Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie der Universität Ulm
Ärztlicher Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Florian Gebhardt

DIE ROLLE DES ANAPHYLATOXINS C5 IN DER PATHOGENESE DES TRAUMA-INDUZIERTEN SEPTISCHEN AKUTEN LUNGENSCHADENS

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von Michael Ching Karbach, geboren in Stuttgart-Bad Cannstatt,
2019

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Thomas Wirth
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Mario Perl
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Markus Huber-Lang
Tag der Promotion:	16.10.2020

Teile dieser Arbeit sind veröffentlich in *Kalbitz M, Karbach, M, Braumueller, S, Kellermann, P, Gebhard, F, Huber-Lang, M, & Perl, M: Role of Complement C5 in Experimental Blunt Chest Trauma-Induced Septic Acute Lung Injury (ALI). PloS one 11 (2016)* unter CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode, online verfügbar unter https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159417

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis **VI**

1 Einleitung **1**

1.1 Historie . . . 1
1.2 Klinische Bedeutung . . . 2
1.2.1 Epidemiologie . . . 2
1.2.2 Prognose . . . 2
1.2.3 Therapiemöglichkeiten . . . 2
1.3 Grundzüge der Pathomechanismen . . . 3
1.3.1 Invasion von polymorphkernigen Granulozyten . . . 4
1.3.2 Apoptose der Epithelzellen . . . 5
1.3.3 Aktivierung des Komplementsystems . . . 5
1.4 Tierexperimentelle ALI-Modelle . . . 6
1.4.1 Komplementaktivierung bei experimenteller ALI . . . 7
1.4.2 Zusammenfassung . . . 7
1.5 Hypothesen 1-3 . . . 8

2 Material und Methoden **9**

2.1 Tierversuch . . . 9
2.1.1 Das »Double-hit«-Modell . . . 9
2.1.2 Versuchstiere . . . 9
2.1.3 Versuchsanordnung . . . 10
2.1.4 Narkose und Analgesie . . . 11
2.1.5 Thoraxtrauma . . . 12
2.1.6 Polymikrobielle Sepsis (CLP) . . . 12
2.1.7 Sham-Behandlung . . . 12

2.1.8 Gewinnung der Proben . . . 13
2.1.9 Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs . . . 13
2.2 Bestimmungen nach Versuchsende . . . 14
2.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen . . . 14
2.2.2 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität . . . 15
2.2.3 Cytometric Bead Array . . . 15
2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay . . . 16
2.2.5 Western Blot . . . 17
2.3 Statistische Analyse . . . 18

3 Ergebnisse **19**
3.1 Störung der alveolokapillären Schranke nach Thoraxtrauma und Sepsis 19
3.2 Migration von neutrophilen Granulozyten . . . 19
3.3 Zytokinprofil . . . 20
3.3.1 Abschwächung der systemischen Entzündungsreaktion nach Thoraxtrauma und Sepsis bei C5-Defizienz . . . 20
3.3.2 Vermehrt proinflammatorische Mediatoren in der bronchoalveolar lavage fluid (BALF) bei C5-Defizienz . . . 21
3.3.3 Lokale Entzündungsreaktion im Lungengewebe nicht durch C5-Defizienz beeinflusst . . . 22
3.4 Verminderte Apoptose bei C5-Defizienz . . . 22

4 Diskussion **26**
4.1 Limitationen . . . 29
4.2 Ausblick . . . 30

5 Zusammenfassung **31**

6 Literatur **32**

Danksagung **44**

Lebenslauf **45**

Abkürzungsverzeichnis

ALI	akuter Lungenschaden
ARDS	Acute Respiratory Distress Syndrome
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BALF	bronchoalveolar lavage fluid
C5aR	C5a-Rezeptor
C5AR2	C5a-Rezeptor 2, ehemals C5L2
CD18	Cluster of Differentiation 18
CLP	Cecal Ligation and Puncture
DAMPs	damage associated molecular pattern
ECMO	Extracorporeal Membrane Oxygenation
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
G-CSF	Granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor
HRP	Meerrettichperoxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells

ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IFN-γ	Interferon-γ
IgG	Immunglobulin G
IL-1β	Interleukin-1β
IL-10	Interleukin-10
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
KC	Keratinocyte chemoattractant
LFA-1	Lymphocyte Function-Associated Antigen 1
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	Macrophage-Colony Stimulating Factor
MAC	Membrane Attack Complex
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MCP-1	Monocyte Chemotattractant Protein-1
MIP-1α	Macrophage Inflammatory Protein-1-α
MIP-2	Macrophage Inflammatory Protein-2
MOF	Multiorgan failure
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	messenger RNA
NLR	Nod-like Receptor
PAMPs	pathogen associated molecular pattern
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung

PEEP	Positiver endexpiratorischer Druck
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
RANTES	regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted
TF	Tissue Factor
TLR	Toll-like Receptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
vWF	von Willebrandt-Faktor

1 Einleitung

Der akute Lungenschaden (ALI) und das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) sind Krankheitsbilder, welche durch schnell einsetzende schwere Dyspnoe mit Hypoxämie sowie diffuse bilaterale Infiltrate der Lunge gekennzeichnet sind. Je nach Lokalisation der zugrunde liegenden Krankheit oder Verletzung kann ein ALI/ARDS pulmonaler (direkt) oder extrapulmonaler (indirekt) Ursache sein. Zu den häufigen Ursachen einer direkten ALI gehören Pneumonie, Aspiration, Kontusion, Embolie und die Inhalation toxischer Substanzen [11]. Eine indirekte ALI wird häufig durch Sepsis und Trauma, Verbrennungen, Massentransfusion oder akute Pankreatitis ausgelöst [11].

1.1 Historie

Das ARDS wurde zum ersten Mal 1967 von Ashbaugh beschrieben [4]. Zunächst als »adult respiratory distress syndrome« bzw. »acute respiratory distress syndrome in adults« [81] bezeichnet, gilt heute der Begriff »acute respiratory distress syndrome«, da dieses Krankheitsbild nicht nur wie zu Beginn vermutet bei Erwachsenen sondern auch bei Kindern auftreten kann [8]. Im Jahr 1994 folgte eine Definition durch eine amerikanisch-europäische Konsensuskonferenz, welche flächendeckend Anwendung fand [27]. Die seit 2012 geltende Berlin Definition unterteilt das ARDS in drei Schweregrade abhängig vom Grad der Hypoxämie [27]:

1. Akuter Beginn der Erkrankung innerhalb einer Woche
2. Bilaterale Infiltrate
3. Ausschluss eines kardialen Lungenödems oder Überwässerung
4. Oxygenierung

a) leicht: 200 mmHg $<$ P_aO_2:F_iO_2 $\leq$ 300 mmHg mit PEEP oder CPAP $\geq$ 5 cmH_2O

b) mittel: 100 mmHg $<$ P_aO_2:F_iO_2 $\leq$ 200 mmHg mit PEEP $\geq$ 5 cmH_2O

c) schwer: P_aO_2:F_iO_2 $\leq$ 100 mmHg mit PEEP $\geq$ 5 cmH_2O

1.2 Klinische Bedeutung

1.2.1 Epidemiologie

Die Inzidenz der ALI/ARDS wird mit etwa 86.2 pro 100 000 Personenjahren angegeben [91]. Hierbei spielt die Sepsis als wichtigster Risikofaktor für das Entwickeln eines ARDS eine große Rolle. Bei Patienten, die an einer Sepsis mit primär pulmonalem Infektionsherd leiden, entwickelt sich in knapp 50 % der Fälle ein ARDS bzw. ALI [91]. In ca. 17 % der Fälle führt die Lungenkontusion zu ARDS [73].

1.2.2 Prognose

Die Mortalitätsrate beträgt knapp 50 % für ein schweres ARDS [91]. Dabei spielt die im Einzelfall zugrunde liegende Pathophysiologie eine Rolle: so variiert die Mortalität mit 24 % für ein ARDS nach schwerem Trauma und 41 % für ARDS bei schwerer Sepsis mit primär pulmonalem Herd [91]. Die meisten Patienten, die an ARDS versterben, leiden an Sepsis und Multiorganversagen (MOF) [97, 104]. Langzeitstudien zeigen, dass Überlebende des ARDS nicht selten unter einem breiten Spektrum von Beschwerden wie eingeschränkter Lungenfunktion, psychischen Erkrankungen wie Depressionen oder auch kognitiven Defiziten leiden [41, 43, 101].

1.2.3 Therapiemöglichkeiten

Trotz intensiver Forschungsbemühungen in den vergangenen Jahrzehnten existiert in der klinischen Praxis bisher keine kausale Therapie des ARDS. Therapeutisch zum Einsatz kommen ein schonendes Beatmungsregime mit niedrigen Tidalvolumina und positivem endexpiratorischem Druck (PEEP) [16, 29], Recruitment-Manöver [24, 42], sowie

Lagerungstherapie mit kompletter und inkompletter Bauchlagerung [30]. Weitere unterstützende Maßnahmen sind eine zurückhaltende Flüssigkeitsgabe [95], Sedierung [32, 85] und die enterale Gabe einer entzündungsmodulierenden Diät [83]. Mit dem Ziel, die Durchblutung in ventilierten Lungenarealen zur Verbesserung des Gasaustausches zu fördern, werden auch die inhalativen Vasodilatatoren Stickstoffmonoxid und Prostazyklin eingesetzt [82]. Die Oxygenierung kann so vorübergehend verbessert werden, ein Einfluss auf die Mortalität hat sich jedoch nicht gezeigt [1, 40]. Zur Verbesserung der Oxygenierung wurden auch die Vasokonstriktoren Phenylephrine und Almitrine untersucht [18, 90]. Weiterhin wurden ohne Erfolg diverse Substanzen wie Ibuprufen, Ketoconazol oder liposomales Prostaglandin E1 eingesetzt [82]. Als entzündungsmodulierende Substanzklasse wurden auch Kortikosteroide untersucht, die die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF-κB senken können. Auch hier konnte keine signifikante Veränderung der Mortalität nachgewiesen werden [99]. Durch extrakorporale Unterstützung wie die extrakorporale Membranoxygenierung (ECMO) können bei schwerer respiratorischer Dysfunktion bei ARDS-Patienten vorübergehend signifikante Verbesserungen erzielt werden [68]. Eine signifikante positive Veränderung der Mortalität konnte bisher jedoch auch für die extrakorporale Unterstützung nicht nachgewiesen werden [82].

1.3 Grundzüge der Pathomechanismen

An der Pathogenese des komplexen Krankheitsgeschehens des ARDS sind viele verschiedene Mechanismen beteiligt [106]. Zentrales Merkmal der Pathophysiologie ist der Verlust der alveolokapillären Integrität mit konsekutivem Einstrom von Flüssigkeit und Proteinen in den Alveolarraum. Zur Schädigung der alveolokapillären Schranke kann es sowohl durch residente Alveolarmakrophagen als auch durch aktivierte polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN) von der Kapillarseite aus kommen [101]. Die Integrität des alveolären Epithels wird zusätzlich durch Apoptose der Epithelzellen geschädigt [80]. Durch Expression von Tissue Factor (TF) und von Willebrandt-Faktor (vWF) des Endothels wird das Gerinnungsystem aktiviert, und durch Freisetzung vasoaktiver Substanzen kommt es zur pulmonalen Hypertension [58, 66].

1.3.1 Invasion von polymorphkernigen Granulozyten

Die Migration von PMN in Interstitium und Alveolarraum in der Lunge ist ein wichtiges Merkmal des ARDS. Aus ARDS-Patienten isolierte PMN, die markiert und reinfundiert wurden, akkumulierten zu einem signifikanten Teil in der Lunge [107]. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Anzahl von neutrophilen Granulozyten in der BALF mit der Schwere sowie dem Outcome korreliert [98]. Eine ARDS bei Patienten in Neutropenie beginnt sich bei Normalisierung der Granulozytenzahlen im Blut stark zu verschlechtern [6]. Die Migration aktivierter PMN wird mittels verschiedener Adhäsionsmoleküle vermittelt [20]. Die weitere interzelluläre Adhäsion erfolgt durch β_2-Integrin (auch bekannt als Lymphocyte Function-Associated Antigen 1 (LFA-1) oder Cluster of Differentiation 18 (CD18)) auf neutrophilen Granulozyten und Adhäsionsmolekülen wie Intercellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) auf Endothelzellen [50, 55]. Es wurden jedoch auch von Adhäsionsmolekülen unabhängige Mechanismen zur Migration neutrophiler Granulozyten in der Lunge postuliert [21]. Normalerweise müssen PMN (etwa 6 µm bis 10 µm) sich verformen, um das Kapillarbett der Lunge (etwa etwa 2 µm bis 15 µm) zu passieren [19]. Aus ARDS-Patienten isolierte Neutrophile sind besonders rigide [71], und diverse proinflammatorische Substanzen wie Endotoxin oder Interleukin-8 (IL-8) vermindern die Fähigkeit von PMN, sich zu deformieren, was die Transitzeit in der Lunge erhöht und die Zell-Zell-Interaktion zwischen Endothelzellen und Neutrophilen erleichtert [20].

Aktivierte PMN setzen nach ihrer Aktivierung eine Reihe von Substanzen frei, die, gegen Pathogene gerichtet, nützliche Effekte haben. Angrenzende Endothelzellen oder Alveolarepithel können jedoch auch Schaden davontragen. So kommt es durch übermäßige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies zum oxidativen Zellschaden [28]. Die von PMN freigesetzte Elastase kann in humanem Alveolarepithel die Apoptose induzieren [103]. Darüberhinaus führen zirkulierende proinflammatorische Substanzen wie z. B. Interleukin-6 (IL-6) oder Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) zur Inhibition der Apoptose in neutrophilen Granulozyten, was zur Akkumulation von PMN in den betroffenen Geweben führen kann [22, 23, 64]. Eine Reduktion der Migration der PMN beispielsweise durch Antagonisierung von Chemokinen konnte bei der indirekten experimentellen ALI nach hämorrhagischem Schock und Sepsis zu einer Abmilderung des Organschadens beitragen [101].

1.3.2 Apoptose der Epithelzellen

Im Lungengewebe an ARDS verstorbener Patienten konnten Chromatinveränderungen nachgewiesen werden, die hinweisend auf stattfindende Apoptose von Typ II-Alveolarzellen waren [7]. Weiterhin konnten in der bronchoalveoläre Lavage (BAL) von ALI-Patienten erhöhte Konzentrationen von Fas bzw. Fas-Ligand bestimmt werden [2]; humane Lungenepithelzellen exprimieren den Fas-Rezeptor und seine Aktivierung löst die Apoptose aus [72]. In der BALF von an ARDS verstorbenen Patienten konnten signifikant höhere Konzentrationen von Fas-Ligand im Vergleich zu Überlebenden nachgewiesen werden [65]. In einem Modell indirekter ALI, induziert durch hämorrhagischen Schock gefolgt von Sepsis, war der Schaden an der Lunge bei Mäusen mit funktionsunfähigem Fas-Ligand oder Fas-Rezeptor weniger ausgeprägt [75]. Die Blockade von Fas oder Fas-Ligand wirkt in einem Modell mit durch Endotoxin vermittelter ALI protektiv [52]. Bei durch die Aktivierung von Fas vermittelter Lungenverletzung sind primär Zellen des Alveolarepithels betroffen [63].

1.3.3 Aktivierung des Komplementsystems

Das Komplementsystem besteht aus einer enzymatischen Kaskade von über 30 Plasmaproteinen [37] und verfügt über drei bekannte Wege der Aktivierung [35]. Der klassische Weg kann über die direkte Bindung des Komplementbestandteils C1q mit der Oberfläche eines pathogenen Mikroorganismus oder eines Antikörper-Antigen-Komplexes aktiviert werden [37]. Der Mannose-bindendes Lektin (MBL)-Weg wird über den Kontakt von MBL zu Mannose-enthaltenden Strukturen, wie sie auch an der Oberfläche von mikrobiellen Pathogenen vorkommen, aktiviert [108]. Der alternative Weg erfolgt über die Bindung von spontan gebildetem C3b zur Oberfläche von pathogenen Keimen [108]. Alle Aktivierungswege führen zur Bildung von C3-Konvertase, welche C3 in C3a und C3b schneidet [69, 86]. Aus C3b sowie der C3-Konvertase bildet sich die C5-Konvertase, welches C5 in C5a und C5b spaltet [46]. C3a und C5a agieren als Anaphylatoxine während C5b die Bildung des Membrane Attack Complex (MAC) (auch C5b-9) initiiert [46]. Allerdings können auch einige, klassischerweise nicht zur Komplement-Kaskade zählenden Proteasen, Komplementbestandteile in ihre biologisch aktiven Produkte überführen. So kann beispielsweise Thrombin als C5-Konvertase fungieren [48], und auch für Proteasen aus PMN als auch Makrophagen konnte gezeigt werden, dass sie C5 spalten können [49,

105]. Eine Aktivierung des Komplementsystems mit korrelierendem Einstrom von neutrophilen Granulozyten konnte an einem heterogenen Kollektiv ARDS-Patienten durch Nachweis von C5a unter anderem in BAL-Flüssigkeit und Plasma gezeigt werden [38, 60]. Weiterhin zeigten Patienten in verschiedenen Studien nicht nur Aktivierung des Komplementsystems, sondern darüberhinaus auch eine Korrelation zwischen dem Grad der Aktivierung und dem Outcome [38, 96]. C5a gehört neben anderen proinflammatorischen Mediatoren (Endotoxin, IL-8) zu den Substanzen, die die Fähigkeit von PMN sich zu deformieren abschwächt.

1.4 Tierexperimentelle ALI-Modelle

Wie in Abschnitt 1.1 beschrieben, gibt es für den Menschen eine Reihe klar definierter Kriterien, mit denen eine ALI bzw. ein ARDS diagnostiziert werden kann. Diese Kriterien haben sich zwar für die Klinik als geeignet herausgestellt, sie berücksichtigen jedoch nicht die Heterogenität der verschiedenen Pathophysiologien, die letztendlich zum Bild eines ARDS führen. Auf der anderen Seite steht eine Reihe von tierexperimentellen ARDS-Modellen, deren Pathophysiologie zwar durch Simplifizierung einfacher zu charakterisieren ist, aber deren Ergebnisse letztendlich somit von geringerer klinischer Relevanz sind [59]. Dies wird unter anderem auch dadurch ersichtlich, dass mit Interventionen in einigen Modellen signifikante Verbesserungen zu erzielen waren, während sie in anderen versagten. Da die beim Menschen angewandten Kriterien zur Diagnose des ARDS insbesondere für Kleintierversuche ungeeignet sind, wurden im Jahre 2011 durch ein Komitee der American Thoracic Society Empfehlungen für tierexperimentelle Modelle festgelegt [61]. Ein Tiermodell der ALI sollte hiernach drei der vier folgenden Kriterien erfüllen [61]:

1. Histologisch belegter Gewebeschaden
2. Veränderung der alveolokapillären Schranke
3. Entzündungsreaktion
4. Physiologische Funktionsstörung

Zu den häufig verwendeten Modellen gehören beispielsweise die intravenöse oder intratracheale Injektion von Endotoxin, die Immunglobulin G (IgG)-Immunkomplex

induzierte ALI, die Säure-Aspiration, die pulmonale sowie extrapulmonale Ischämie/Reperfusion oder das Thoraxtrauma [62]. Das Modell des alleinigen Thoraxtraumas konnte durch die Erweiterung um einen Second Hit, wie zum Beispiel eine polymikrobielle Sepsis, den klinischen Gegebenheiten noch näher gebracht werden und wurde auch in vorliegender Arbeit genutzt [78].

1.4.1 Komplementaktivierung bei experimenteller ALI

Mit Anti-C5a-Antikörper behandelte Ratten, die in einem ALI-Modell durch intrapulmonale Ablagerung von IgG keine ALI ausbilden konnten, waren hierzu durch intratracheale Instillation von C5a wieder in der Lage [70]. Ebenfalls in einem ALI-Modell durch intrapulmonale Ablagerung von IgG-Immunkomplexen konnten erhöhte Werte von C5a in der BAL-Flüssigkeit nachgewiesen werden sowie ein Ausbleiben der Entwicklung einer akuten Lungenverletzung bei $C5^{-/-}$-Mäusen [54]. In einem IgG-Immunkomplex-Modell an Ratten konnte gezeigt werden, dass der Schweregrad der Lungenverletzung mittels »Silencing« des C5a-Rezeptor (C5aR) gemindert werden konnte [100]. Außerdem wird vermutet, dass C5a zusammen mit anderen chemotaktisch wirksamen Stoffen einer der entscheidenden Mediatoren für den Aufbau eines chemotaktischen Gradienten für PMN bei ALI darstellt [33, 37].

1.4.2 Zusammenfassung

Das ARDS ist eine gravierende Lungenerkrankung, die pro Jahr allein in den USA 75 000 Menschenleben fordert. Das ARDS liegt ein breites Spektrum verschiedener Krankheiten zu Grunde, was sich auch in der Vierzahl verfügbarer tierexperimenteller Modelle wiederspiegelt. Unabhängig vom initialen Insult ist die Störung der alveolokapillären Schranke mit konsekutivem pulmonalen Ödem und Oxygenationsstörung das zentrale Merkmal des ARDS. Hierzu führen einerseits direkte Schädigung von Lungengewebe wie beispielsweise Lungenkontusion, Aspiration, Pneumonie oder Inhalation chemischer Noxen, andererseits auch indirekte Schädigung wie extrapulmonales Trauma oder Sepsis [11]. Zur Zeit gibt es bislang keine erfolgreiche therapeutische Option. Die einzelnen experimentellen Modelle lassen aufgrund ihrer Heterogenität nur begrenzt Schlüsse auf andere Modelle sowie auf das ARDS beim Menschen zu. Hierbei ist festzustellen, dass Double-hit–Modelle die klinischen Gegebenheiten besser wiederspiegeln als Single-hit-

Modelle. Der Einfluss des Komplementsystems in dem klinisch relevanten Double-hit-Modell von stumpfen Thoraxtrauma und konsekutiver polymikrobieller Sepsis ist auf die Ausbildung eines ARDS nicht hinreichend geklärt.

1.5 Hypothesen 1-3

Basierend auf den vorangegangen Erläuterungen zur Pathophysiologie des akuten trauma-induzierten septischen Lungenschadens wurden folgende Hypothesen formuliert:

1. Das Fehlen des Komplementfaktors C5 geht einher mit einer abgeschwächten Entzündungsreaktion im Rahmen eines akuten Lungenschadens nach Thoraxtrauma und konsekutiver polymikrobieller Sepsis.

2. Das Fehlen des Komplementfaktors C5 bedingt eine Reduktion der durch Thoraxtrauma und Sepsis induzierten Apoptose in der Lunge.

3. Das Fehlen des Komplementfaktors C5 bedingt eine Reduktion des durch Thoraxtrauma und konsekutiver polymikrobieller Sepsis induzierten Lungenschadens.

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuch

2.1.1 Das »Double-hit«-Modell

In vorliegender Studie kommt ein »Double-hit« -Modell zum Einsatz, in dem einem stumpfen Thoraxtrauma eine polymikrobielle Sepsis folgt. Die Entwicklung einer ALI als Folge dessen ist gut belegt [78]. Solche »Double-hit«-Szenarien spiegeln die klinischen Gegebenheiten in der Entwicklung einer ALI beim Menschen besser wieder [78], da eine ALI beim Menschen selten einer einzelnen Ursache zuzuordnen ist sondern sich aus dem Zusammenspiel verschiedener Risikofaktoren heraus entwickelt [62]. So verschlechtert sich beispielsweise die Prognose eines Thoraxtraumas nach septischen Komplikationen [3]. Dieser klinische Sachverhalt spiegelt sich in dem hier zur Anwendung kommenden Modell von stumpfem Thoraxtrauma und konsekutiver polymikrobieller Sepsis wieder. So konnte gezeigt werden, dass die Überlebensrate bei »Double-Hit« signifikant von ca. 90% bei alleinigem Thoraxtrauma auf ca. 50% bei Double-Hit sinkt [77]. Weiterhin entwickelt sich die ALI erst durch die Kombination beider Stimuli, das Thoraxtrauma oder die Sepsis als einzelner Stimulus induzieren sie nicht [78]. Die Ausbildung einer ALI gemäß der von der American Thoracic Society empfohlenen Kriterien für tierexperimentelle ALI-Modelle ist gut belegt [78]. Im Sinne der Einteilung der ALI in pulmonaler oder extrapulmonaler Genese ist dieses Modell als gemischte ALI zu betrachten.

2.1.2 Versuchstiere

Die Maus wurde für die geplanten Experimente als Versuchstier gewählt, da sich diese Spezies besonders für die Untersuchung immunologischer Fragestellungen eignet [13].

Relevante Tiermodelle der ALI sind ebenfalls in der Maus durchgeführt worden [56, 57, 74, 76, 77]. Da in diesen Versuchen vor allem die Pathomechanismen des Thoraxtrauma-induzierten septischen akuten Lungenschadens untersucht werden sollen, ist die Maus als Versuchstier hervorragend geeignet, da hier genetisch veränderte Tiere zur Verfügung stehen. Darüberhinaus sind Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe ebenfalls an der Maus durchgeführt worden [78, 79].

Darlegung der Genehmigung durch den Tierschutz

Alle durchgeführten Tierversuche wurden durch die zuständige Behörde im Regierungspräsidium Tübingen (Genehmigung Nr. 958) genehmigt.

Tierarten

Verwendet wurden C57BL/6 Mäuse (nach Bezugsliste des Tierforschungszentrums) männlichen Geschlechts im Alter von 8–9 Wochen. Neben den im vorangegangenen Abschnitt aufgeführten Gründen wurde dieser Stamm gewählt, da relevante Vorstudien unserer Arbeitsgruppe mit ihm durchgeführt wurden. Darüberhinaus kamen $C5^{-/-}$ Knockout-Mäuse männlichen Geschlechts im Alter von 8–9 Wochen zum Einsatz (Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA). Die Versorgung der Tiere übernahm das Tierforschungszentrum Ulm. Es bestand ein 12-stündiger Tag-Nacht-Rhythmus bei 21 °C Raumtemperatur sowie Zugang zu Wasser und Futter ad libitum.

Versuchstieraufteilung

Die Aufteilung der Versuchstiere in die entsprechenden Gruppen kann Tabelle 1 entnommen werden. Jeder Gruppe wurden 7 Tiere für die Beurteilung der Entzündungsmediatoren in der Lunge sowie 7 Tiere zur Entnahme der bronchoalveolären Lavage zugewiesen. Dies war notwendig, da die Gewinnung von Lungengewebe und BALF nicht aus einem Tier möglich ist.

2.1.3 Versuchsanordnung

Das stumpfe Thoraxtrauma wurde mittels Druckluft herbeigeführt. Der Druckwellengenerator (Wissenschaftliche Werkstatt Feinwerktechnik, Universität Ulm) besteht aus

Tabelle 1: Gruppenaufteilung der Versuchstiere

GRUPPE	GRUPPENAUFTEILUNG
1	Wildtyp, Sham-Behandlung
2	Wildtyp, Thoraxtrauma und CLP
3	$C5^{(-/-)}$, Sham-Behandlung
4	$C5^{(-/-)}$, Thoraxtrauma und CLP

zwei übereinander angeordneten Zylindern, welche fest miteinander verschraubt sind. Diese sind durch eine 50 µm–Mylar™ Polyestermembran (Du Pont, Bad Homburg) getrennt. Der obere Zylinder wird über eine Gasleitung mit einer Gasflasche mit Druckluft für Atemzwecke (MTI, Eichingen) verbunden. Zwischen Gasleitung und oberem Zylinder sind ein elektronisch auslösbares Hochgeschwindigkeitsventil (Hee-D-24, Festo, Esslingen) und ein Druckminderer (Flaschendruckminderer Zinser, Ebersbach) geschaltet. Der untere Zylinder ist offen und auf den Thorax der Maus gerichtet. Als Abstand zwischen Zylinder und Sternum wurde 1.5 cm gewählt. Durch die Öffnung des Hochgeschwindigkeitsventils gelangt Druckluft in den oberen Zylinder. Die Polyestermembran hält schließlich dem im oberen Zylinder aufgebautem Druck nicht mehr stand und reißt, was eine reproduzierbare Druckwelle erzeugt. In vorangegangen Studien konnte gezeigt werden, dass bei diesem Abstand eine adäquate pulmonale Kontusion und Induktion einer lokalen und systemischen inflammatorischen Reaktion ohne Begleitverletzungen am knöchernen Thorax oder den übrigen thorakalen oder abdominellen Organen erreicht wird [53].

2.1.4 Narkose und Analgesie

Über eine Spülmaske wurden die Tiere mit einer Narkose durch 2.5 % Sevofluran (Sevorane™ Abbott, Wiesbaden) und 97.5 % Sauerstoff anästhesiert. Aufgrund des kleinen Blut-Gas-Verteilungskoeffizienten ist ein schnelles An- und Abfluten gewährleistet und die Narkose gut steuerbar. Die Funktion monozytärer Zellen wird bei dieser Art von Narkose nicht beeinflusst und ist somit für folgenden Versuch geeignet [84]. Zur Analgesie wurde den Tieren vor Beendigung der Narkose ein subkutanes Depot Buprenorphin (0,03 $^{mg}/_{kg}$) injiziert. Die Gabe von Buprenorphin wurde alle 12 h wiederholt.

2.1.5 Thoraxtrauma

Wie bereits in Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe beschrieben [53], wurden die Versuchstiere zunächst wie in Abschnitt 2.1.4 besprochen anästhesiert. Es erfolgte die Rasur der Tiere an Thorax und Abdomen. Die knöchernen Thoraxstrukturen wurden auf der Haut mit einem wasserunlöslichen Stift markiert und das stumpfe Thoraxtrauma durch eine einzige auf die Thoraxmitte ausgerichtete Druckwelle herbeigeführt. Die Dauer der Druckexposition beträgt etwa 1 ms bis 2 ms, direkt unter dem Druckerzeuger wird ein Druck von 1.3 bar gemessen [53].

2.1.6 Polymikrobielle Sepsis (CLP)

Die Induktion der polymikrobiellen Sepsis wurde mittels zökaler Ligatur und Punktion nach einem etablierten Protokoll vorgenommen [89]. Die Rasur des Abdomens wurde bereits bei den Vorbereitungen zur Induktion des Thoraxtraumas durchgeführt (s. 2.1.5). Nach Einleitung der Anästhesie (s. 2.1.4) und Feststellung einer adäquaten Narkosetiefe durch Setzen eines Schmerzreizes mit einer spitzen Pinzette in eine der Extremitäten erfolgte eine longitudinale Inzision von 1.5 cm bis 2 cm in der Mittellinie des Abdomens.

Das Peritoneum wurde eröffnet und das Zökum aufgesucht und mobilisiert. Etwa auf der Hälfte der Strecke zwischen distalem Pol und Basis des Zökums wurde es mit einem Faden ligiert, mit einer 22 G Kanüle (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) punktiert und vorsichtig etwas Darminhalt ausgepresst. Das Zökum wurde wieder zurückverlagert und die Wunde schichtweise verschlossen (4-0 Ethilon Monofil Fäden #EH7270, Ethicon Inc., Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt).

2.1.7 Sham-Behandlung

Bei Sham-Behandlung wurden die Tiere ebenfalls rasiert und markiert, es wurde jedoch kein Thoraxtrauma herbeigeführt. Weiterhin wurde analog zu CLP ein medianer abdomineller Zugang geschaffen und das Zökum mobilisiert. Es folgte jedoch keine Ligatur oder Punktion. Danach erfolgte der schichtweise Wundverschluss (4-0 Ethilon Monofil Fäden #EH7270, Ethicon Inc., Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt).

2.1.8 Gewinnung der Proben

36 h nach Thoraxtrauma bzw. 12 h nach CLP wurde mittels der Erhöhung des Sevoflurane-Anteils in der Atemluft die finale Narkose herbeigeführt und die Probengewinnung durchgeführt.

Bronchoalveoläre Lavage

Nach Inzisur in der Mittellinie wurde die Trachea freipräpariert, am pharyngealen Ende inzidiert und mittels eines sterilen Katheters kannüliert. Daraufhin wurden die Lungen dreimal mit 600 µL 0.9 % NaCl gespült. Unmittelbar nach Probengewinnung wurde die gewonnene Flüssigkeit für 10 min mit 350 g bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand bei −80 °C zur weiteren Analyse gelagert.

Blutentnahme

Nach vorangegangener bronchoalveolärer Lavage wurde der Thorax durch Inzision in der Mittellinie eröffnet. Durch Punktion des rechten Ventrikels mit einer 26 G Kanüle auf einer 1 ml-Spritze (BD Plastipak™, Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, USA) mit 50 µL Heparin im Konus wurde Vollblut gewonnen und in 1.5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt. Das Blut wurde unmittelbar nach Abnahme für 15 min mit 16 000 g bei 4 °C zentrifugiert und der Plasmaüberstand bei −80 °C zur weiteren Analyse gelagert.

Organe

Die einzelnen Lungenlappen, Milz und Leber wurden entnommen und sofort in 2 ml Reaktionsgefäßen (Eppendorf, Hamburg) auf flüssigem Stickstoff konserviert.

2.1.9 Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs

Zunächst erfolgte das Versetzen der Versuchstiere in Narkose wie in 2.1.4 beschrieben. Gemäß der Gruppeneinteilung der Versuchstiere (siehe Tabelle 1) wurde entweder ein Thoraxtrauma (s. 2.1.5) oder eine Sham-Behandlung (s. 2.1.7) durchgeführt. Nach Applikation des Thoraxtraumas respektive Kontrollbehandlung wurde den Tieren ein subkutanes Depot Buprenorphin (0,03 $^{mg}/_{kg}$) injiziert, die volatile Narkose beendet und

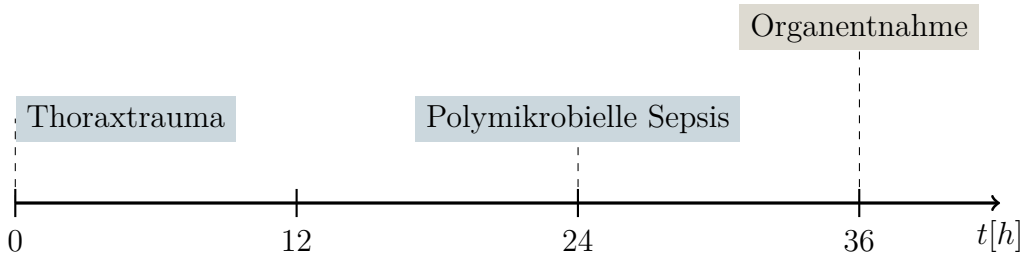

Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf des Tierversuchs.

die Versuchstiere wieder in den Käfig verbracht. Die Gabe von Buprenorphin wurde alle 12 h wie beschrieben wiederholt. Die Tiere wurden mit Futter und Wasser ad libitum gehalten. 24 h nach Induktion des Thoraxtraumas wurde mittels Ligatur und Punktion des Zökums (s. 2.1.6) eine polymikrobielle Sepsis herbeigeführt bzw. die Sham-Behandlung durchgeführt. Weitere 12 h nach Induktion der Sepsis erfolgte die finale Narkose durch Erhöhung des Narkosegasanteils in der Atemluft und die Probengewinnung wurde wie in Abschnitt 2.1.8 beschrieben durchgeführt.

2.2 Bestimmungen nach Versuchsende

Nach Gewinnung der Proben wurden folgende Bestimmungen an diesen durchgeführt. Sofern nicht anders vermerkt wurden Reagenzien von Sigma Aldrich (München) und Reaktionsgefäße 0.5 ml bis 2.0 ml von Eppendorf (Eppendorf AG, Hamburg) verwendet. Doppelt destilliertes Wasser (ddH_2O) stellte die Klinikapotheke des Universitätsklinikums Ulm bereit.

2.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Für einige Testverfahren war es nötig, die Konzentration des in der Probe gelösten Proteins zu kennen. Weiterhin wurde als Indikator für die Störung der alveolokapillären Schranke wurde die Gesamtprotein-Konzentration der Flüssigkeit, die bei der bronchoalveolären Lavage gewonnen wurde, bestimmt. Hierzu verwendeten wir den BCA Protein Assay der Firma Pierce (Pierce Biotechnology, Rockford, USA). Die Durchführung des Tests richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers.

Mittels der im Kit enthaltenen Albuminlösung wurde nach beiliegenden Instruktionen eine Standardreihe hergestellt. Nach Verdünnung der Proben mit H_2O wurden jeweils 10 µL Probe oder 10 µL Standard in eine 96-Well Platte pipettiert. Nach Hinzugabe von je 200 µL Arbeitsreagenz wurde die Platte verschlossen und bei 37 °C im Dunkeln für 30 min inkubiert. Zur photometrischen Bestimmung kam der Sunrise Plate Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) zum Einsatz.

2.2.2 Bestimmung der Myeloperoxidase-Aktivität

Als Indikator für die intrapulmonale Immigration und Aktivität von PMN wurde die Aktivität der Myeloperoxidase (MPO) aus Lungenhomogenisat bestimmt [102].

Zunächst wurde ein Puffer mit 10.35 g KH_2PO_4 (Merck, Darmstadt, Deutschland) pro 950 mL destilliertem Wasser hergestellt. Dieser wurde auf einen pH von 5,4 eingestellt. Hierzu wurde eine Lösung von 0.91 g K_2HPO_4 (Merck) in 50 mL destilliertem Wasser und 0,5%igem Hexadecyltriethylammoniumbromid (Sigma) verwendet. Dann wurde Lungengewebe hinzugegeben und homogenisiert (Ultraturrex T25, Jahnke und Kunkel, Staufen, Deutschland). Die Proben wurden für 2 h bei 60 °C inkubiert und anschließend bei 3950 g für 15 min zentrifugiert. 25 µL Überstand wurden abpipettiert und mit 25 µL Tetramethylbenzidin (Sigma) und 200 µL 30%igem H_2O_2 (Fluka, Deisenhofen, Deutschland) bei 37 °C für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 50 µL 2 M H_2SO_4 gestoppt. Die Extinktion wurde bei 450 nm mit dem Sunrise Plate Reader (Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) gemessen.

2.2.3 Cytometric Bead Array

Die Konzentrationen von IL-6, Interleukin-1β (IL-1β), Macrophage Inflammatory Protein-1-α (MIP-1α), regulated upon activation, normal T-cell expressed, and presumably secreted (RANTES), Interleukin-10 (IL-10), Interferon-γ (IFN-γ), G-CSF und Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) wurden mittels Cytometric bead array aus homogenisiertem Lungengewebe und BALF bestimmt.

Herstellung des Gewebehomogenisats

Zunächst wurde jeder Lungenlappen mit 250 µL eines Proteaseinhibitor-Cocktails aus 5 mL phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und 250 µL Proteaseinhibitor (P8340, Fa. Sigma) in ein Reaktionsgefäß gegeben. Anschließend wurden die Proben auf Eis homogenisiert. Daraufhin wurden sie in jeweils fünf Zyklen je fünf Sekunden sonifiziert. Nach dem Homogenisieren wurden die Proben bei 4 °C zwei mal für 15 min bei 16000 g zentrifugiert und der Überstand in neue Gefäße überführt.

Testdurchführung

Zur Bestimmung wurden »Bio-Plex Pro Assays« (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) verwendet. Die Testdurchführung richtete sich nach den Empfehlungen des Herstellers.

Zunächst wurden jeweils 100 µL Assay-Buffer in die 96 Kunststoffvertiefungen (Wells) der Multiplex-Platte pipettiert. Am Boden der Wells sitzt ein Filter, durch den mit Hilfe einer Vakuumpumpe die Flüssigkeit aus jedem Well hinausgewaschen werden kann. Nach zweimaligem Durchführen solch eines Waschschrittes, wobei der zweite Waschschritt mit jeweils 125 µL Assay Buffer durchgeführt wurde, wurden jeweils 50 µL der verdünnten Beads hinzugegeben. Nach 2-maligem Waschen wurden jeweils 50 µL Standard oder Probe in die Wells pipettiert und dann bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Daraufhin wurde die Platte drei mal gewaschen und jeweils 25 µL einer Lösung mit gegen die gesuchten Moleküle gerichteten Antikörpern auf die Proben gegeben. Nach 30 min Inkubationszeit und 3-maligem Waschen wurden jeweils 50 µL einer Lösung mit verdünntem biotinyliertem Sekundärantikörper auf die Proben gegeben, der ebenfalls nach 30 min Inkubationszeit in drei Schritten heruntergewaschen wurde. Schließlich wurde nochmal 125 µL Assay Buffer zu jeder Probe hinzugegeben und die Platte für 30 min durch einen Rüttler gemischt. Zum Auslesen der Proben kam das Bio-Plex 200 System (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) zum Einsatz.

2.2.4 Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Die Konzentrationen von Keratinocyte chemoattractant (KC), Monocyte Chemotattractant Protein-1 (MCP-1) und Macrophage Inflammatory Protein-2 (MIP-2) wurden

mittels ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) aus Lungenhomogenisat, bronchoalveolärer Lavage sowie Plasma bestimmt. Hierbei fand für die Bestimmung von MCP-1 ein entsprechendes Set BD OptEIA™ ELISA (Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, USA) Verwendung. Für die Analyse von KC und MIP-2 kam ein DuoSet® ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA) zum Einsatz.

Herstellung des Gewebehomogenisats

Die Herstellung von Homogenisat aus Lungengewebe erfolgte wie bereits in Abschnitt 2.2.3 auf S. 16 beschrieben.

Testdurchführung

Die Testdurchführung richtete sich je nach Kit nach den Empfehlungen des Herstellers. Zunächst wurden die verwendeten 96-Well-Mikrotiterplatten (C96 Maxisorp, NUNC) mit dem verwendeten Capture-Antikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Nach Waschen mittels eines Waschgerätes (Wellwash 4 MK 2, Thermo Fisher Scientific, Schwerte) mit Waschpuffer (165 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.5 mM Na_2HPO_4, 2.9 mM KH_2HPO_4 mit Zusatz von 0.5 g TWEEN 20 pro Liter ddH_2O) wurden in Doppelbestimmung jeweils Probe bzw. Standard auf die Platten pipettiert und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurde nach erneutem Waschen der Detection Antibody hinzugegeben. Nach Inkubation mit dem Detection Antibody und Waschen der Wells wurden die Platten mit einer Streptavidin-HRP-Lösung inkubiert, um dann nach nochmaligem Waschen mit jeweils 100 µL einer TMB-Reagenz (BD Pharmingen™, Becton Dickinson & Company, Franklin Lakes, USA) in einem lichtgeschützten Raum inkubiert zu werden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2.5 M Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der Extinktion erfolgte mit einem Photometer (Tecan Sunrise, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz).

2.2.5 Western Blot

Aktive Caspase-3 im Lungengewebe wurde mittels Western Blotting nachgewiesen.

Hierzu kamen selbstgegossene 18 %ige-Gele (hergestellt mit dem Mini Protean® 3 System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) zum Einsatz. Die Gele wurden je Probe mit 80 µg Protein beladen. Zunächst erfolgte die Auftrennung der Proteine in den

zu untersuchenden Proben nach ihrer Größe mittels Elektrophorese (Mini-Protean® Tetra Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München). Mit Hilfe eines Semi-Dry-Blotters (Trans-Blot® Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (Hybond P-PVDS Membran, Amersham Biosciences, Freiburg) übertragen. Zum Blockieren freier unspezifischer Bindungsstellen wurden die Membranen 90 min in 5 %-Milch, hergestellt aus Milchpulver (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe) und TBST (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 2,5mM KCl, 0.5 % Tween, ddH_2O), geschwenkt. Über Nacht erfolgte die Inkubation der Membranen mit dem Primärantikörper (Artikel-Nr. 9661, Cell Signaling, gewonnen aus Hasen) in einer Verdünnung von 1:500 in TBST bei 4 °C. Am folgenden Tag erfolgte nach mehrmaligem Waschen die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Artikel-Nr. 7074, Cell Signaling, Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelter Antikörper aus Ziegen gerichtet gegen IgG aus Hasen) in einer Verdünnung von 1:1500 in TBST. Die Entwicklung erfolgte mittels eines Chemilumineszenz-basierten Verfahrens (ChemiGlow; Alpha Innotech, San Leandro, CA). Zur weiteren semiquantitativen Analyse kam die Software ImageJ zum Einsatz [92]. Um zu verifizieren, dass die Western-Blots mit gleicher Menge Protein beladen wurden, wurden sie nach dem Stripping (Strong Antibody Stripping Solution, Chemicon, Temecula, CA) zunächst mit einem β-Actin-Antikörper (Cell Signaling) und folgend mit einem HRP-gekoppelten Antikörper inkubiert und mittels Chemilumineszenz (ChemiGlow) entwickelt.

2.3 Statistische Analyse

Alle Ergebnisse aus oben genannten Messungen wurden auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Hierzu kam die Software GraphPad Prism (Version 6, GraphPad Software, San Diego, USA) zum Einsatz. Die Werte der Proben, die bei Messung mittels ELISA oder Cytometric bead array unter der Nachweisgrenze lagen, wurden für die statistische Analyse auf null gesetzt. Für die erhobenen Daten wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (one-way-ANOVA) für unabhängige Stichproben durchgeführt. Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen folgte der Varianzanalyse ein Post-hoc-Test nach Sidak. Unterschiede mit $p < 0,05$ wurden als signifikant erachtet. Die Ergebnisse sind in den Diagrammen als Mittelwert angegeben, die Fehlerbalken repräsentieren den Standardfehler des Mittelwerts.

3 Ergebnisse

3.1 Störung der alveolokapillären Schranke nach Thoraxtrauma und Sepsis

Um das Maß der Störung der alveolokapillären Schranke zu quantifizieren, wurde das Gesamtprotein in der BAL bestimmt. Die Menge des Gesamtproteins kann als ein Indikator des Lungenschadens fungieren, da mit erhöhter Permeabilität der Kapillaren auch insgesamt der Übertritt von Proteinen aus dem Plasma in den Intraalveolarraum erleichtert wird.

Nach Thoraxtrauma und Sepsis war gegenüber der Sham-Prozedur zum Zeitpunkt 12 h ein erhöhtes Gesamtprotein in der BALF bei Wildtyp Mäusen zu beobachten (Abbildung 2). Bei $C5^{-/-}$ Mäusen war dieser Integritätsverlust sehr ausgeprägt mit einem gegenüber Sham sowie auch Wildtyp signifikant höheren Gesamtprotein in der BALF.

3.2 Migration von neutrophilen Granulozyten

Um die Unterschiede zwischen der in die Lunge migrierten neutrophilen Granulozyten zu quantifizieren wurde die Myeloperoxidaseaktivität in homogenisiertem Lungengewebe bestimmt. Bei C5-defizienten Tieren konnten nach Thoraxtrauma und Sepsis eine sowohl gegenüber Wildtyp nach Double-Hit als auch gegenüber $C5^{-/-}$-Tieren nach Sham-Prozedur signifikant höhere MPO-Aktivität nachgewiesen werden (Abbildung 2). Bei $C5^{+/+}$-Tieren zeigte sich in der BALF nach Double-hit zum Zeitpunkt 12 h bei eine erhöhte Aktivität der MPO in homogenisiertem Lungengewebe gegenüber Sham.

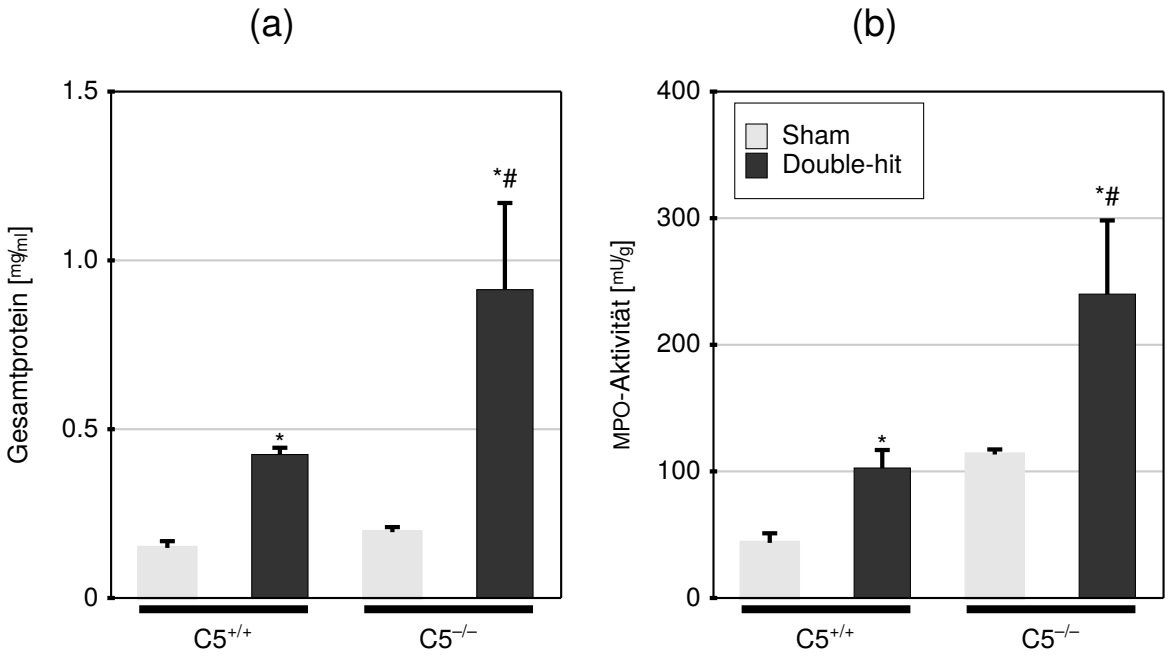

Abbildung 2: (a) Gesamtprotein bestimmt aus BALF 12 h nach Double-Hit. *p<0.05 vs. korrespondierende Sham-Gruppe, #p<0.05 vs. korrespondierende $C5^{+/+}$-Gruppe (One Way ANOVA; Sidak's multiple comparison Test), n=7. (b) MPO-Aktivität [mU/g] in der Lunge 12 h nach Double-Hit. *p<0.05 vs. korrespondierende Sham-Gruppe, #p<0.05 vs. korrespondierende $C5^{+/+}$-Gruppe (One Way ANOVA; Sidak's multiple comparison Test), n=7. Nach [51], veröffentlicht unter CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.

3.3 Zytokinprofil

3.3.1 Abschwächung der systemischen Entzündungsreaktion nach Thoraxtrauma und Sepsis bei C5-Defizienz

Als Parameter für die systemische Entzündungsreaktion nach Thoraxtrauma und Sepsis wurden die proinflammatorischen Chemokine KC und MCP-1 im Plasma bestimmt (Abbildung 3).

Signifikant höhere Konzentrationen von sowohl KC als auch MCP-1 im Plasma fanden sich bei $C5^{+/+}$-Mäusen nach Double-Hit gegenüber Sham. Bei $C5^{-/-}$-Tieren war der systemische Anstieg von KC und MCP-1 gegenüber $C5^{+/+}$-Tieren nach Double-Hit si-

gnifikant geringer ausgeprägt, der Unterschied zu Tieren mit Sham-Prozedur hingegen war nicht signifikant.

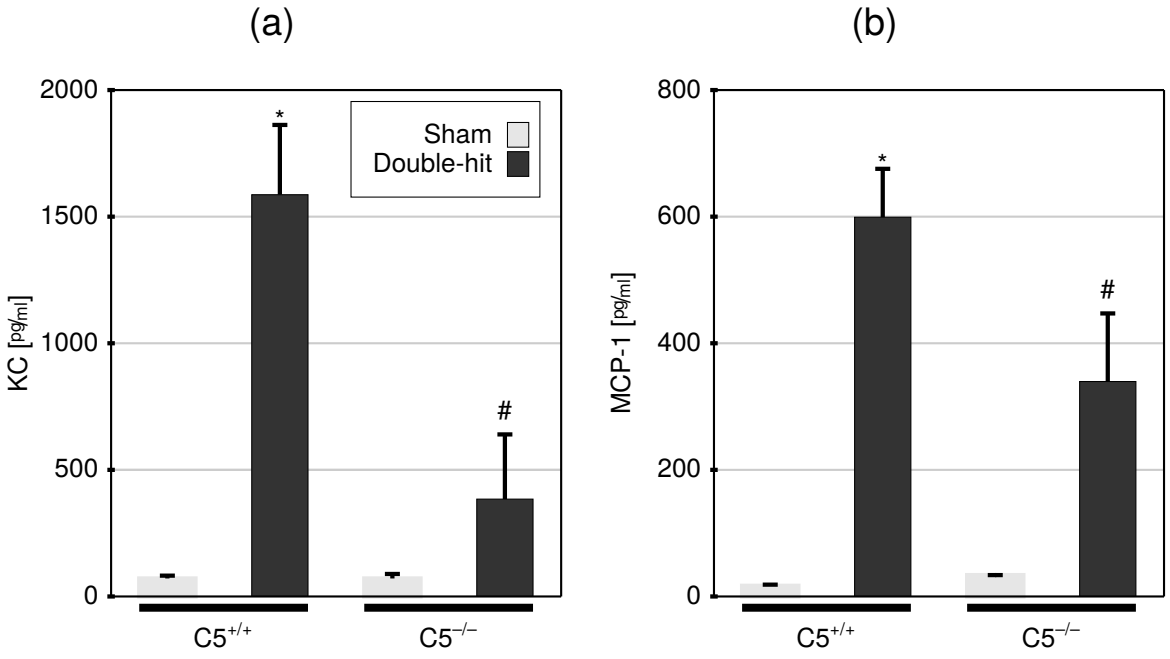

Abbildung 3: (a) KC-Konzentration [pg/ml] und (b) MCP-1-Konzentration [pg/ml] im Plasma 12 h nach Double-Hit. *p<0.05 vs. korrespondierende Sham-Gruppe, #p<0.05 vs. korrespondierende $C5^{+/+}$-Gruppe (One Way ANOVA gefolgt von Sidak's multiple comparison Test). n=7. Nach [51], veröffentlicht unter CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.

3.3.2 Vermehrt proinflammatorische Mediatoren in der BALF bei C5-Defizienz

Einzelne proinflammatorische Mediatoren wurden nach Thoraxtrauma und Sepsis in der mittels BAL gewonnen Flüssigkeit quantifiziert (Abbildung 4).

Nach Double-Hit wurden in $C5^{-/-}$-Mäusen erhöhte Konzentrationen von IL-6, MCP-1 sowie G-CSF nachgewiesen. Diese Mediatoren waren in der BALF von C5-defizienten Tieren sowohl gegenüber Sham als auch insbesondere gegenüber $C5^{+/+}$-Mäusen nach Double-Hit signifikant erhöht. Bei $C5^{+/+}$-Mäusen konnte ein signifikanter Anstieg von G-CSF und KC verzeichnet werden. Konzentrationen von IL-6 und MCP-1 in der BALF von

$C5^{+/+}$-Tieren waren tendenziell gegenüber Sham-Prozedur erhöht; dieser Unterschied war jedoch für Double-Hit verglichen mit Sham statistisch nicht signifikant.

3.3.3 Lokale Entzündungsreaktion im Lungengewebe nicht durch C5-Defizienz beeinflusst

Die Menge proinflammatorischer Mediatoren wurde in homogenisiertem Lungengewebe bestimmt um die lokale Entzündungsreaktion auf Organebene zu quantifizieren (Abbildung 5).

Nach Double-Hit zeigten sich statistisch signifikant erhöhte Werte für IL-6, MCP-1, G-CSF und KC gegenüber Sham in Wildtyp Mäusen. Bei C5-Defizienz zeigten sich ebenfalls nach Double-Hit statistisch signifikant erhöhte Werte für IL-6, MCP-1 und G-CSF gegenüber Sham. $C5^{-/-}$-Mäuse nach Double-Hit zeigten für diese Mediatoren im Lungengewebe gegenüber $C5^{+/+}$-Mäusen nach Double-Hit keine signifikanten Unterschiede. KC zeigte sich bei $C5^{-/-}$ Mäusen tendenziell erhöht, der Unterschied gegenüber Sham war jedoch nicht statistisch signifikant. Zwischen C5-defizienten Tieren gegenüber Wildtyp ließen sich keine statistisch signifikanten Unterschiede nachweisen.

3.4 Verminderte Apoptose bei C5-Defizienz

Als Maß für die bei ALI als einer der grundlegenden Pathomechanismen geltenden Apoptose wurde aktive Caspase-3 in homogenisiertem Lungengewebe semiquantitativ via Western Blot nachgewiesen (Abbildung 6).

Gegenüber Wildtyp Mäusen ist hier bei C5-Knockout-Mäusen nach Double-Hit deutlich weniger aktive Caspase-3 nachzuweisen. Im Vergleich zur Sham-Prozedur lässt sich bei Wildtyp-Mäusen signifikant mehr aktive Caspase-3 nachweisen, bei C5-Defizienz zeigt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Thoraxtrauma und Sepsis im Vergleich mit Sham-Prozedur.

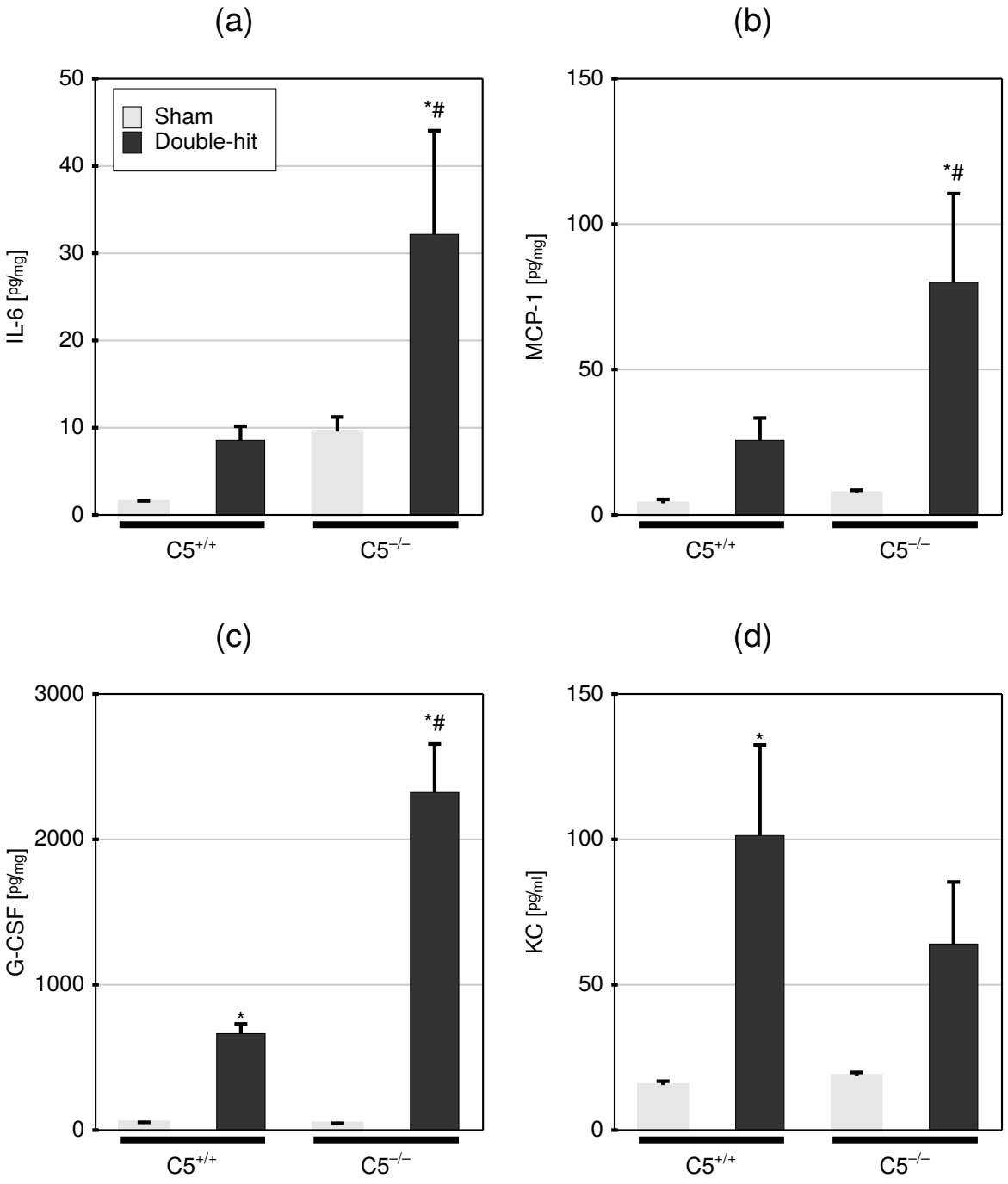

Abbildung 4: (a) IL-6, (b) MCP-1, (c) G-CSF und (d) KC in der BALF 12 h nach Double-Hit. *p<0.05 vs. korrespondierende Sham-Gruppe, #p<0.05 vs. korrespondierende $C5^{+/+}$-Gruppe (One Way ANOVA; Sidak's multiple comparison Test). n=7. Nach [51], veröffentlicht unter CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.

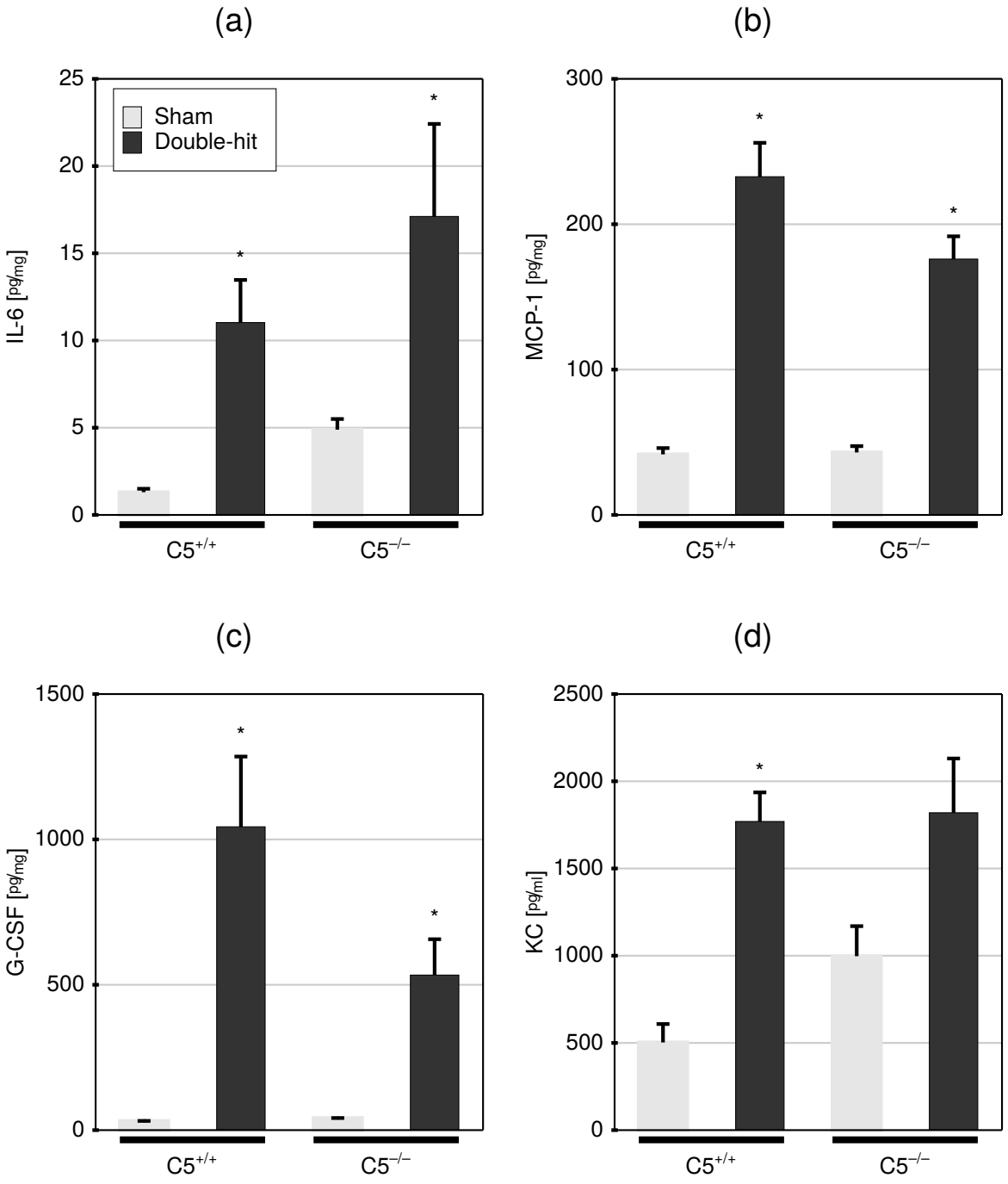

Abbildung 5: (a) IL-6, (b) MCP-1, (c) G-CSF und (d) KC in homogenisiertem Lungengewebe 12 h nach Double-Hit. *p<0.05 vs. korrespondierende Sham-Gruppe, #p<0.05 vs. korrespondierende $C5^{+/+}$-Gruppe (One Way ANOVA; Sidak's multiple comparison Test). n=7. Nach [51], veröffentlicht unter CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.

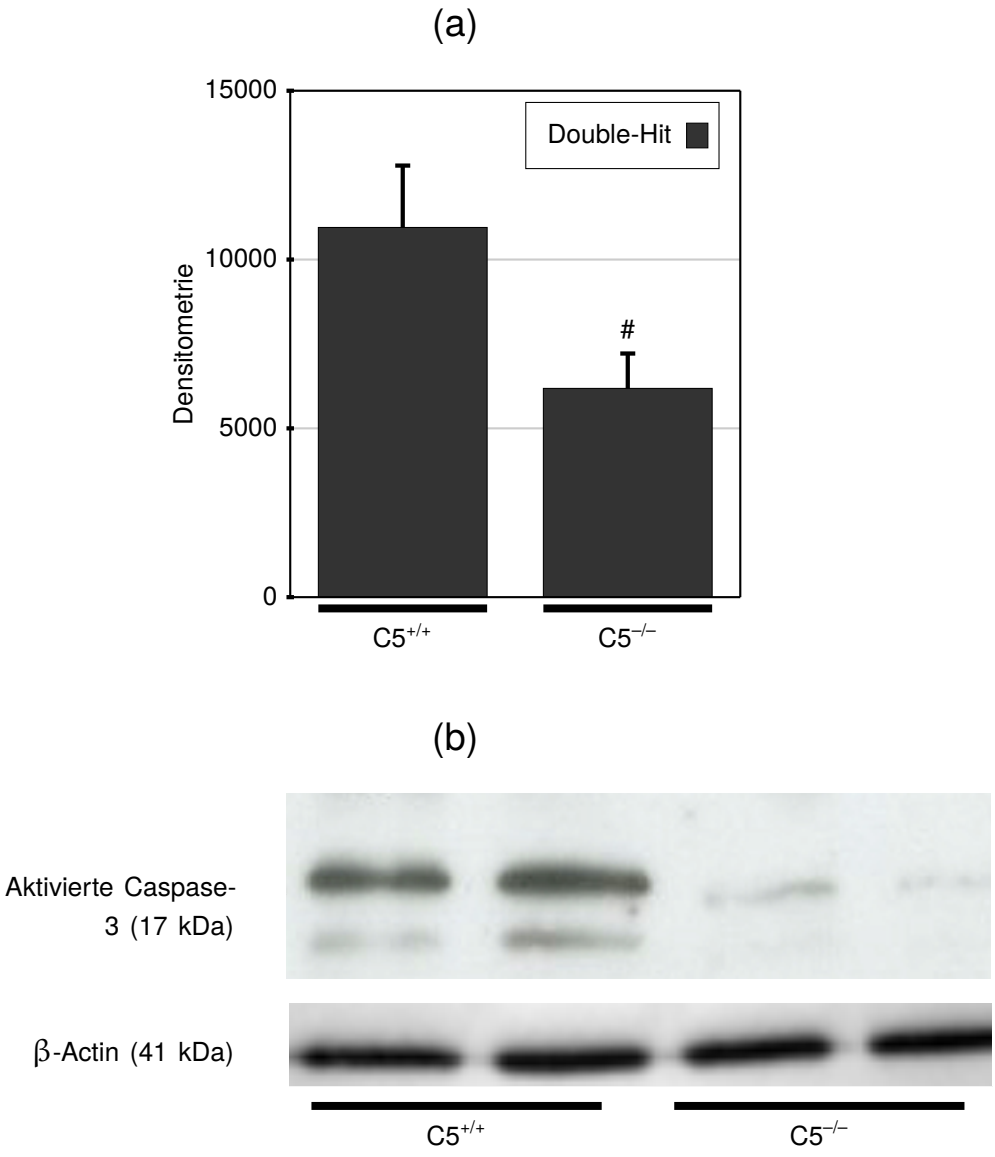

Abbildung 6: (a) Ergebnisse der Densitometrie von drei jeweils unabhängigen Western-Blots für aktivierte Caspase-3 bestimmt aus homogenisiertem Lungengewebe 12 h nach Double-Hit. #p<0.05 vs. korrespondierende $C5^{+/+}$-Gruppe (One Way ANOVA; Sidak's multiple comparison Test). n=7 (b) Western-Blot für aktivierte Caspase-3 aus jeweils zwei Tieren aus der Double-Hit oder der Sham-Gruppe sowie korrespondierende Western-Blots für β-Actin. Nach [51], veröffentlicht unter CC BY 4.0 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode.

4 Diskussion

Trotz aller Forschungsbemühungen der vergangenen Jahrzehnte ist das ARDS beziehungsweise die ALI mit einer hohen Mortalität behaftet. Es existiert zwar eine Reihe supportiver Therapiestrategien, diese konnten die Mortalität dieses gravierenden Krankheitsbildes jedoch nur wenig beeinflussen [82]. Ein kausale Therapie, die durch Beeinflussung eines pathophysiologisch relevanten Faktors das Krankheitsgeschehen wirksam abmildert, existiert in der klinischen Praxis bisher nicht [82].

Einer der Ansätze, die Pathophysiologie des ARDS näher zu verstehen, ist die Aktivierung des Komplementsystems im Rahmen dieses Krankheitsgeschehens [10]. Das Komplementsystem ist ein zentraler Bestandteil unseres Immunsystems und spielt eine Schlüsselrolle in der Abwehr von Pathogenen [108]. Die übermäßige Aktivierung dieses Systems kann jedoch bestimmte Krankheitsbilder wie beispielsweise Sepsis verschlechtern [47]. Bei Mäusen verbessert die Blockade oder das Fehlen des C5aR wie auch des C5a-Rezeptor 2, ehemals C5L2 (C5AR2)-Rezeptors die Überlebensrate bei mittelgradiger und schwerer durch CLP induzierter Sepsis [88]. Mit einem polyklonalen, gegen C5a gerichteten Antikörper lässt sich die Überlebensrate bei Sepsis in Mäusen ebenfalls verbessern [15]. Auch kann die Migration von PMN in die Lunge nach durch CLP induzierter Sepsis mittels C5aR-Blockade vermindert werden [36]. Bei ALI induziert durch intrapulmonale Deposition von IgG-Immunkomplexen und nachfolgender CLP-induzierter Sepsis mildert die Blockade des C5aR ebenfalls den Lungenschaden ab [14].

Die Aktivierung des Komplementsystems beziehungsweise eine kausale Rolle in der Pathophysiologie des ARDS konnte jedoch nicht nur nach Sepsis sondern auch nach Thoraxtrauma gezeigt werden. So konnte in einem Tiermodell mit isoliertem Thoraxtrauma eine komplementabhängige Aktivierung von PMN mit nachfolgender systemischer Entzündungsreaktion gezeigt werden [26]. Die Blockade von C5a führte hier zu einer

Reduktion der PMN-Zahl in der BAL und Aufhebung der initialen Immunparalyse der PMN nach Thoraxtrauma [26].

Beim Menschen entwickelt sich in 17 % der Fälle ein ARDS nach Thoraxtrauma [5]. Im Rahmen einer Sepsis sind es sogar bis zu 38 % mit entsprechend hoher Letalität. In dieser Arbeit kam ein »Double-hit«-Modell, kombiniert aus Thoraxtrauma mit konsekutiver polymikrobieller Sepsis, zum Einsatz. Für den Einsatz solch eines »Double-hit«-Modells spricht, dass es die genannten klinischen Gegebenheiten in der Entwicklung einer ALI beim Menschen besser wiederspiegelt [62]. So wurde für das verwendete Mausmodell, in welchem eine polymikrobielle Sepsis, die dem Thoraxtrauma folgt, gezeigt, dass dies mit einer wesentlich höheren Mortalität vergesellschaftet ist als das Thoraxtrauma oder eine moderate Sepsis per se [77]. Die klinische Relevanz dieses Krankheitsbildes wird deutlich, wenn man bedenkt, dass das Thoraxtrauma die zweithäufigste tödliche Verletzung bei Trauma-Patienten repräsentiert [94]. In einem »Double-hit«-Modell aus Thoraxtrauma und intratrachealer Lipopolysaccharide (LPS)-Instillation konnte gezeigt werden, dass das Komplementsystem in diesem Modell für ein »Priming« der Immunreaktion auf den »Second hit« verantwortlich ist [45]. Im Unterschied zu jener Untersuchung kam in vorliegender Arbeit ein CLP-Modell als »Second Hit« zur Anwendung, welches als Goldstandard für Sepsis in Nagern beschrieben wurde [89]. In durch CLP induzierter Sepsis finden sich systemisch vermehrt pathogen associated molecular pattern (PAMPs) durch Migration von Bakterien der Darmflora ins Peritoneum als auch damage associated molecular pattern (DAMPs), welche durch das Gewebetrauma des Eingriffes freigesetzt werden [87]. Hierbei kommt es ähnlich der Sepsis beim Menschen zu einem prolongierten Anstieg proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 oder TNF-α, hingegen kommt es bei Injektion von LPS zu einem raschen Anstieg dieser Mediatoren [17]. Gegen proinflammatorische Zyotkine wie TNF-α gerichtete Therapien haben sich jedoch bislang als erfolglos erwiesen [25]. Gerade unter diese Umständen ist die Rolle des Komplementsystems, insbesondere hinsichtlich der Ausbildung einer ALI, nicht hinreichend geklärt, und könnte ebenfalls eine weitere therapeutische Option darstellen.

Inflammation ist eines der zentralen Merkmale in tierexperimentellen ALI-Modellen [61]. Die Ergebnisse aus den Messungen in vorliegender Arbeit zeigen, dass das Fehlen von C5 insgesamt höhere Konzentrationen proinflammatorischer Mediatoren in der BALF nach Thoraxtrauma und Sepsis zur Folge hat. Dies wurde für MCP-1, G-CSF und

IL-6 gezeigt. Es ist bekannt, dass C5a nebst proinflammatorischer Funktionen auch anti-inflammatorisch wirken kann. In einem Modell von IgG-Immunkomplex vermittelter ALI setzten C5AR2-defiziente Mäuse lokal vermehrt IL-6 und auch TNF-α frei [31]. In einem CLP-Modell an Ratten zeigte die Blockade von C5a mittels Antikörper hinsichtlich der Inflammation, je nach Kompartiment, unterschiedliche Effekte: während im Plasma so eine Senkung der Zytokin-Spiegel erreicht wurde, stiegen sie in der Peritonealflüssigkeit [12]. An murinen Peritonealmakrophagen konnte man nachweisen, dass C5a auf diese eine anti-inflammatorische Wirkung besitzt, und die Freisetzung einer ganzen Reihe von proinflammatorischen Mediatoren, darunter auch IL-6 und MCP-1, gehemmt wird [9]. Auch auf humane Monozyten, die mit Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor (GM-CSF) oder Macrophage-Colony Stimulating Factor (M-CSF) zu Makrophagen ausdifferenziert wurden, hatte C5a hinsichtlich der Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6 ebenfalls einen dämpfenden Effekt [93]. Möglicherweise sind die erhöhten Spiegel proinflammatorischer Mediatoren in der BALF durch die fehlende Interaktion von C5a mit seinem C5AR2-Rezeptor und dem hierduch vermittelten antiinflammatorischen Effekt bedingt. Diese Daten stehen in Übereinstimmung mit vorliegender Arbeit und suggerieren, dass das Fehlen von C5a einen akuten Lungenschaden bzw. als zentrales Merkmal dieses Krankheitsbildes die lokale Inflammation nicht abmildert, sondern durch fehlende lokale anti-inflammatorische Effekte aggravieren kann. Insgesamt fällt ein unterschiedliches Zytokin-Profil im Vergleich von BALF und in Lungengewebe auf. Die in der BALF gemessenen Zytokine und Chemokine sind insofern wichtig, als dass sie den tatsächlich von Zellen freigesetzten, biologisch aktiven Anteil repräsentieren. In den aus Lungengewebe bestimmten Spiegeln haben sowohl intrazelluläre als auch im Blut befindliche Spiegel einen Einfluss.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich im Plasma signifkant niedrigere Spiegel von MCP-1 und KC bei $C5^{-/-}$-Mäusen gegenüber Wildtyp. In einer früheren Arbeit konnte gezeigt werden, dass in $C5^{-/-}$-Mäusen 24 Stunden nach CLP-induzierter Sepsis niedrige Plasmaspiegel proinflammatorischer Mediatoren wie IL-6 und MCP-1 mit beeinträchtigter Beseitigung von Bakterien aus dem Blut einhergehen. Möglicherweise fungiert C5a als Supressor für Genexpression von IL-6 in Endothelzellen. So wird beispielsweise die Genexpression von IL-6 in HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) Zellen, welche mit C5a inkubiert werden, supprimiert [67].

Bei ARDS-Patienten wurden in der BALF sowohl vermehrt PMN als auch erhöhte Spiegel proinflammatorisch wirkender Mediatoren nachgewiesen [82] KC ist ein im Rahmen der ALI in der Lunge produziertes Chemokin, welches sowohl im Rahmen der indirekten als auch der direkten ALI erhöht sein kann [57, 79]. In einem Modell der indirekten ALI von hämorrhagischem Schock und konsekutiver Sepsis, induziert durch CLP, wirkte KC als eines der entscheidenden Chemokine zur Rekrutierung von PMN in der Lunge, und damit als ein Hauptmediator des Lungenschadens [57]. Die signifikant niedrigeren KC-Spiegel im Plasma nach Double-Hit bei $C5^{-/-}$-Tieren gegenüber Wildtyp decken sich mit anderen Untersuchungen, in denen gezeigt werden konnte dass nach Gabe eines C5a-Antikörpers die sonst nach CLP beobachtete vermehrte Expression von KC messenger RNA (mRNA) signifikant reduziert wurde. In der vorliegenden Arbeit legen die beobachteten niedrigen Konzentrationen von KC zusammen mit erhöhter Aktivität von MPO bei C5-Defizienz nahe, dass andere Substanzen bei der Rekrutierung von Neutrophilen in den Alveolarraum nach Double-Hit wie beispielsweise IL-6 eine Rolle spielen.

Apoptose ist wie die Inflammation ein zentrales Merkmal der Pathophysiologie der ALI [61]. Patienten, die an einem ARDS verstarben, zeigten vermehrt apoptotische Typ II Alveolarzellen in der BALF [7]. Darüberhinaus ist auch für das in vorliegender Arbeit verwendete Modell von Thoraxtrauma und Sepsis eine entscheidende Rolle der Apoptose im Pathomechanismus bekannt [78]. In vorliegender Arbeit konnte C5-defizienten Mäusen in der Lunge weniger aktivierte Caspase-3 gegenüber $C5^{+/+}$ Mäusen nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen; so wurde nachgewiesen, dass Apoptose in Thymozyten nach CLP durch C5a-Blockade deutlich reduziert wird [34].

4.1 Limitationen

In vorliegender Arbeit wurde mit n = 7 nur eine begrenzte Zahl an Tieren sowie nur ein Zeitpunkt untersucht. Ein Vergleich von $C5aR1^{-/-}$ sowie $C5AR2^{-/-}$ Mäusen liegt nicht vor. In Überlebensstudien eines Mausmodells mit CLP-Sepsis erreichen $C5aR1^{-/-}$ sowie $C5AR2^{-/-}$ Tiere signifikant bessere Überlebensraten [89], während $C5^{-/-}$ Tiere früher versterben. Daten zu $C5aR1^{-/-}$ sowie $C5AR2^{-/-}$ Mäusen in einem Tiermodell aus Thoraxtrauma und Sepsis liegen bisher nicht vor. MPO korreliert nur bedingt mit der

Anzahl der in der Lunge befindlicher PMN, da die MPO eher den Status der Aktivierung wiederspiegelt. Deshalb kann der Autor nur spekulieren, dass PMN bei Defizienz von C5 durch andere chemotaktische Mechanismen migrieren. Desweiteren wurde gezeigt, dass C5-Knockout-Mäuse im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen eine Neutropenie nach CLP entwickeln. Die aktuelle Arbeit zeigt, abhängig vom Kompartiment wie beispielsweise Plasma oder BALF, von C5 abhängige als auch unabhängige Ergebnisse. Dies legt die Beteiligung weiterer Bestandteile des angeborenen Immunsystems wie zum Beispiel Toll-like Rezeptoren (TLRs) nahe [44].

4.2 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit, welche ein Double-Hit-Modell von Thoraxtrauma und konsekutiver Sepsis untersucht, konnten sowohl C5-abhängige Effekte wie beispielsweise die Aktivierung von Caspase-3, als auch signifikant alterierte Spiegel von Zytokinen im Plasma als auch der BALF, als auch C5-unabhängige Effekte wie den Anstieg verschiedener Zytokine in der Lunge beobachtet werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Immunantwort nach Thoraxtrauma und Sepsis nicht nur durch Komplement diktiert wird; andere Mechanismen der Immuntantwort bei ARDS wie die Aktivierung des Immunsystems durch TLRs oder Nod-like Rezeptoren (NLRs) ist ebenfalls Gegenstand aktueller Forschung [39].

5 Zusammenfassung

Inhibition der Wirkung des Anaphylatoxins C5a hat sich in der Vergangenheit benefiziell auf die Verläufe verschiedener tierexperimenteller akuter Lungenschaden (ALI)-Modelle ausgewirkt. Hierzu zählen die Immunkomplex-vermittelte ALI, Cecal Ligation and Puncture (CLP)-assoziierte ALI, sowie durch isoliertes Thoraxtrauma verursachte ALI. In vorliegender Arbeit wurde untersucht, inwiefern C5a in einem klinisch relevanten Double-hit Modell von Thoraxtrauma und polymikrobieller Sepsis die Inflammation in der Lunge sowie die Apoptose beeinträchtigt. Hierzu wurden $C5^{-/-}$ Mäuse einem stumpfen Thoraxtrauma ausgesetzt und 24 Stunden später eine polymikrobiellen Sepsis induziert oder eine korrespondierende Sham-Prozedur für die Kontrollgruppen durchgeführt. Die Proben wurden zum Zeitpunkt 12 Stunden nach CLP gewonnen. Als Zeichen einer abgeschwächten systemischen Entzündungsreaktion waren Keratinocyte chemoattractant (KC) und Monocyte Chemotattractant Protein-1 (MCP-1) im Plasma bei $C5^{-/-}$ Mäusen stark reduziert. Die Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-6 (IL-6), MCP-1 sowie Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) in der bronchoalveolären Lavage war bei C5-Defizienz jedoch deutlich erhöht. Ebenso konnte das Fehlen von C5 die Myeloperoxidase (MPO)-Aktivität in der Lunge als Indikator für die polymorphkernige neutrophile Granulozyten (PMN)-Migration in vorliegendem ALI-Modell nicht senken. In $C5^{-/-}$ Mäusen konnte zwar weniger aktive Caspase-3 im Lungengewebe nachgewiesen werden, dennoch war das Gesamtprotein in der BAL gegenüber Wildtyp deutlich erhöht. So konnte in vorliegender Arbeit gezeigt werden, dass in einem klinisch relevanten Double-Hit Modell der Thoraxtrauma-induzierten septischen akuten Lungenverletzung C5-Defizienz Apoptose in der Lunge positiv beeinflusst, insgesamt jedoch weder eine überschiessende Inflammation noch die Migration von PMN in die Lunge reduziert werden konnte.

6 Literatur

[1] Adhikari N K, Burns K E, Friedrich J O, Granton J T, Cook D J und Meade M O: Effect of nitric oxide on oxygenation and mortality in acute lung injury: systematic review and meta-analysis. BMJ 334: 779 (2007).

[2] Albertine K H, Soulier M F, Wang Z, Ishizaka A, Hashimoto S, Zimmerman G A, Matthay M A und Ware L B: Fas and fas ligand are up-regulated in pulmonary edema fluid and lung tissue of patients with acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. Am J Pathol 161: 1783–1796 (2002).

[3] Antonelli M, Moro M L, Capelli O, De Blasi R A, D'Errico R R, Conti G, Bufi M und Gasparetto A: Risk factors for early onset pneumonia in trauma patients. Chest 105: 224–228 (1994).

[4] Ashbaugh D G, Bigelow D B, Petty T L und Levine B E: Acute respiratory distress in adults. Lancet 2: 319–23 (1967).

[5] Atabai K und Matthay M A: The pulmonary physician in critical care. 5: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: definitions and epidemiology. Thorax 57: 452–458 (2002).

[6] Azoulay E, Darmon M, Delclaux C, Fieux F, Bornstain C, Moreau D, Attalah H, Le Gall J.-R und Schlemmer B: Deterioration of previous acute lung injury during neutropenia recovery. Crit Care Med 30: 781–786 (2002).

[7] Bachofen M und Weibel E: Structural alterations of lung parenchyma in the adult respiratory distress syndrome. Clin Chest Med 3: 35 (1982).

[8] Bindl L, Dresbach K und Lentze M J: Incidence of acute respiratory distress syndrome in German children and adolescents: a population-based study. Crit Care Med 33: 209–312 (2005).

[9] Bosmann M, Haggadone M D, Zetoune F S, Sarma J V und Ward P A: The interaction between C5a and both C5aR and C5L2 receptors is required for production of G-CSF during acute inflammation. Eur J Immunol 43: 1907–1913 (2013).

[10] Bosmann M und Ward P A: Role of C3, C5 and anaphylatoxin receptors in acute lung injury and in sepsis. *Current Topics in Innate Immunity II*. Springer, 2012: 147–159.

[11] Brun-Buisson C, Minelli C, Bertolini G, Brazzi L, Pimentel J, Lewandowski K, Bion J, Romand J.-A, Villar J, Thorsteinsson A et al.: Epidemiology and outcome of acute lung injury in European intensive care units. Intensive Care Med 30: 51–61 (2004).

[12] Buras J A, Rice L, Orlow D, Pavlides S, Reenstra W R, Ceonzo K und Stahl G L: Inhibition of C5 or absence of C6 protects from sepsis mortality. Immunobiology 209: 629–635 (2004).

[13] Chaudry I, Ayala A, Singh G, Wang P und Hauptman J: Rodent models of endotoxemia and sepsis. *Pathophysiology of Shock, Sepsis, and Organ Failure*. Springer, 1993: 1048–1059.

[14] Czermak B J, Breckwoldt M, Ravage Z B, Huber-Lang M, Schmal H, Bless N M, Friedl H P und Ward P A: Mechanisms of enhanced lung injury during sepsis. Am J Pathol 154: 1057–1065 (1999).

[15] Czermak B J, Sarma V, Pierson C L, Warner R L, Huber-Lang M, Bless N M, Schmal H, Friedl H P und Ward P A: Protective effects of C5a blockade in sepsis. Nat Med 5: 788–792 (1999).

[16] De Campos T et al.: Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. N Engl J Med 342: 1301–1308 (2000).

[17] Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E und Libert C: Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? Trends Microbiol 19: 198–208 (2011).

[18] Doering E B, Hanson III C W, Reily D J, Marshall C und Marshall B E: Improvement in oxygenation by phenylephrine and nitric oxide in patients with adult respiratory distress syndrome. Anesthesiology 87: 18–25 (1997).

[19] Doerschuk C M: Leukocyte trafficking in alveoli and airway passages. Respir Res 1: 136 (2000).

[20] Doerschuk C M: Mechanisms of leukocyte sequestration in inflamed lungs. Microcirculation 8: 71–88 (2001).

[21] Doerschuk C M, Tasaka S und Wang Q: CD11/CD18-dependent and-independent neutrophil emigration in the lungs: how do neutrophils know which route to take? Am J Respir Cell Mol Biol 23: 133–136 (2000).

[22] Ertel W, Keel M, Buergi U, Hartung T, Imhof H.-G und Trentz O: Granulocyte colony-stimulating factor inhibits neutrophil apoptosis at the local site after severe head and thoracic injury. J Trauma Acute Care Surg 46: 784–793 (1999).

[23] Ertel W, Keel M, Infanger M, Ungethum U, Steckholzer U und Trentz O: Circulating mediators in serum of injured patients with septic complications inhibit neutrophil apoptosis through up-regulation of protein-tyrosine phosphorylation. J Trauma Acute Care Surg 44: 767–776 (1998).

[24] Esan A, Hess D R, Raoof S, George L und Sessler C N: Severe Hypoxemic Respiratory Failure: Part 1 – Ventilatory Strategies. Chest 137: 1203–1216 (2010).

[25] Eskandari M K, Bolgos G, Miller C, Nguyen D T, DeForge L und Remick D: Anti-tumor necrosis factor antibody therapy fails to prevent lethality after cecal ligation and puncture or endotoxemia. J Immunol 148: 2724–2730 (1992).

[26] Flierl M A, Perl M, Rittirsch D, Bartl C, Schreiber H, Fleig V, Schlaf G, Liener U, Brueckner U B, Gebhard F und Huber-Lang M S: The role of C5a in the innate immune response after experimental blunt chest trauma. Shock 29: 25–31 (2008).

[27] Force A D T, Ranieri V, Rubenfeld G et al.: Acute respiratory distress syndrome: The Berlin Definition. JAMA 307: 2526–2533 (2012).

[28] Gadek J E und Pacht E R: The interdependence of lung antioxidants and antiprotease defense in ARDS. Chest 110: 273S–277S (1996).

[29] Gattinoni L und Caironi P: Refining ventilatory treatment for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. JAMA 299: 691–693 (2008).

[30] Gattinoni L, Carlesso E, Taccone P, Polli F, Guerin C und Mancebo J: Prone positioning improves survival in severe ARDS: a pathophysiologic review and individual patient meta-analysis. Minerva Anestesiol 76: 448–454 (2010).

[31] Gerard N P, Lu B, Liu P, Craig S, Fujiwara Y, Okinaga S und Gerard C: An anti-inflammatory function for the complement anaphylatoxin C5a-binding protein, C5L2. J Biol Chem 280: 39677–39680 (2005).

[32] Girard T D und Bernard G R: Mechanical Ventilation in ARDSA State-of-the-Art Review. Chest 131: 921–929 (2007).

[33] Guo R F und Ward P A: Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. Free Radic Biol Med 33: 303–310 (2002).

[34] Guo R.-F, Huber-Lang M, Wang X, Sarma V, Padgaonkar V A, Craig R A, Riedemann N C, McClintock S D, Hlaing T, Shi M M et al.: Protective effects of anti-C5a in sepsis-induced thymocyte apoptosis. J Clin Invest 106: 1271–1280 (2000).

[35] Guo R.-F, Riedemann N C und Ward P A: Role of C5a-C5aR interaction in sepsis. Shock 21: 1–7 (2004).

[36] Guo R.-F und Ward P A: Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. Free Radic Biol Med 33: 303–10 (2002).

[37] Guo R.-F und Ward P A: Role of C5a in inflammatory responses. Annu Rev Immunol 23: 821–852 (2005).

[38] Hammerschmidt D, Hudson L, Weaver L J, Craddock P und Jacob H: Association of complement activation and elevated plasma-C5a with adult respiratory distress syndrome: pathophysiological relevance and possible prognostic value. Lancet 315: 947–949 (1980).

[39] Han S und Mallampalli R K: The acute respiratory distress syndrome: from mechanism to translation. J Immunol 194: 855–860 (2015).

[40] Heard S O, Longtine K, Toth I, Puyana J C, Potenza B und Smyrnios N: The influence of liposome-encapsulated prostaglandin E1 on hydrogen peroxide concentrations in the exhaled breath of patients with the acute respiratory distress syndrome. Anesth Analg 89: 353–353 (1999).

[41] Herridge M S, Tansey C M, Matté A, Tomlinson G, Diaz-Granados N, Cooper A, Guest C B, Mazer C D, Mehta S, Stewart T E et al.: Functional disability 5 years after acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med 364: 1293–1304 (2011).

[42] Hodgson C, Keating J L, Holland A E, Davies A R, Smirneos L, Bradley S J und Tuxen D: Recruitment manoeuvres for adults with acute lung injury receiving mechanical ventilation. Cochrane Database Syst Rev 2: (2009).

[43] Hopkins R O und Herridge M S: Quality of life, emotional abnormalities, and cognitive dysfunction in survivors of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. Clin Chest Med 27: 679–689 (2006).

[44] Hoth J J, Wells J D, Brownlee N A, Hiltbold E M, Meredith J W, McCall C E und Yoza B K: Toll-like receptor 4 dependent responses to lung injury in a murine model of pulmonary contusion. Shock 31: 376 (2009).

[45] Hoth J J, Wells J D, Jones S E, Yoza B K und McCall C E: Complement mediates a primed inflammatory response after traumatic lung injury. J Trauma Acute Care Surg 76: 601–609 (2014).

[46] Huber-Lang M: Role of Complement in Multiorgan Failure. Clin Dev Immunol 2012: (2012).

[47] Huber-Lang M, Riedemann N C, Sarma J V, Younkin E M, McGuire S R, Laudes I J, Lu K T, Guo R F, Neff T A, Padgaonkar V A et al.: Protection of innate immunity by C5aR antagonist in septic mice. FASEB J 16: 1567–1574 (2002).

[48] Huber-Lang M, Sarma J V, Zetoune F S, Rittirsch D, Neff T A, McGuire S R, Lambris J D, Warner R L, Flierl M A, Hoesel L M et al.: Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. Nat Med 12: 682–687 (2006).

[49] Huber-Lang M, Younkin E M, Sarma J V, Riedemann N, McGuire S R, Lu K T, Kunkel R, Younger J G, Zetoune F S und Ward P A: Generation of C5a by phagocytic cells. Am J Pathol 161: 1849–1859 (2002).

[50] Huttenlocher A, Sandborg R R und Horwitz A F: Adhesion in cell migration. Curr Opin Cell Biol 7: 697–706 (1995).

[51] Kalbitz M, Karbach M, Braumueller S, Kellermann P, Gebhard F, Huber-Lang M und Perl M: Role of complement C5 in experimental blunt chest trauma-induced septic acute lung injury (ALI). PloS one 11: e0159417 (2016).

[52] Kitamura Y, Hashimoto S, Mizuta N, Kobayashi A, Kooguchi K, Fujiwara I und Nakajima H: Fas/FasL-dependent apoptosis of alveolar cells after lipopolysaccharide-induced lung injury in mice. Am J Respir Crit Care Med 163: 762–769 (2001).

[53] Knöferl M W, Liener U C, Seitz D H, Perl M, Bruckner U B, Kinzl L und Gebhard F: Cardiopulmonary, histological, and inflammatory alterations after lung contusion in a novel mouse model of blunt chest trauma. Shock 19: 519–525 (2003).

[54] Larsen G, Mitchell B und Henson P: The pulmonary response of C5 sufficient and deficient mice to immune complexes. Am Rev Respir Dis 123: 434 (1981).

[55] Laudanna C, Kim J Y, Constantin G und Butcher E C: Rapid leukocyte integrin activation by chemokines. Immunol Rev 186: 37–46 (2002).

[56] Lomas-Neira J, Chung C.-S, Perl M, Gregory S, Biffl W und Ayala A: Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 290: L51–L58 (2006).

[57] Lomas-Neira J L, Chung C.-S, Wesche D E, Perl M und Ayala A: In vivo gene silencing (with siRNA) of pulmonary expression of MIP-2 versus KC results in divergent effects on hemorrhage-induced, neutrophil-mediated septic acute lung injury. J Leukoc Biol 77: 846–853 (2005).

[58] Maniatis N A, Kotanidou A, Catravas J D und Orfanos S E: Endothelial pathomechanisms in acute lung injury. Vascul Pharmacol 49: 119–133 (2008).

[59] Martin T R und Matute-Bello G: Experimental models and emerging hypotheses for acute lung injury. Critical care clinics 27: 735 (2011).

[60] Matthay M A und Zimmerman G A: Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: four decades of inquiry into pathogenesis and rational management. Am J Respir Cell Mol Biol 33: 319 (2005).

[61] Matute-Bello G, Downey G, Moore B B, Groshong S D, Matthay M A, Slutsky A S und Kuebler W M: An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. Am J Respir Cell Mol Biol 44: 725–738 (2011).

[62] Matute-Bello G, Frevert C W und Martin T R: Animal models of acute lung injury. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295: L379–L399 (2008).

[63] Matute-Bello G, Lee J S, Liles W C, Frevert C W, Mongovin S, Wong V, Ballman K, Sutlief S und Martin T R: Fas-mediated acute lung injury requires fas expression on nonmyeloid cells of the lung. J Immunol 175: 4069–4075 (2005).

[64] Matute-Bello G, Liles W C, RADELLA F, Steinberg K P, Ruzinski J T, Jonas M, Chi E Y, Hudson L D und Martin T R: Neutrophil apoptosis in the acute respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 156: 1969–1977 (1997).

[65] Matute-Bello G, Liles W C, Steinberg K P, Kiener P A, Mongovin S, Chi E Y, Jonas M und Martin T R: Soluble Fas ligand induces epithelial cell apoptosis in humans with acute lung injury (ARDS). J Immunol 163: 2217–2225 (1999).

[66] Moloney E und Evans T: Pathophysiology and pharmacological treatment of pulmonary hypertension in acute respiratory distress syndrome. Eur Respir J 21: 720–727 (2003).

[67] Monsinjon T, Gasque P, Chan P, Ischenko A, Brady J J und Fontaine M: Regulation by complement C3a and C5a anaphylatoxins of cytokine production in human umbilical vein endothelial cells. FASEB J 17: 1003–1014 (2003).

[68] Moran J L, Chalwin R P und Graham P L: Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) reconsidered. Crit Care Resusc 12: 131–135 (2010).

[69] Muller-Eberhard H J: Molecular organization and function of the complement system. Annu Rev Biochem 57: 321–347 (1988).

[70] Mulligan M S, Schmid E, Beck-Schimmer B, Till G O, Friedl H P, Brauer R B, Hugli T E, Miyasaka M, Warner R L, Johnson K J und Ward P A: Requirement and role of C5a in acute lung inflammatory injury in rats. J Clin Invest 98: 503–512 (1996).

[71] Mulligan M S, Miyasaka M und Ward P A: Protective effects of combined adhesion molecule blockade in models of acute lung injury. Proc Assoc Am Physicians 108: 198–208 (1996).

[72] Nakamura M, Matute-Bello G, Liles W C, Hayashi S, Kajikawa O, Lin S.-M, Frevert C W und Martin T R: Differential response of human lung epithelial cells to fas-induced apoptosis. Am J Pathol 164: 1949–1958 (2004).

[73] Pepe P E, Potkin R T, Reus D H, Hudson L D und Carrico C J: Clinical predictors of the adult respiratory distress syndrome. Am J Surg 144: 124–130 (1982).

[74] Perl M, Chung C.-S, Lomas-Neira J, Rachel T.-M, Biffl W L, Cioffi W G und Ayala A: Silencing of Fas, but not caspase-8, in lung epithelial cells ameliorates pulmonary apoptosis, inflammation, and neutrophil influx after hemorrhagic shock and sepsis. Am J Pathol 167: 1545–1559 (2005).

[75] Perl M, Chung C.-S, Perl U, Lomas-Neira J, Paepe M de, Cioffi W G und Ayala A: Fas-induced pulmonary apoptosis and inflammation during indirect acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med 176: 591 (2007).

[76] Perl M, Gebhard F, Braumuller S, Tauchmann B, Bruckner U B, Kinzl L und Knoferl M W: The pulmonary and hepatic immune microenvironment and its contribution to the early systemic inflammation following blunt chest trauma. Crit Care Med 34: 1152–1159 (2006).

[77] Perl M, Gebhard F, Brückner U B, Ayala A, Braumüller S, Büttner C, Kinzl L und Knöferl M W: Pulmonary contusion causes impairment of macrophage and lymphocyte immune functions and increases mortality associated with a subsequent septic challenge*. Crit Care Med 33: 1351–1358 (2005).

[78] Perl M, Hohmann C, Denk S, Kellermann P, Lu D, Braumüller S, Bachem M G, Thomas J, Knöferl M W, Ayala A et al.: Role of activated neutrophils in chest trauma–induced septic acute lung injury. Shock 38: 98–106 (2012).

[79] Perl M, Kieninger M, Huber-Lang M S, Gross H.-J, Bachem M G, Braumüller S, Gebhard F, Ayala A und Knöferl M W: Divergent effects of activated neutrophils on inflammation, Kupffer cell/splenocyte activation, and lung injury following blunt chest trauma. Shock 37: 210–218 (2012).

[80] Perl M, Lomas-Neira J, Venet F, Chung C.-S und Ayala A: Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. Expert Rev Respir Med 5: 115–126 (2011).

[81] Petty T L und Ashbaugh D G: The adult respiratory distress syndrome. Clinical features, factors influencing prognosis and principles of management. Chest 60: 233–9 (1971).

[82] Pierrakos C, Karanikolas M, Scolletta S, Karamouzos V und Velissaris D: Acute respiratory distress syndrome: pathophysiology and therapeutic options. J Clin Med Res 4: 7 (2012).

[83] Pontes-Arruda A, DeMichele S, Seth A und Singer P: The use of an inflammation-modulating diet in patients with acute lung injury or acute respiratory distress syndrome: a meta-analysis of outcome data. JPEN J Parenter Enteral Nutr 32: 596–605 (2008).

[84] Puig N R, Ferrero P, Bay M L, Hidalgo G, Valenti J, Amerio N und Elena G: Effects of sevoflurane general anesthesia: immunological studies in mice. Int Immunopharmacol 2: 95–104 (2002).

[85] Putensen C, Zech S, WRIGGE H, Zinserling J, Stuber F, VON SPIEGEL T und Mutz N: Long-term effects of spontaneous breathing during ventilatory support in patients with acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med 164: 43–49 (2001).

[86] Reid K B und Porter R R: The proteolytic activation systems of complement. Annu Rev Biochem 50: 433–464 (1981).

[87] Remick D G, Newcomb D E, Bolgos G L und Call D R: Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. Shock 13: 110–116 (2000).

[88] Rittirsch D, Flierl M A, Nadeau B A, Day D E, Huber-Lang M, Mackay C R, Zetoune F S, Gerard N P, Cianflone K, Köhl J et al.: Functional roles for C5a receptors in sepsis. Nat Med 14: 551–557 (2008).

[89] Rittirsch D, Huber-Lang M S, Flierl M A und Ward P A: Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. Nat Protoc 4: 31–36 (2008).

[90] Roch A, Papazian L, Bregeon F, Gainnier M, Michelet P, Thirion X, Saux P, Thomas P, Jammes Y und Auffray J.-P: High or low doses of almitrine bismesylate in ARDS patients responding to inhaled NO and receiving norepinephrine? Intensive Care Med 27: 1737–1743 (2001).

[91] Rubenfeld G D und Herridge M S: Epidemiology and outcomes of acute lung injury. Chest 131: 554–562 (2007).

[92] Schneider C A, Rasband W S, Eliceiri K W, Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S et al.: 671 nih image to imageJ: 25 years of image analysis. Nat Methods 9: (2012).

[93] Seow V, Lim J, Iyer A, Suen J Y, Ariffin J K, Hohenhaus D M, Sweet M J und Fairlie D P: Inflammatory Responses Induced by Lipopolysaccharide Are Amplified in Primary Human Monocytes but Suppressed in Macrophages by Complement Protein C5a. J Immunol 191: 4308–4316 (2013).

[94] Shorr R M, Crittenden M, Indeck M, Hartunian S L und Rodriguez A: Blunt thoracic trauma. Analysis of 515 patients. Ann Surg 206: 200 (1987).

[95] Simmons R, Berdine G, Seidenfeld J, Prihoda T, Harris G, Smith J, Gilbert T, Mota E und Johanson Jr W: Fluid balance and the adult respiratory distress syndrome. Am Rev Respir Dis 135: 924 (1987).

[96] Solomkin J, Cotta L, Satoh P, Hurst J, Nelson R et al.: Complement activation and clearance in acute illness and injury: evidence for C5a as a cell-directed mediator of the adult respiratory distress syndrome in man. Surgery 97: 668–678 (1985).

[97] Stapleton R D, Wang B M, Hudson L D, Rubenfeld G D, Caldwell E S und Steinberg K P: Causes and timing of death in patients with ARDS. Chest 128: 525–32 (2005).

[98] Steinberg K P, Milberg J A, Martin T R, Maunder R J, Cockrill B A und Hudson L D: Evolution of bronchoalveolar cell populations in the adult respiratory distress syndrome. Am J Respir Crit Care Med 150: 113–122 (1994).

[99] Steinberg K, Hudson L, Goodman R, Hough C, Lanken P, Hyzy R, Thompson B, Ancukiewicz M et al.: Efficacy and safety of corticosteroids for persistent acute respiratory distress syndrome. N Engl J Med 354: 1671–1684 (2006).

[100] Sun L, Guo R.-F, Gao H, Sarma J V, Zetoune F S und Ward P A: Attenuation of IgG immune complex-induced acute lung injury by silencing C5aR in lung epithelial cells. FASEB J 23: 3808–3818 (2009).

[101] Suratt B T und Parsons P E: Mechanisms of acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. Clin Chest Med 27: 579–589 (2006).

[102] Suzuki K, Ota H, Sasagawa S, Sakatani T und Fujikura T: Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. Anal Biochem 132: 345–52 (1983).

[103] Suzuki T, Moraes T J, Vachon E, Ginzberg H H, Huang T.-T, Matthay M A, Hollenberg M D, Marshall J, McCulloch C A, Abreu M T H et al.: Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. Am J Respir Cell Mol Biol 33: 231 (2005).

[104] Vincent J.-L und Zambon M: Why do patients who have acute lung injury/acute respiratory distress syndrome die from multiple organ dysfunction syndrome? Implications for management. Clin Chest Med 27: 725–731 (2006).

[105] Vogt W: Cleavage of the fifth component of complement and generation of a functionally active C5b6-like complex by human leukocyte elastase. Immunobiology 201: 470–477 (2000).

[106] Ware L B, Koyama T, Billheimer D D, Wu W, Bernard G R, Thompson B T, Brower R G, Standiford T J, Martin T R und Matthay M A: Prognostic and pathogenetic value of combining clinical and biochemical indices in patients with acute lung injury. Chest 137: 288–296 (2010).

[107] Warshawski F, Sibbald W, Driedger A und Cheung H: Abnormal neutrophil-pulmonary interaction in the adult respiratory distress syndrome. Qualitative and quantitative assessment of pulmonary neutrophil kinetics in humans with in vivo/sup 111/indium neutrophil scintigraphy. Am Rev Respir Dis 5: 797–804 (1986).

[108] Yan C und Gao H: New insights for C5a and C5a receptors in sepsis. Front Immunol 3: 368 (2012).

Danksagung

Meinem Doktorvater, Prof. Dr. med. Mario Perl, gilt mein besonderer Dank für die geduldige Unterstützung und die engagierte Betreuung in praktischen und theoretischen Fragen.

Ebenso möchte ich Frau PD Dr. med. Miriam Kalbitz für die vielfältige Unterstützung, begonnen von der Einarbeitung bis zur Unterstützung bei der Fertigstellung des Manuskriptes danken. Weiterhin möchte ich mich bei Herrn. Prof. Dr. med. Markus Huber-Lang für die inhaltlichen und thematischen Anregungen bedanken.

Mein herzlicher Dank gilt allen Doktoranden und medizinisch-technischen AssistentInnen des Traumlabors Ulm, insbesondere Philipp Kellermann, Sonja Braumüller, Anke Schultze, Bettina Klohs, Christoph Hohmann und Mirko Messer, welche stets mit Rat und Tat zur Seite standen und für ein anregendes Arbeitsklima gesorgt haben.

Schlussendlich gilt mein ganz besonderer Dank meinen Eltern und meiner Familie für die Unterstützung in allen Belangen und Lagen in dieser Zeit und die kontinuierliche Motivation.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Vor- und Zuname	Michael Ching Karbach
Geburtsdatum, -ort	1986, Stuttgart
Nationalität	Deutsch

WEITERBILDUNG

seit 11/2020	Assistenzarzt am Institut für Intensivmedizin, *Universitätsspital Zürich*
04/2020–10/2020	Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie und Schutz und Rettung Zürich, *Universitätsspital Zürich*
04/2019–03/2020	Assistenzarzt auf der medizinischen Intensivstation, Institut für Intensivmedizin, *Universitätsspital Zürich*
09/2018–03/2019	Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie, Kardioanästhesie, *Universitätsspital Zürich*
06/2018–03/2019	Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie, *Universitätsspital Zürich*
01/2017–12/2017	Assistenzarzt medizinische Klinik, *Zuger Kantonsspital*
01/2016–12/2016	Assistenzarzt Anästhesiologie, *Spital Limmattal*
05/2015–10/2015	Assistenzarzt Anästhesiologie, *Universitätsklinikum Balgrist*
01/2014–12/2015	Assistenzarzt am Institut für Anästhesiologie, *Universitätsspital Zürich*

WEITERBILDUNG (FORTGESETZT)

10/2006–05/2013	Studium der Humanmedizin an der *Universität Ulm* mit erfolgreich absolvierter ärztlicher Prüfung 05/2013 Zweiter Abschnitt: 1,5 (sehr gut) Gesamtnote: 2,0 (gut)
09/1997–07/2006	Abitur am *Ernst-Sigle-Gymnasium, Kornwestheim* Abiturnote: 1,5

WISSENSCHAFTLICHE PUBLIKATIONEN

Kalbitz, M., Karbach, M., Braumueller, S., Kellermann, P., Gebhard, F., Huber-Lang, M., & Perl, M. (2016). Role of Complement C5 in Experimental Blunt Chest Trauma-Induced Septic Acute Lung Injury (ALI). PloS one, 11(7)

KURSE

10/2019	ATLS Provider
01/2019–02/2019	Good Clinical Practice, Module 1 und 2, Universitätsspital Zürich
01/2019	Praxisorientierter Luzerner Echokardiographie-Kurs, Luzern
12/2018	Intensivmedizin Basic Plus, Universitätsspital Zürich
01/2018	Notarztkurs nach Musterkursbuch der Bundesärztekammer, Berlin
11/2017	Kardioanästhesie nach den Empfehlungen der DGAI, Stuttgart
01/2016	16th Euro-PNB Winter Symposium, Postgraduate Course on peripheral Nerve Blockade, Crans-Montana
12/2015	Focused Transthoracic and Basic Perioperative Transesophageal Echocardiography, Sigriswil
10/2015	PALS Provider
05/2014	ACLS Provider

PRAKTISCHES JAHR

10/2012–01/2013	Chirurgie, *Stauferklinikum Mutlangen*
06/2012–10/2012	Anästhesiologie, *Universitätsspital Zürich*
02/2012–06/2012	Innere Medizin, *Stauferklinikum Mutlangen*

FAMULATUREN

03/2011	Anästhesie, *Krankenhaus St. Elisabeth, Ravensburg*
02/2011–03/2011	Chirurgie, *University Of The East Ramon Magsaysay Memorial Medical Center, Manila (Philippinen)*
08/2010–09/2010	Radiologie, *Robert-Bosch-Krankenhaus, Stuttgart*
02/2009–03/2009	Innere Medizin, *Caritas-Krankenhaus Bad Mergentheim*

STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN

2010	Freisemester für Labortätigkeit im Rahmen der Promotion
04/2009–02/2012	Tutortätigkeit im Wahlpflichtfach »klinische Anamneseerhebung« (Klinik für psychosomatische Medizin und Psychotherapie)
2009	Redaktionelle Mitarbeit am »POM26«, Jahrbuch für patientenorientierte MedizinerInnenausbildung der deutschsprachigen Anamnesegruppen
WS2009	Tutor der Arbeitsgruppe Notfallmedizin

Zürich, den 6. November 2020