-Aguilar, J, Blanch, L, Slutsky, AS: Early activation of pro-fibrotic WNT5A in sepsis-induced acute lung injury. *Critical care*, 18: 568, 2014.
261. Vedder, H, Schreiber, W, Yassouridis, A, Gudewill, S, Galanos, C, Pollmächer, T: Dose-dependence of bacterial lipopolysaccharide (LPS) effects on peak response and time course of the immune-endocrine host response in humans. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society [et al]*, 48: 67-74, 1999.
262. Krebs, J, Hillenbrand, A, Tsagogiorgas, C, Patry, C, Tonshoff, B, Yard, B, Beck, G, Rafat, N: Intravenous delivery of granulocyte-macrophage colony stimulating factor impairs survival in lipopolysaccharide-induced sepsis. *PloS one*, 14: e0218602, 2019.
263. Sigma-Aldrich, I: Lipopolysaccharides from Escherichia coli 055:B5 Product Number: L2880. *Product Description*, 2012.
264. Vanhaecke, E, Pijck, J, Vuye, A: Endotoxin testing. *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*, 12: 223-235, 1987.
265. Jansson, A-H, Eriksson, C, Wang, X: Lung Inflammatory Responses and Hyperinflation Induced by an Intratracheal Exposure to Lipopolysaccharide in Rats. *Lung*, 182, 2004.
266. Fodor, R, Georgescu, AM, Cioc, AD, Grigorescu, BL, Cotoi, OS, Fodor, P, Copotoiu, SM, Azamfirei, L: Time- and dose-dependent severity of lung injury in a rat model of sepsis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 56: 1329-1337, 2015.
267. Wiener-Kronish, JP, Albertine, KH, Matthay, MA: Differential responses of the endothelial and epithelial barriers of the lung in sheep to Escherichia coli endotoxin. *The Journal of clinical investigation*, 88: 864-875, 1991.
268. Karow, T, Lang-Roth, R: *Pharmakologie und Toxikologie*, 2017.
269. Krebs, J, Tsagogiorgas, C, Pelosi, P, Rocco, PR, Hottenrott, M, Sticht, C, Yard, B, Luecke, T: Open lung approach with low tidal volume mechanical ventilation attenuates lung injury in rats with massive brain damage. *Critical care*, 18: R59, 2014.
270. Pelosi, P, Goldner, M, McKibben, A, Adams, A, Eccher, G, Caironi, P, Losappio, S, Gattinoni, L, Marini, JJ: Recruitment and derecruitment during acute respiratory failure: an experimental study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 164: 122-130, 2001.
271. Griffiths, MJD, McAuley, DF, Perkins, GD, Barrett, N, Blackwood, B, Boyle, A, Chee, N, Connolly, B, Dark, P, Finney, S, Salam, A, Silversides, J, Tarmey, N, Wise, MP, Baudouin, SV: Guidelines on the management of acute respiratory distress syndrome. *BMJ Open Respiratory Research*, 6: e000420, 2019.
272. Müller, K: *Heimtierskills. Praxisleitfaden zu Diagnose und Therapie bei kleinen Heimtieren*. , Stuttgart, Schattauer, 2017.
273. Frey, S, Pocivavsek, L, Waring, A, Walther, F, Hernandez-Juviel, J, Ruchala, P, Lee, KY: Functional importance of the NH₂-terminal insertion sequence of lung surfactant protein B. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 298: L335-347, 2009.
274. Dellinger, RP, Schorr, CA, Levy, MM: A users' guide to the 2016 Surviving Sepsis Guidelines. *Intensive care medicine*, 43: 299-303, 2017.
275. Maitland, K, Kiguli, S, Opoka, RO, Engoru, C, Olupot-Olupot, P, Akech, SO, Nyeko, R, Mtove, G, Reyburn, H, Lang, T, Brent, B, Evans, JA, Tibenderana, JK, Crawley, J, Russell, EC, Levin, M, Babiker, AG, Gibb, DM: Mortality after fluid bolus in African children with severe infection. *N Engl J Med*, 364: 2483-2495, 2011.

276. Ashcroft, T, Simpson, JM, Timbrell, V: Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *Journal of clinical pathology*, 41: 467-470, 1988.
277. Riva, DR, Oliveira, MB, Rzezinski, AF, Rangel, G, Capelozzi, VL, Zin, WA, Morales, MM, Pelosi, P, Rocco, PR: Recruitment maneuver in pulmonary and extrapulmonary experimental acute lung injury. *Critical care medicine*, 36: 1900-1908, 2008.
278. Gattinoni, L, Carlesso, E, Taccone, P, Polli, F, Guérin, C, Mancebo, J: Prone positioning improves survival in severe ARDS: a pathophysiologic review and individual patient meta-analysis. *Minerva anesthesiologica*, 76: 448-454, 2010.
279. Gattinoni, L, Tognoni, G, Pesenti, A, Taccone, P, Mascheroni, D, Labarta, V, Malacrida, R, Di Giulio, P, Fumagalli, R, Pelosi, P, Brazzi, L, Latini, R: Effect of prone positioning on the survival of patients with acute respiratory failure. *N Engl J Med*, 345: 568-573, 2001.
280. Sandbo, N, Taurin, S, Yau, DM, Kregel, S, Mitchell, R, Dulin, NO: Downregulation of smooth muscle alpha-actin expression by bacterial lipopolysaccharide. *Cardiovascular research*, 74: 262-269, 2007.
281. Li, H, Yuan, X, Tang, J, Zhang, Y: Lipopolysaccharide disrupts the directional persistence of alveolar myofibroblast migration through EGF receptor. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*, 302: L569-579, 2012.
282. Hagiwara, S, Iwasaka, H, Matsumoto, S, Noguchi, T: Introduction of antisense oligonucleotides to heat shock protein 47 prevents pulmonary fibrosis in lipopolysaccharide-induced pneumopathy of the rat. *European journal of pharmacology*, 564: 174-180, 2007.
283. Pelosi, P, Negrini, D: Extracellular matrix and mechanical ventilation in healthy lungs: back to baro/volotrauma? *Current opinion in critical care*, 14: 16-21, 2008.
284. Silva, PL, Moraes, L, Santos, RS, Samary, C, Ramos, MB, Santos, CL, Morales, MM, Capelozzi, VL, Garcia, CS, de Abreu, MG, Pelosi, P, Marini, JJ, Rocco, PR: Recruitment maneuvers modulate epithelial and endothelial cell response according to acute lung injury etiology. *Critical care medicine*, 41: e256-265, 2013.
285. Berg, JT, Fu, Z, Breen, EC, Tran, HC, Mathieu-Costello, O, West, JB: High lung inflation increases mRNA levels of ECM components and growth factors in lung parenchyma. *J Appl Physiol*, 83: 120-128, 1997.
286. Aimes, RT, Quigley, JP: Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *The Journal of biological chemistry*, 270: 5872-5876, 1995.
287. Pugin, J, Verghese, G, Widmer, MC, Matthay, MA: The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Critical care medicine*, 27: 304-312, 1999.
288. Moschos, SA, Williams, AE, Perry, MM, Birrell, MA, Belvisi, MG, Lindsay, MA: Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids. *BMC genomics*, 8: 240, 2007.
289. Nardelli, LM, Rzezinski, A, Silva, JD, Maron-Gutierrez, T, Ornellas, DS, Henriques, I, Capelozzi, VL, Teodoro, W, Morales, MM, Silva, PL, Pelosi, P, Garcia, CS, Rocco, PR: Effects of acute hypercapnia with and without acidosis on lung inflammation and apoptosis in experimental acute lung injury. *Respiratory physiology & neurobiology*, 205: 1-6, 2015.
290. Sweeney, TE, Lofgren, S, Khatri, P, Rogers, AJ: Gene Expression Analysis to Assess the Relevance of Rodent Models to Human Lung Injury. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 57: 184-192, 2017.

291. Villar, J, Zhang, H, Slutsky, AS: Lung Repair and Regeneration in ARDS: Role of PECAM1 and Wnt Signaling. *Chest*, 155: 587-594, 2019.
292. de Souza Xavier Costa, N, Ribeiro Júnior, G, Dos Santos Alemany, AA, Belotti, L, Zati, DH, Frota Cavalcante, M, Matera Veras, M, Ribeiro, S, Kallás, EG, Nascimento Saldiva, PH, Dolhnikoff, M, Ferraz da Silva, LF: Early and late pulmonary effects of nebulized LPS in mice: An acute lung injury model. *PloS one*, 12: e0185474, 2017.
293. Domscheit, H, Hegeman, MA, Carvalho, N, Spieth, PM: Molecular Dynamics of Lipopolysaccharide-Induced Lung Injury in Rodents. *Frontiers in physiology*, 11: 36, 2020.
294. He, Z, Zhu, Y, Jiang, H: Inhibiting toll-like receptor 4 signaling ameliorates pulmonary fibrosis during acute lung injury induced by lipopolysaccharide: an experimental study. *Respiratory research*, 10: 126, 2009.
295. Waydhas, C, Nast-Kolb, D, Trupka, A, Lenk, S, Duswald, KH, Schweiberer, L, Jochum, M: Increased serum concentrations of procollagen type III peptide in severely injured patients: an indicator of fibrosing activity? *Critical care medicine*, 21: 240-247, 1993.
296. Caruso, P, Meireles, SI, Reis, LF, Mauad, T, Martins, MA, Deheinzelin, D: Low tidal volume ventilation induces proinflammatory and profibrogenic response in lungs of rats. *Intensive care medicine*, 29: 1808-1811, 2003.
297. Saddy, F, Oliveira, GP, Garcia, CS, Nardelli, LM, Rzezinski, AF, Ornellas, DS, Morales, MM, Capelozzi, VL, Pelosi, P, Rocco, PR: Assisted ventilation modes reduce the expression of lung inflammatory and fibrogenic mediators in a model of mild acute lung injury. *Intensive care medicine*, 36: 1417-1426, 2010.
298. He, Z, Zhu, Y, Jiang, H: Toll-like receptor 4 mediates lipopolysaccharide-induced collagen secretion by phosphoinositide3-kinase-Akt pathway in fibroblasts during acute lung injury. *Journal of receptor and signal transduction research*, 29: 119-125, 2009.
299. Tai, W, Xu, Y, Ding, J, Wu, H, Du, M, Qu, X, Gao, L, Li, J, Dong, Z: Fibrocytes Ameliorate Acute Lung Injury by Decreasing Inflammatory Cytokine and Chemokine Levels and Reducing Neutrophil Accumulation in the Lung. *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 44: 1526-1536, 2017.
300. Martin, TR, Nakamura, M, Matute-Bello, G: The role of apoptosis in acute lung injury. *Critical care medicine*, 31: S184-188, 2003.

Eigene Veröffentlichung

Krebs, J, Kolz, A, Tsagogiorgas, C, Pelosi, P, Rocco, PRM, Luecke, T:

Effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on initial lung fibrosis during open-lung mechanical ventilation in rats.

Respiratory physiology & neurobiology, 212–214: 25-32, 2015.

7 TABELLARISCHER ANHANG

7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Pulmonale Alveolarmakrophagen in der gesunden, beatmeten Ratte.	8
Abbildung 2 Pulmonale Inflammation mit Leukozyten Aggregation unter LPS-Sepsis in der Ratte.	8
Abbildung 3: Intravaskuläre Leukozytenaggregation und endotheliale Destruktion mit perivasalen Ödemen in der Rattenlunge im ARDS.	9
Abbildung 4: Angiographie eines Lungenschnitt mit Mikroembolien bei ARDS.	9
Abbildung 5: Pulmonale α -SMA positive Zellen in der gesunden Ratte.....	11
Abbildung 6: Alveole (A) nach ARDS mit Kapillare (C) und geschädigter Basalmembrane (BM).....	11
Abbildung 7: Negative Korrelation zwischen relativer Expression von Interleukin-6 und Prokollagen-III.	16
Abbildung 8: Gruppeneinteilung und Versuchsablauf	18
Abbildung 9: Zeitleiste des experimentellen Ablaufes	21
Abbildung 10: Ablauf des Decremental PEEP-Trial	23
Abbildung 11: Schnittebenen A-D des linken Lungenflügels und Übersicht des histologischen Präparats (HE-Färbung)	28
Abbildung 12: Originalbild, alveolares Parenchym α -SM1 IHC, 200-fach	32
Abbildung 13: Grünfilter.....	32
Abbildung 14: DEC Filter	32
Abbildung 15: Messung der α -SM1 + Fläche (grün).....	32
Abbildung 16: Messung des Air Space (grün)	32
Abbildung 17: Formel zur Berechnung des korrigierten α -SM1 Anteils	32
Abbildung 18: Verlauf der pulmonalen Compliance über die Zeit	40
Abbildung 19: Verlauf des Horovitz-Quotienten über die Zeit.....	40
Abbildung 20: Mittelwerte des Atelektasen-Score; nach pulmonaler Lokalisation und Gruppe	46
Abbildung 21: Schematische Darstellung der in vivo-Lage der linken Lunge während der Beatmung in Rückenlage.	46

Abbildung 22: Mittelwerte des Emphysem-Scores nach pulmonaler Lokalisation und Gruppe	47
Abbildung 23: Emphysem-Score nach pulmonaler Lokalisation.....	47
Abbildung 24: Prozentualer Anteil des α -SMA-positiven Lungenparenchyms.....	48
Abbildung 25: Anteil des α -SMA positiven Lungengewebes nach pulmonaler Lokalisation und Gruppe	49
Abbildung 26: mRNA-Expression des Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) im Lungengewebe	50
Abbildung 27: mRNA-Expression von Interleukin 1 β im Lungengewebe	51
Abbildung 28: mRNA-Expression von Interleukin 6 im Lungengewebe	51
Abbildung 29: mRNA-Expression des Zytokin-induzierten neutrophil chemoattractant 1 (CINC-1) im Lungengewebe.....	52
Abbildung 30: mRNA-Expression von Prokollagen I (PC I) im Lungengewebe	53
Abbildung 31: mRNA-Expression von Prokollagen III (PC III) im Lungengewebe.....	54

7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Berlin-Definition des ARDS (Tabelle modifiziert nach ⁶⁶)	4
Tabelle 2: Ätiopathogenese des ARDS erweitert und modifiziert nach ^{80, 81, 114} (KOF = Körperoberfläche)	6
Tabelle 3: Gemessene Beatmungsparameter.....	23
Tabelle 4: Errechnete Beatmungsparameter	24
Tabelle 5: Hämodynamische Parameter	25
Tabelle 6: Arterielle Blutgasparameter	25
Tabelle 7: Scoring System zur Auswertung der histopathologischen Veränderungen	29
Tabelle 8 : Beatmungsparameter.....	39
Tabelle 9: Hämodynamische Parameter	42
Tabelle 10: Blutgasanalysen.....	43
Tabelle 11: Zytokinkonzentrationen im Plasma	44
Tabelle 12: Histologische Lungenschädigungsindices	45
Tabelle 13: LPS-dosisabhängige Effekte auf IL-6 im Vergleich verschiedener Studien ^{29, 238, 262}	57

7.3 Apparate und Material

Neonatal-Beatmungsgerät Babylog 8000 Softwareversion 4.02	Drägerwerk AG, Lübeck
3 x Perfusor segura FT	B.Braun Melsungen AG
1 x Perfusor segura	B.Braun Melsungen AG
Heizplatte Thermostat 37°C gesteuert	Medax Nagel KG, Kiel
Stereomikroskop Wild M 650 (6-40x)	Wild, Heerburgg, Schweiz
Druckwandler-Set, PMSET 1DT-XX	Becton Dickinson, Critical Care Systems Pte Ltd, Singapore
Physiologisches Messsystem Sonderanfertigung	Institut MABEL IS Med. Fachhochschule Mannheim
Blutgasanalysegerät Cobas b 121	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Isofluan Verdampfer Eickenmeyer TEC3 mit Flowmeter 0-4,4 l/min	Eickenmeyer Medizintechnik für Tierärzte KG, Tuttlingen
Plexiglasbox zur Inhalationsnarkose	Provet, Lyssach, Schweiz
Waage Satorius universal	Sartorius GmbH, Göttingen
Zentrifuge MSE Micro Centaur	Sanyo MSE, Made in UK
Schermaschine Aesculap Favorita II	Aesculap Suhl GmbH, Suhl
Chirurgische Instrumente	Diener, Tuttlingen Fine Science Tools GmbH, Heidelberg Aesculap AG, Tuttlingen
Dumont Pinzetten	Manufactures d'Outils Dumont S.A., CH-2924 Montignez Schweiz
Eppendorf Pipetten: Research plus 2,5; 10; 50; 100; 200; 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Centrifuge 5418R	Eppendorf AG, Hamburg
Mikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss AG, Göttingen
BX51-Mikroskop	Olympus Corporation, Tokyo, Japan

Color-View2 Digitalkamera	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Leica TP1020 - Automatic Tissue Processor	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar
Rotationsmikrotom LeikRM 2165	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar
Homogenisator Ultra Turrax T25 [®] ,	Jauke und Kunkel IKA-Labortechnik
Microplate reader Infinite [®] M 200 PRO	Tecan Group Ltd.
Infinite [®] 200 PRO NanoQuant	CH-8708 Männedorf
peqSTAR 2X Thermocycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH D-91052 Erlangen
7900HT Fast Real-Time PCR System	Life Technologies GmbH D-64293 Darmstadt

7.4 Software

MED IS	Institut MABEL Fachhochschule Mannheim
Sigma Plot Version 11.0	Systat Software GmbH, 40699 Erkrath
SAS Version 9.4	SAS Institute Inc. Cary, NC, USA
Excel, Word	Microsoft, USA
Office Professional 2010	
Cell ^F Multi-fluorescence + Imaging Software	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Application: Tecan i-control V_2.12_04/10_InfiniTe (Apr 26 2010/11.30.08)	Tecan Group Ltd. CH-8708 Männedorf

7.5 Pharmaka und Chemikalien

Lipopolysaccharide aus E.coli Serotype O55:B5 Best.Nr.: L2880 Charge: 032M4082V	Sigma Louis, Missouri 63103 USA
Deltajonin-Infusionslösung	AlleMan Pharma GmbH, Rimbach
Isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg
Forene® (Isofluran 100% V/V)	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Ketamin 10% Veterinär (100 mg/ml Ketamin Razemat)	Bela-Pharm, D-49377 Vechta
TEMGESIC® Ampullen Injektionslösung (0,3 mg/ml Buprenorphin)	RB Pharmaceuticals - RB Pharmaceuticals Ltd., Berkshire, (UK)
Arterenol (Noradrenalin 1 mg/ml)	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt am Main
Heparin-Natrium (5.000 i.E./ml)	Ratiopharm GmbH, 89079 Ulm
Bepanthen® Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, D-51368 Leverkusen
Scandicain® 2%	AstraZeneca GmbH, 22876 Wedel
Softasept® N	B.Braun Melsungen AG, D-34209 Melsungen
TRizol® Reagenz	Life Technologies GmbH D-64293 Darmstadt
DNAase free Water	Life Technologies GmbH D-64293 Darmstadt
Diethyldicarbonat (DEPC)	Sigma Louis, Missouri 63103 USA
Ethanol p.a	Carl Roth GmbH + Co. KG 76185 Karlsruhe
Hämatoxylin Gills Formula	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA94010, USA
Eosin	Carl Roth GmbH + Co. KG 76185 Karlsruhe
Ethanol 96%	Carl Roth GmbH + Co. KG

	76185 Karlsruhe
Formalin	Carl Roth GmbH + Co. KG 76185 Karlsruhe
Xylol	Carl Roth GmbH + Co. KG 76185 Karlsruhe
Paraffin	Carl Roth GmbH + Co. KG 76185 Karlsruhe
TBS Tris buffered saline	Bio-Rad Laboratoris, Inc. USA
Avidin / Biotin blocking Kit	Vector Laboratories, Inc. Burlingame,
Vectastin ABC-Kit	Vector Laboratories, Inc. Burlingame,
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, Inc. Burlingame,

7.6 Antikörper und Primer, Testkits

α -Actin (alpha-SM1) sc-130617	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, Texas 75220 USA
Biotinylated-Ig Horse Anti-Mouse	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA
Quantikine® ELISA Testkit <ul style="list-style-type: none"> - Rat CXCL1 / CINC-1 - Rat TNF-α - Rat IL-6 - Rat IL-1β / IL-1F2 	R&D Systems Ltd., Abingdon, UK
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor	Applied Biosystems Inc. Life Technologies GmbH Darmstadt

Primer	TaqMan® Gene Expression Assay	Entrez Gene ID	Uni-Gene	NCBI Location Chromosome:
β-Actin (Rat Actb)	Rn00667869_m1	81822	Rn.94978	Chr.12: 12047070 - 12050040
CINC-1 (Rat Cxcl1)	Rn00578225_m1	81503	Rn.10907	Chr.14: 18690339 - 18692118
Col1a1 (Rat COL I)	Rn01463848_m1	29393	Rn.2953	Chr.10: 83622438 - 83639368
Col3a1 (Rat COL III)	Rn01437681_m1	84032	Rn.3247	Chr.9: 44281582 - 44317831
IL1β (Rat Il1b)	Rn00676330_m1	24494	Rn.9869	Chr.3: 116964422 - 116970867
IL6 (Rat Il6)	Rn99999011_m1	24498	Rn.9873	Chr.4: 456799 - 461376
TNFα (Rat Tnf)	Rn99999017_m1	24835	Rn.2275	Chr.20: 3661000 - 3663618

Alle Primer wurden von Life Technologies GmbH, D-64293 Darmstadt bezogen

7.7 Verbrauchsmaterial

Einmal-Spritzen 1,2,5,10ml	Becton Dickinson S.A., Madrid Spain
Einmal-Kanülen 18G (gelb), 0,9 x 40 mm	Becton Dickinson and Company,
Einmal-Kanülen 23G (blau), 0,6 x 25 mm	Franklin Lakes New York 07417 USA
Einmal-Kanülen 30 G (gelb), 0,3 x 13 mm	
Dreiwegehähne	Becton Dickinson Infusion Therapy AB, Helsingborg Sweden
Venenverweilkanülen G14	Klinika Medical GmbH, 61250 Usingen
Kliniject (2,2 x 45mm)	
PE-Schlauch Vene	Protex
Fine Bore Polythene Tubing	Smiths Medical, St Paul, U.S.A
E-1317 0,58mm ID 0,96mm OD	
PE-Schlauch Arterie	Protex
Fine Bore Polythene Tubing	Smiths Medical, St Paul, U.S.A
E-13200,38 mm ID 1,09 mm OD	
Perfusorspritzen 50ml	Becton Dickinson S.A., Madrid Spain
Perfusorschlauchverlängerungen 140cm	Becton Dickinson S.A., Madrid Spain
Einmal-Skalpell Figur: 10	B. Braun Deutschland GmbH
Protex Endotrachealtubus 3,5 i.D	Protex Smiths Medical, St Paul, U.S.A
BD Falcon PE-Round Bottom Tubes 14ml	BD Biosciences, NJ 07417 USA
Cellstar Tubes 15ml, konischer Boden	Greiner bio one
Lithium Heparin Röhrchen Microvelle®	Sarstedt, Nümbrecht Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes 0,5ml, 1,5ml, 3ml	Eppendorf AG, Hamburg
Eppendorf Pipettenspitzen 2ml-4µl	Eppendorf AG, Hamburg
Super Frost Objektträger	Gerhard Menzel GmbH Braunschweig

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Kolz, Alexander
 Geburtsdatum: 03. Mai 1982
 Geburtsort: Eckernförde, Schleswig-Holstein
 Vater: Robert Kolz, Dipl. Ing. Elektrotechnik † 1992
 Mutter: Carmen Kolz, geb. Schwindling

SCHULISCHER WERDEGANG

1988-1992 Kurpfalz-Grundschule Schriesheim
 1992-1999 Kurpfalz-Realschule Schriesheim
 1999-2002 Carl-Bosch-Schule Heidelberg
 18.06.2002 Allgemeine Hochschulreife

ZIVILDIENTST

2002-2003 Pflegedienst der Anästhesie, Kopfklinik
 Universitätsklinikum Heidelberg

NOTFALLMEDIZINISCHE AUSBILDUNG

06.08.1994 Sanitätshelfer
 13.07.2006 Rettungsassistent (Staatsexamen)
 27.09.2017 Zusatzbezeichnung Notfallmedizin
 29.10.2020 Fachkunde Leitender Notarzt

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

2007 - 2013 Studium der Humanmedizin
 an der Universität Heidelberg
 14.09.2009 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: „gut“ (2,5)
 2013 – 2014 Praktisches Jahr am Unispital Zürich, Schweiz (Anästhesie)
 Universitätsklinikum Heidelberg (Chirurgie, Innere Medizin)
 06.06.2014 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note: „sehr gut“ (1,5)
 Gesamtnote: „gut“ (1,8)
 17.06.2014 Approbation als Arzt
 30.07.2020 Facharzt für Anästhesiologie

9 DANKSAGUNG

Herrn Prof. Thomas Lücke, MBA, D.E.S.A. danke ich für die freundliche Überlassung des Themas dieser Arbeit, die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten sowie für seine konstruktive Hilfe bei der Planung der Experimente und die Durchsicht der Niederschrift.

Besonderen Dank schulde ich Herrn PD Dr. med. Jörg Krebs, MHBA, E.D.E.C. von der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Universitätsmedizin Mannheim der mir trotz seiner klinischen Verpflichtungen in jeder Phase der Arbeit stets mit gutem Rat zur Seite stand und darüber hinaus für seine Geduld bei der Durchsicht dieser Promotionsschrift.

Frau Prof. Patricia Rocco und Herrn Prof. Paolo Pasqualino Pelosi danke ich für ihre unabhängigen Reviews von Beginn der Planungsphase bis zur Veröffentlichung. Herrn Prof. Dr. rer. nat. Benito Yard von der V. Medizinischen Klinik und Herrn PD Dr. med. Charalambos Tzagogiorgas vom Institut für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Universitätsmedizin Mannheim danke ich für ihre Kooperation und praktischen Ratschläge während der Versuchsphase.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Zentrums für Medizinische Forschung am Universitätsklinikum Mannheim, insbesondere Frau Jutta Schulte und Frau Sophie Gärtner, und allen Mitarbeitern des Tierhauses für ihre Arbeit bedanken.

Schließlich gilt mein Dank meiner Familie, die durch vielfältige Unterstützung zum Gelingen und zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen hat.

Diese Arbeit ist den kritisch kranken Patienten auf allen Intensivstationen gewidmet.