

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik V

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Professor Dr. med. Jürgen Behr

**Antiinflammatorische Wirkung von Resveratrol auf die
IL-8- und GM-CSF-Expression in menschlichen
Alveolarmakrophagen-
ein Vergleich mit Dexamethason**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Haitham Hag

aus Haifa/Israel

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin:

Univ.-Prof. Dr. med. Andrea Koch

Mitberichterstatter:

Prof. Dr. Fritz Krombach

PD Dr. Sandra Frank

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jürgen Knobloch

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.2019

... meiner Frau Lea, meinen Söhnen (Jackie und Ghadie) und meinen Eltern
in Liebe gewidmet...

Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle ganz besonders bei

Univ.-Prof. Dr. med. Andrea Koch
und
Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Jürgen Knobloch

für die hervorragende Betreuung während des gesamten Zeitraums der Anfertigung
dieser Dissertation bedanken!

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1. Einleitung.....	1
1.1 Allgemeines.....	1
1.2 Alveolarmakrophagen	4
1.3 Zigarettenrauchen	5
1.4 Das Zytokin IL-8.....	6
1.5 GM-CSF.....	6
1.6 Dexamethason (DEX)	7
1.7 Resveratrol.....	7
2. Zielsetzung	8
3. Material und Methoden	9
3.1 Powerkalkulation und Studienteilnehmende.....	9
3.2 Flexible Bronchoskopie.....	11
3.3 Die Isolierung von Alveolarmakrophagen.....	11
3.4 Zellkultur	12
3.5 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	12
3.6 Statistik	13
4. Ergebnisse.....	14
4.1 IL-8	14
4.2 GM-CSF.....	17
5. Diskussion	23
6. Literaturverzeichnis.....	28

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
ANOVA	Varianzanalyse (analysis of variance)
AP-1	Activating protein-1
BAL	bronchoalveoläre Lavage
BSA	bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	Calcium
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
DEX	Dexamethason
Ec50	mittlere effektive Konzentration
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
E _{max}	extrapolierter maximaler Effekt
FEV ₁	forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
FVC	forcierte Vitalkapazität
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
H ₂ SO ₄	Dihydrogensulfat , Schwefelsäure
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IgE	Immunglobulin E
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
kD	kilo Dalton
LPS	Lipopolysaccharide
M, mM	Molar, Millimolar

MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
mg, µg	Milligramm, Mikrogramm
Mg ²⁺	Magnesium (2+)
ml	Milliliter
MMP-9	Matrix metalloproteinase 9
MPS	Mononukleäres-phagozytäres System
NF-κB	Nukleärer Faktor κB
ng	Nano-Gramm
NS	non-smoker (Nichtraucher)
PBS	Phosphate-buffered-saline
pg	Piko-Gramm
py	pack year (Packungsjahre)
r ²	Bestimmtheitsmaß der Regression
S	smoker (Raucher)
S.E	standard error
S.E.M	Standard error of means
SAS	Statistical Analysis System
TBS	Tris buffered saline
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
U	Units
v/v	Volumen/Volumen
w/v	weight/volume

Zusammenfassung

Hintergrund:

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine progressive Lungenerkrankung, die durch anhaltende Atemwegobstruktionen und Lungenentzündungen gekennzeichnet ist, die hauptsächlich durch die Inhalation von Zigarettenrauch verursacht werden [97].

Die Lungenentzündung ist mit Alveolarmakrophagen, Epithelzellen, Neutrophilen, Eosinophilen sowie T- und B-Lymphozyten verbunden, die viele Entzündungsmediatoren freisetzen, die zur Pathophysiologie der COPD beitragen. Des Weiteren wird die antioxidative Kapazität bei COPD reduziert, während die oxidative Ausschüttung aus vermehrt aktivierten Entzündungszellen verstärkt wird [7].

Der resultierende oxidative Stress wird bei Exazerbationen noch weiter erhöht und kann mit einer erhöhten Inflammation, einem Umbau der Atemwege und einer Kortikosteroidresistenz assoziiert sein [52].

Trotzdem sind Kortikosteroide bei COPD (GOLD Stadium III, IV) mit häufigen Exazerbationen empfohlen, obwohl eine systemische Langzeittherapie mit Kortikosteroiden ein unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte Letalität darstellt [38].

Das natürliche Polyphenol-Resveratrol (3, 5,4'-Trihydroxystilben) könnte mit seinen entzündungshemmenden Eigenschaften ein interessanter therapeutischer Kandidat für COPD sein, da es sowohl die pulmonale, als auch die extrapulmonale Pathologie angreift.

Heutzutage gewinnt Resveratrol aufgrund seines Potenzials zur Verbesserung der Stoffwechselfundheit, seiner entzündungshemmenden und antioxidativen Eigenschaften zunehmend an Bedeutung [26, 84,11].

Methode:

Grundlage dieser Studie ist ein Zellkultur-Entzündungsmodell, in dem menschliche durch BAL gewonnene Alveolarmakrophagen mit dem gramnegativen bakteriellen Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) stimuliert wurden. Die LPS-induzierte Freisetzung von Entzündungsmediatoren (IL-8, GM-CSF) wurde vergleichend zwischen den Alveolarmakrophagen von

Rauchern mit (COPD) und ohne (smokers, S) Atemwegsobstruktion und Nichtrauchern ((non-smokers, NS) untersucht. Der antiinflammatorische Effekt von Dexamethason auf die LPS-induzierte IL-8 und GM-CSF-Expression verglichen mit Resveratrol war der Kerngegenstand dieser Arbeit.

Ergebnis:

Die Freisetzung von IL-8 aus LPS-exponierten Alveolarmakrophagen war bei COPD erhöht, die Freisetzung von GM-CSF war bei COPD verringert. Dexamethason inhibiert die Freisetzung sowohl von IL-8 als auch von GM-CSF aus den LPS-exponierten Alveolarmakrophagen aller Gruppen, aber dieser Effekt war bei COPD im Vergleich zu gesunden Nichtrauchern reduziert. Im Gegensatz dazu reduziert Resveratrol fast vollständig die Freisetzung beider Zytokine, ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Diese Ergebnisse konnten wir hochrangig international publizieren [53].

Diskussion:

Unsere Daten liefern Hinweise auf eine Kortikosteroid-Resistenz von Alveolarmakrophagen-abhängigen, entzündlichen Reaktionen, die durch gramnegative Bakterien bei COPD induziert werden. Somit wird der Nutzen von Kortikosteroiden in der COPD-Therapie in Frage gestellt. Resveratrol könnte eine Alternative zu Kortikosteroiden bei der COPD-Therapie sein.

1. Einleitung

1.1 Allgemeines

Die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) ist eine der führenden Todesursachen und zählt zu den 5 häufigsten [15,33]. Nach einer Untersuchung aus 12 Ländern ist jeder zehnte Erwachsene über 40 Jahre erkrankt [14].

Im internationalen Durchschnitt betrug die Prävalenz 10,1 Prozent. Sie liegt damit weit über den bisherigen Schätzungen, die zwischen 0,2 und 3,2 Prozent schwankten.

Die Prävalenz der COPD war bei Männern (11,8 Prozent) höher als bei Frauen (8,5 Prozent), was darauf zurückzuführen ist, dass weniger Frauen als Männer rauchen.

Tabakrauchen ist der mit Abstand häufigste Risikofaktor [67]. Die genetische Disposition in Form eines 1-Antitrypsinmangels ist lediglich bei einem geringen Anteil der COPD Erkrankten zu beobachten [16].

Sowohl Aktiv- als auch Passivrauchen führen zu einer Veränderung des Lungengewebes sowie der pulmonalen Immunantwort. Unklar bleibt jedoch, weshalb nur ein geringer Teil der mit schädlichen Noxen in Kontakt gekommenen Individuen eine COPD entwickelt. So wurde früher postuliert, dass nur etwa 15% aller Raucher an einer COPD erkranken. Auch wenn neuere Studien davon berichten, dass die COPD häufig nicht diagnostiziert wird und der Anteil der Raucher, die an COPD erkranken, bei fast 50% liegt [63], bleibt immer noch die Frage bestehen, warum die Erkrankung bei nur einem Teil der Raucher auftritt.

Ein weiterer Risikofaktor ist das Alter. Im Alter verdoppelt sich die COPD-Rate alle zehn Jahre, haben die Autoren errechnet. Wegen der steigenden Lebenserwartung der Menschen werde die Prävalenz der COPD deshalb in den nächsten Jahrzehnten weiter zunehmen [14].

Die COPD wird durch eine chronische Entzündung der Atemwege verursacht.

Verantwortlich dafür ist ein Ungleichgewicht zwischen inflammatorischen und antiinflammatorischen Mechanismen. So finden sich bei der COPD eine erhöhte Zahl von Alveolarmakrophagen, CD8+-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten in der Lunge [80,82].

Die Inflammation, welche bei Lungengesunden z. B. gewisse Zeit nach einer Infektion wie erwartet abklingt, bleibt bei den COPD-Patienten permanent aufrechterhalten.

Hier sind aktivierte Entzündungszellen, wie Alveolarmakrophagen, CD8+-Lymphozyten und neutrophilen Granulozyten, die bei dieser Gruppe von Patienten weiterhin verschiedenste inflammatorische Mediatoren und Enzyme (unter anderem Interleukin-8 (IL-8) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) freisetzen, für diesen Prozess verantwortlich [41]. In der Regulation unspezifischer Entzündungsreaktionen besitzen Makrophagen mit ihrer Aufgabe zur Phagozytose, Antigen-Prozessierung und -Präsentation, Zytokinfreisetzung und T-Zellaktivierung, eine bedeutende Funktion [94].

Das Rauchen, als Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD, beeinflusst die immunregulatorischen Funktionen der Lunge. So konnte bei Rauchern mit unauffälliger Lungenfunktion gezeigt werden, dass sich die Alveolarmakrophagen in Anzahl, Morphologie und Funktionen verändern.

Bei gesunden Rauchern war im Vergleich zu Nichtrauchern eine insgesamt deutlich erhöhte Zellzahl mit einem signifikant vermehrten Anteil an Alveolarmakrophagen in der bronchoalveolären Lavage (BAL) nachzuweisen [86]. Lipopolysaccharid (LPS), ein Endotoxin gramnegativer Bakterien stimuliert Alveolarmakrophagen zusätzlich zur vermehrten Freisetzung von Entzündungsmediatoren, welche eine wichtige Rolle bei der COPD-Entstehung spielen [57,58].

Somit verstärken Infektionen mit gramnegativen Bakterien die chronische Inflammation der Atemwege, was zur beschleunigten und irreversiblen Progression der Erkrankung führt (COPD Exazerbationen) [98].

Als häufig exazerbierende COPD-Patienten (frequent exacerbators) gelten solche mit zwei oder mehr behandlungsbedürftigen Exazerbationen pro Jahr. Je fortgeschrittener die COPD ist, desto häufiger erleiden die Patienten regelmäßige Exazerbationen; im GOLD Stadium II sind es 22%, im Stadium III 33% und im Stadium IV sogar 47% [44].

Im Vergleich zu den COPDlern ohne Exazerbation weisen COPD-Patienten mit häufigen Exazerbationen im folgenden Jahr ein signifikant höheres Risiko für eine erneute Exazerbation auf. Die durchschnittliche jährliche Häufigkeit der Exazerbationen im folgenden Jahr war bei den Patienten mit häufigen Exazerbationen signifikant höher als bei denjenigen ohne Exazerbationen. Zudem war die mittlere Periode bis zur ersten Exazerbation in der Gruppe mit den häufigen Exazerbationen deutlich kürzer als in der Gruppe mit seltenen oder gar keinen Exazerbationen.

Eine schwere Atemobstruktion, Refluxkrankheit und eine Therapie mit inhalativen Kortikosteroide sind als unabhängige Risikofaktoren fürs Auftreten häufiger Exazerbation beschrieben worden [96].

Exazerbationen bestimmen den Verlauf und die Prognose der COPD [87, 91,27 ,64].

Häufige Exazerbationen verschlechtern nicht nur den Verlauf der Prognose und Erkrankung, sondern erhöhen auch die Kosten-Belastung für das Gesundheitssystem [24, 72,95].

Zunehmend wird diskutiert, vom starren Leitlinienschema der Schweregrad-abhängigen Therapie auf die Behandlung von abgrenzbaren Phänotypen gemäß GOLD A–D bzw. klinischen Merkmalen („treatable traits“) überzugehen [1, 68,101].

Die häufigsten bakteriellen Erreger im Rahmen von COPD-Exazerbationen sind Haemophilus influenzae, Pneumokokken, Moraxella catarrhalis, Enterobacteriaceae und Pseudomonas aeruginosa. Bis auf die Pneumokokken handelt es sich hier um gramnegative Bakterien. Atypische Erreger wie Mykoplasmen, Chlamydien oder Legionellen spielen praktisch keine Rolle.

Basierend auf den GOLD-COPD-Richtlinien wird bei der akuten Exazerbation grundsätzlich eine systemische Kortikosteroidtherapie von 40 mg oralem Prednison für 5 Tage empfohlen [102].

In randomisierten kontrollierten Studien (RCT) konnte zwar nachgewiesen werden, dass die systemische Kortikosteroidtherapie den klinischen Verlauf verbessert sowie die Länge des stationären Aufenthalts und die Zeit bis zur Erholung des FEV₁ (forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde) verkürzt [25]. Andererseits ist eine systemische Langzeittherapie mit Kortikosteroiden ein unabhängiger Risikofaktor für eine erhöhte Letalität [39].

Inhalative Kortikosteroide beeinflussten die FEV₁ und die Mortalität bei Patienten mit COPD nicht. Sie verlangsamten jedoch die Verschlechterung der Lebensqualität und reduzierten die Exazerbationsrate. Diese positiven Effekte sind gegen die erhöhte Infektionsgefahr abzuwägen. Welche Patienten profitieren, welche klinischen und biologischen Faktoren Prädiktoren sind, ob langfristige Nebenwirkungen auftreten und welche Dosis-Wirkungs-Beziehung besteht, sind die wichtigsten offenen Fragen [105].

Zudem scheint der Einsatz inhalativer Kortikosteroide bei COPD mit einem erhöhten Risiko für schwere Pneumonien einherzugehen [93].

Wenn COPD (zumindest die meisten Phänotypen) resistent gegenüber inhalativen Steroiden, aber sensitiv gegenüber systemischen Steroiden ist, liegt es nahe, die Ursache dafür in lokalen und nicht in zirkulierenden/systemischen immunaktiven Zellen zu suchen und in entsprechenden Modellen Alternativen zu testen.

In unserer Studie wird dies untersucht und die antiinflammatorische Wirkung von Resveratrol auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus Alveolarmakrophagen, welche ein Hauptteil der zellulären Bestandteile der Lunge sind und eine zentrale Rolle im unspezifischen lokalen pulmonalen Immunsystem spielen [18], evaluiert.

1.2 Alveolarmakrophagen

Der Makrophage ist die differenzierte Zelle des Monokleären Phagozyten Systems (MPS). Dieses funktionell zusammengehörende Zellsystem umfasst mononukleäre Makrophagen, periphere Blutmonozyten und die im Knochenmark vorkommenden Vorläuferzellen, die Monoblasten und Promonozyten (Makrophagenlinie) [31].

Makrophagen sind im gesamten menschlichen Körper verteilt: Zentrales Nervensystem, Lunge, Leber, Gastrointestinaltrakt, lymphoide Organe, seröse Höhlen, Knochen, Synovia und Haut. Die im Blut zirkulierenden Monozyten siedeln sich scheinbar zufällig in den verschiedenen Geweben an [35].

Makrophagen zeigen eine große regionale Heterogenität: Zum Beispiel sind residente Makrophagen in der Leber (Kupffersche Sternzellen) unter anderem für die Reinigung von partikulären und löslichen Substanzen aus dem Blut verantwortlich, wogegen die heterogene Population von residenten Makrophagen in der Milz für die Antigenpräsentation und Interaktion mit B- und T-Lymphozyten verantwortlich ist. Die funktionelle, morphologische und phänotypische Heterogenität reflektiert die lokale Umgebung der Makrophagen und ihre Verwicklung in physiologische und pathologische Prozesse [62].

Alveolarmakrophagen sind ein Hauptteil der zellulären Bestandteile der Lunge und spielen eine zentrale Rolle im unspezifischen lokalen pulmonalen Immunsystem [18].

In der gesunden Lunge machen Alveolarmakrophagen 85% der Abwehrzellen in den Alveolen aus. Zudem besitzen sie eine bedeutende Funktion in der frühen Phase von Entzündungen und in der Kontrolle von Infektionen [62].

Aktivierte Alveolarmakrophagen sind am chronischen Entzündungsprozess in den Atemwegen wesentlich beteiligt. So konnte nachgewiesen werden, dass spezifisch bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) die Alveolarmakrophagenzahl bis zum Zehnfachen erhöht sind und am Ort der Lungengewebsschädigung lokalisiert vorliegen. Zudem besitzen sie die Fähigkeit, alle für die Auslösung und den Krankheitsprogress notwendigen Entzündungsmediatoren (Tumornekrosefaktor- α , Interleukin-8, und Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierende Faktor), Proteasen (Metalloproteinasen, Cathepsine) und Adhäsionsmoleküle (intercellular adhesion molecule 1, E-Selektin, Leukotriene B4, Makrophagen-1-

Antigen) zu produzieren und auszuschütten, die ursächlich und spezifisch für die Entwicklung einer COPD verantwortlich sind [9,10].

Makrophagen lassen sich aufgrund ihrer inflammatorischen Effekte in zwei Subpopulationen unterteilen: Proinflammatorische M1- und antiinflammatorische M2-Makrophagen. Die Differenzierung zu einem proinflammatorischen Makrophagen wird durch T1-Helferzellen ausgelöst. Von T2-Helferzellen werden die Makropagen angeregt, sich zu einem antiinflammatorischen Makrophagen zu differenzieren [36].

Die entsprechend der Aktivierung durch TH-Zellen entstandenen Phänotypen haben unterschiedliche Aufgaben. Während der M1-Phänotyp eher für die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen verantwortlich ist, beeinflusst der M2-Phänotyp die Entzündungsreaktion und fördert die Gewebeheilung [70].

1.3 Zigarettenrauchen

Die chronisch obstruktive Atemwegserkrankung (englisch: chronic obstructive pulmonary disease = COPD) ist ein Krankheitszustand, der durch eine nicht oder (nur teilweise) reversible Atemflussbehinderung gekennzeichnet ist. Diese Atemflussbehinderung ist langsam chronisch fortschreitend und begleitet von einer inadäquaten entzündlichen Immunantwort der Lunge auf auslösende Reize wie schädigende Partikel oder Gase [75].

Das Zigarettenrauchen ist der Hauptrisikofaktor für die Entwicklung einer COPD [98].

Achtzig Prozent aller COPD-Erkrankten sind Zigarettenraucher [60]. Bereits bei Lungengesunden verursacht Zigarettenrauchen eine Erhöhung der Anzahl und der Zellaktivität von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten in den Atemwegen. Es wird vermutet, dass der erhöhte Einstrom dieser Entzündungszellen in die Atemwege durch chemotaktische Faktoren initiiert wird, die durch Zigarettenrauchen aktiviert werden [71]. Es wurde schon in einer Studie an humanen Alveolarmakrophagen gezeigt, dass Zigarettenrauchen zu einer verstärkten Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen führt. Dieses wiederum resultiert in eine erhöhte Ausschüttung von Interleukin-8 in LPS stimulierten Alveolarmakrophagen von Rauchern [60].

Zudem könnte Zigarettenrauchen eine negative Wirkung auf Glukokortikosteroid-Effekte in den Alveolarmakrophagen besitzen [24,46].

1.4 Das Zytokin Interleukin-8

Interleukin-8 (IL-8) ist ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin. Es wird zu den Hauptmediatoren des akuten Inflammationsgeschehens gezählt. IL-8 ist ein proteinhaltiger Mediator, mit einem Molekulargewicht von 8 kD. Die IL-8-Produktion wird durch Viren, Endotoxine und Bakterien und andere proinflammatorische Zytokine stimuliert.

Die biologische Aktivität und Funktion von IL 8 ist vielfältig. (Dies spiegelt sich auch in den unterschiedlichen Nomenklaturen wider: Monocyte derived neutrophil chemotactic factor; Granulocyte chemotactic peptide; Neutrophil activating peptide/factor) [69].

Die biologische Aktivität besteht in der Förderung der Chemotaxis, der transendothelialen Migration und Degranulation von neutrophilen Leukozyten, in der Rekrutierung von T- und B-Zellen, der Regulation der IgE-Synthese, der Expression von Adhäsionsmolekülen für Entzündungszellen- und Mediatoren, der Stimulation der Angiogenese, wie auch in der Induktion der Kollagensynthese von Fibroblasten.

IL-8 scheint bei der Aktivierung von Neutrophilen und Eosinophilen in den Atemwegen von Patienten mit COPD eine primäre Rolle zu spielen. Die Sputum-Konzentration von IL-8 scheint eng mit dem Grad der Luftstrom-Obstruktion bei Patienten mit COPD verbunden zu sein und kann als Marker bei der Bewertung der Schwere der Atemwegsentzündung dienen, was ein Risikofaktor für COPD ist [104].

Im Gegensatz zu anderen proinflammatorischen Zytokinen kann IL-8 nach Ausschüttung in den Extrazellulärraum über einen langen Zeitraum persistieren und somit seine chemotaktische Wirkung aufrechterhalten [76].

Eine Zytokin-Hemmung durch Resveratrol könnte bei akuter Exazerbation als attraktiver therapeutischer Ansatzpunkt angestrebt werden, um bei Rauchern die Entwicklung einer COPD zu vermeiden oder zumindest zu verzögern.

1.5 Der Granulozyten - Makrophagen- Colony - stimulierender Faktor (GM-CSF)

GM-CSF wird von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen gebildet, zum Beispiel von aktivierten T-Zellen, Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen [3]. GM-CSF induziert, wie auch andere Wachstumsfaktoren, die Proliferation und Reifung verschiedener hämatopoetischer Zelllinien des Knochenmarks [3, 37]. In der Pathogenese der COPD ist GM-CSF entscheidend an Zellaktivierungs- und Zellakkumulationsvorgängen, insbesondere der neutrophilen Granulozyten, beteiligt. Während einer Exazerbation ist eine deutlich höhere GM-CSF - Konzentration in der BAL - Flüssigkeit nachweisbar [5].

1.6 Das Glukokortikoid Dexamethason (DEX)

Dexamethason ist ein synthetisches Glukokortikoid. Wie die natürlichen Glukokortikoide wirkt es katabolisch auf den Fett-, Protein- und Kohlenhydratmetabolismus und beeinflusst das Immunsystem und den Ionentransport in Neuronen des zentralen Nervensystems.

Wie fast alle Glukokortikoide signalisiert Dexamethason über einen zytosolischen Glukokortikoidrezeptor [108] und ist so in der Lage, die Transkriptionsrate verschiedener Zielgene zu steigern oder zu hemmen [89].

Bei der Entstehung der Inflammation, als Hauptmerkmal einer COPD könnten die Makrophagen eine bedeutende Rolle spielen [6].

Diese chronische Entzündung führt dann unbehandelt zu Gewebeschäden, fibrotischen Veränderung der Atemwege, einer chronischen Bronchitis und zum Lungenemphysem [82,44].

Es wurde bereits gezeigt, dass die Inflammation eine Resistenz gegenüber Glukokortikoiden hat und Zigarettenrauchen eine inhibitorische Wirkung auf die Wirkung von Dexamethason, als Hauptvertreter der Glukokortikoiden, in den Alveolarmakrophagen hat [23,45].

Eine Reihe von Studien haben gezeigt, dass weder hochdosiert inhalierte noch orale Kortikosteroide das Niveau von IL-8 oder Proteasen im induzierten Sputum der Patienten mit COPD reduzieren [21,48,49]. Diese verminderte Glukokortikosteroid-Wirksamkeit bei Patienten mit COPD könnte mit einer Makrophagenunempfindlichkeit zusammenhängen [24].

Für diese Hypothese wird folgende Interpretation diskutiert: Es sollen sowohl die proinflammatorische M1-Makrophagen als auch antiinflammatorische M2-Makrophagen (Tumorassoziierte Makrophagen) diese Resistenz zeigen.

Diese Alveolarmakrophagen befinden sich ständig in einer oxidativen Umgebung und je länger sie dieser Umgebung ausgesetzt sind, desto wahrscheinlicher entwickelt sich eine Resistenz [45,17,46].

1.7 Resveratrol

Resveratrol (3, 5,4-trihydroxy-trans-Stilben) ist ein Biomolekül, gehört zu den Flavoniden und wird der Klasse der Phytoalexine zugeordnet. Resveratrol wurde erstmals aus Knöterichpflanzen isoliert und identifiziert. Diese Substanz kommt aber auch in Weintrauben [60], Kiefern [51] Lein- und Sesamsaat [40] und Erdnüssen [83] vor. Phytoalexine sind eine Klasse

von antibiotischen Polyphenolverbindungen, die das Abwehrsystem der Pflanzen stärken. Resveratrol wird in den Pflanzen bei erhöhter Belastung als Stressmetabolit gebildet, beispielsweise durch hohe Ozon- und UV-Belastung, sowie bei Insekten- und Pilzbefall [39 ,42 ,61].

Resveratrol entfaltet seine abwehrstärkenden Fähigkeiten nicht allein in der Pflanze, sondern auch im menschlichen Körper. Das beruht vorwiegend auf seinen antioxidativen Wirkungen. Resveratrol ist vor allem ein Fänger von Peroxyl-Radikalen, es senkt außerdem die Lipidperoxidation von Lipoproteinen und Zellen und es schützt vor den schädlichen Folgen von oxidiertem Lipoprotein [30,66]. Resveratrol kann Herzkrankheiten vorbeugen [66, 12,90]. Zudem ist es als Hemmstoff der Arachidonsäure bekannt [50].

Resveratrol kann außerdem auf Prozesse einwirken, welche die Bildung von Krebszellen sowie deren weitere Entwicklung hemmen können [47].

Dass Resveratrol die entzündliche Zytokinfreisetzung aus Alveolarmakrophagen in COPD hemmt und als wirksame Pharmakotherapie in Frage käme, wurde bereits 2003 bei einer Studie diskutiert [22].

2. Zielsetzung

Ziel dieser Dissertation ist es, die Wirkung der antiinflammatorisch und anti-oxidativ wirksamen Substanz Resveratrol im Vergleich zu Dexamethason in humanen Alveolarmakrophagen zu untersuchen. Dafür sollen Alveolarmakrophagen aus der bronchoalveolären Lavage von Nichtrauchern, Rauchern und Rauchern mit einer COPD untersucht werden. Hauptsächlich soll die IL-8- und GM-CSF- Ausschüttung in unstimulierten, in mit dem bakteriellen Endotoxin LPS vorstimulierten Alveolarmakrophagen, sowie mit und ohne Resveratrol und Dexamethason stimulierten Alveolar-Makrophagen mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in Zellkulturüberständen analysiert werden.

Culpitt und Mitarbeiter konnten einen inhibitorischen Effekt von Resveratrol auf IL-8- und GM-CSF-Ausschüttung von Alveolarmakrophagen bei Rauchern und bei COPD-Patienten feststellen [22]. Allerdings wurde hier kein Vergleich mit anderen antiinflammatorischen Substanzen hergestellt, vor allem aber wurde keine nichtrauchende Kontrollgruppe (non-smokers) in die Studie miteinbezogen.

Ziel unserer Studie ist es, Resveratrol als eine vielversprechende Substanz für die Behandlung von Patienten mit COPD zu validieren.

3. Material und Methoden

3.1 Powerkalkulation und Studienteilnehmende

Die Powerberechnung (mit dem SAS program fpower) erfolgte unter Beachtung des folgenden primären Endpunkts: unterschiedlicher Effekt von Dexamethason mit 10^{-6} M (entspricht der Konzentration mit klinischer Relevanz) auf Zytokinfreisetzung von LPS-exponierten Alveolarmakrophagen zwischen Nichtrauchern (NS; non-smokers, weniger als 100 Zigaretten im Leben) aktiven Rauchern (S; smokers) ($R > 10$ Packungsjahre) – hier wiesen beide Gruppen keine Einschränkung in der allgemeinen Lungenfunktion auf und hatten keinerlei respiratorische Symptome - und COPD-Patienten (COPD). Als Basis für die Berechnung der Fallzahl dienten Vorversuche mit $N = 4$ Patienten

in jeder Gruppe. Um eine Teststärke (Power, $1 - \beta$) größer als 0,8 für one-way ANOVA –Test mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit α von 0,05 zu erreichen, sollten in jeder Gruppe $N = 12$ für GM-CSF ($n < 12$ für IL-8) Probanden eingeschlossen werden.

Für die Experimente dieser Arbeit wurde bronchoalveoläre Lavage von insgesamt 36 Probanden verwendet, welche sich aus medizinischer Sicht - ganz unabhängig von dieser Studie - einer Bronchoskopie, entweder stationär im Rahmen eines Aufenthaltes in der Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln, unterzogen haben oder einen ambulanten Termin für eine elektive Bronchoskopie in der pneumologischen Ambulanz hatten. Vor Teilnahme wurden die Kandidaten eingehend schriftlich und mündlich aufgeklärt.

Demnach bestand die Studienpopulation aus 12 NS, 12 S und 12 COPD (GOLD Stadium II) (Tabelle 1). Keiner der Patienten der Gruppe erhielt Cortison, weder oral noch inhalativ, zudem keine immunsuppressiven Behandlungen. Es wurde nicht über eine schwere Erkrankung oder akute Viruserkrankung, in den letzten zwei Monaten vor der Untersuchung berichtet. Tuberkulose, Parasiteninfektion, Allergianamnese oder Asthma gehörten ebenso zu den Ausschlusskriterien [55].

Diagnostiziert wurde die COPD nach den aktuellen Kriterien der Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease [34].

Die COPD-Patienten hatten irreversible Einschränkungen der Lungenfunktion ($FEV_1/FVC < 70\%$ und $FEV_1 < 80\% > 50\%$ des prädiktiven Wertes). Nach Inhalation von 200 μ g Salbutamol war keine signifikante Atemwegsreversibilität nachweisbar (FEV_1 postinhalativ < 12

%). Alle Raucher (mit bzw. ohne Atemwegsobstruktion) hatten eine Zigarettenrauchexposition von mindestens 10 py (pack year, Packungsjahre).

Die Studie hat die Zustimmung der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln erhalten.

Tabelle 1.

Einteilung der Probanden in drei Gruppen:

	NS	S	COPD
N	12	12	12
Alter (Jahre)	65.8 ± 3.3	61.3 ± 2.3	67.4 ± 3.1
Geschlecht (m:w)	10:2	7:5	9:3
FEV ₁ (% pred.)	101.0 ± 4.0	95.3 ± 4.4	67.4 ± 3.3*
FEV ₁ /FVC (%)	87.5 ± 2.0	87.5 ± 2.4	60.9 ± 1.4*
FVC (% pred.)	89.0 ± 4.0	92.7 ± 4.5	82.7 ± 4.5
Packungsjahre	–	52.9 ± 12.0	48.8 ± 8.2

NS: non-smokers; S: smokers ohne COPD (≥ 10 py); FEV₁: forciertes expiratorisches Volumen in 1 Sekunde; FVC: forcierte expiratorische Kapazität; COPD: Chronisch obstruktive Lungenerkrankung.

* $p < 0.001$ versus NS und S.

Die Differenz in Packungsjahren zwischen S und COPD ist statistisch nicht signifikant ($p = 0.79$).

COPD-Patienten waren alle Patienten mit GOLD Stadium II.

3.2 Flexible Bronchoskopie

Die Patienten wurden mit Midazolam (5-10 mg) in intravenöser Form sediert. Sauerstoff (2-3 Liter) wurde über Nasenonde kontinuierlich verabreicht, der Puls und die Sauerstoffsättigung wurden während der Untersuchung kontinuierlich überwacht.

Lidocaine (2% w/v) wurde zur Lokalanästhesie in die oberen Atemwege appliziert.

Mit einem flexiblen Bronchoskop (Olympus BF10; Olympus, Hamburg, Germany) konnte man problemlos über die Nase bis in die Trachea / Bronchien passieren.

Die Spitze des Bronchofiberskopes wurde in den rechten Mittellappen eingeführt und dort durch einen maximalen Sog (Wedgeposition) eingeklemmt.

Dann wurde die auf Zimmertemperatur erwärmte Saline durch den Arbeitskanal eingefüllt und anschließend über den Absaugkanal in einen geeigneten Behälter abgesaugt. Die aspirierte Flüssigkeit wurde anschließend in vorgekühlten Flaschen gesammelt und bis zur Durchführung der Untersuchung auf Eis gelagert.

Die durch bronchoalveoläre Lavage gewonnene Flüssigkeit betrug 150-180 ml.

3.3 Die Isolierung von Alveolarmakrophagen aus der bronchoalveolären Lavage

Die Separation von Alveolarmakrophagen aus der bronchoalveolären Lavage wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt [57,58].

Die bronchoalveoläre Lavage wurde kurz durch eine sterile Gaze filtriert, um Schleimpfropfen zu eliminieren. Anschließend wurde Lavageflüssigkeit bei 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Zellkultur wurde einmal in 50 ml Ca²⁺/Mg²⁺-freien Hank's balanced salt solution (HBSS; Sigma, Munich, Germany) gewaschen.

Die Alveolarmakrophagen wurden mittels Zählkammer (Neubauer chamber) gezählt und anschließend erfolgte eine Gegenfärbung mit Kimura. Durch Zugabe von Benzaminblau konnte man die Zellviabilität beurteilen.

Die Alveolarmakrophagen wurden in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium (Sigma), unter Zusatz von 10% (v/v) heat-inactivated foetal calf serum (Sigma), 2 mM L-Glutamine (Sigma), 100 U/ml Penicillin (Sigma) und 100 µg/ml Streptomycin (Sigma), resuspendiert.

Alveolarmakrophagen wurden mit einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/Well auf Multiwellplatten (12 Wells) ausplattiert und anschließend im CO₂-Inkubator bei ca. 5% CO₂, 95% relative Feuchte und 37°C zum Adhären über Nacht inkubiert. Nicht adhären Zellen wurden durch Waschen mit RPMI 1640 entfernt. Die verbliebene adhären Alveolarmakrophagen wurden durch Färbung mit Kimura-Lösung und morphologische Analyse bis zu > 99% als rein bewertet.

3.4 Zellkultur

Die Alveolarmakrophagen wurden in RPMI 1640 als Zellkulturmedium, unter Zusatz von 10% (v / v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum, 2 mM L-Glutamin(Sigma), 100 U/ml Penicillin (Sigma) und 100 µg/ml Streptomycin in einem Begasungsbrutschrank (37 °C, 5% CO₂ und 95% Luftfeuchte) kultiviert. Nach 12 Stunden wurden die Zellen mit LPS- (*S-Form von Salmonella minnesota*; ohne nachweisbare Kontaminationen mit Protein- oder DNA-Agonisten für Toll-like-Rezeptoren; Alexis, EnzoLifeSciences GmbH cat#-581-020-L002) Konzentration von 1 µg/ml für 24 Stunden in frischem Medium mit einem Zellzahl von 1×10^6 /ml stimuliert. Dexamethason oder Resveratrol (beide von Sigma) wurden 60 Minuten vor der Stimulation mit LPS hinzugefügt. Die Zellebensfähigkeit (>85%) wurde mittels trypan blue exclusion ermittelt.

3.5 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Wie in der Vorabpublikation [22 ,54] beschrieben, erfolgte Enzym-linked Immunosorbent Assay (ELISA, cat#: DY208, DY215; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) zur Messung der Konzentration von IL8 und GM-CSF. Hierzu verwendeten wir 96-well plates, welche über Nacht mit 100µl eines monoklonalen mouse-anti-human IL-8- bzw. GM-CSF-Antikörpers inkubiert wurden. Die Platten wurden dreimalig mit TBSTween-20® gewaschen. Anschließend erfolgte die Blockierung des Antikörpers mit 300µl/well PBS/1%BSA, 5% Sucrose und 0,05% NaN₃ für eine Stunde.

Nach Wiederholung des Waschvorganges wurden IL-8 Standard bzw. GM-CSF Standard sowie die Proben aufgetragen und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach einem dreimaligen Waschvorgang mit TBS-Tween20® erfolgte die Applikation von 100µl eines sekundären biotinylierten anti-human IL-8 bzw. GM-CSF Antikörpers in PBS/1%BSA.

Nach einstündiger Inkubation sowie erneutem Waschvorgang erfolgte die Zugabe von 100µl Streptavidin. Nach erneutem Waschen wurden 100µl TMB Substratlösung pro well hinzugegeben. Nach Entwicklung der Farbreaktion wurde diese mit 50µl/well einer einmolaren H₂SO₄ Lösung gestoppt.

Die optische Dichte wurde mittels eines Spektrometers bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen und durch Interpolation mit Hilfe einer Standardkurve quantifiziert.

Die Durchführung der ELISA Tests wird durch Resveratrol nicht beeinflusst [19].

3.6 Statistik

Die Daten wurden als Mittelwert und Standardabweichung des Mittelwerts (S.E.M) angegeben. Der Kohortenvergleich erfolgte mittels Varianzanalyse (one-way ANOVA). Ergab sich ein signifikanter Unterschied, wurde der interindividuelle Gruppenvergleich mit dem post-hoc Bonferroni-Holm Test analysiert.

4. Ergebnisse

4.1 Interleukin-8 (IL-8)

Die basale IL-8-Freisetzung von den für 24-Stunden kultivierten Alveolarmakrophagen betrug 93.9 ± 37.7 ng/ml ((mean \pm S.E.M.) bei NS (non-smokers) 89.4 ± 27.8 ng/ml bei S (smokers) und 85.1 ± 28.8 ng/ml bei COPD, ohne signifikanten Unterschied zwischen den Kohorten (Abbildung 1A). Die LPS-induzierte IL-8-Freisetzung (18-fache Induktion, 1524 ± 207 ng/ml) war bei COPD erhöht im Vergleich zu S (13-fach; 1168 ± 155 ng/ml) und war ebenso höher bei S im Vergleich zu NS (8.5-fach; 802 ± 90.9 ng/ml) (Abbildung 1A).

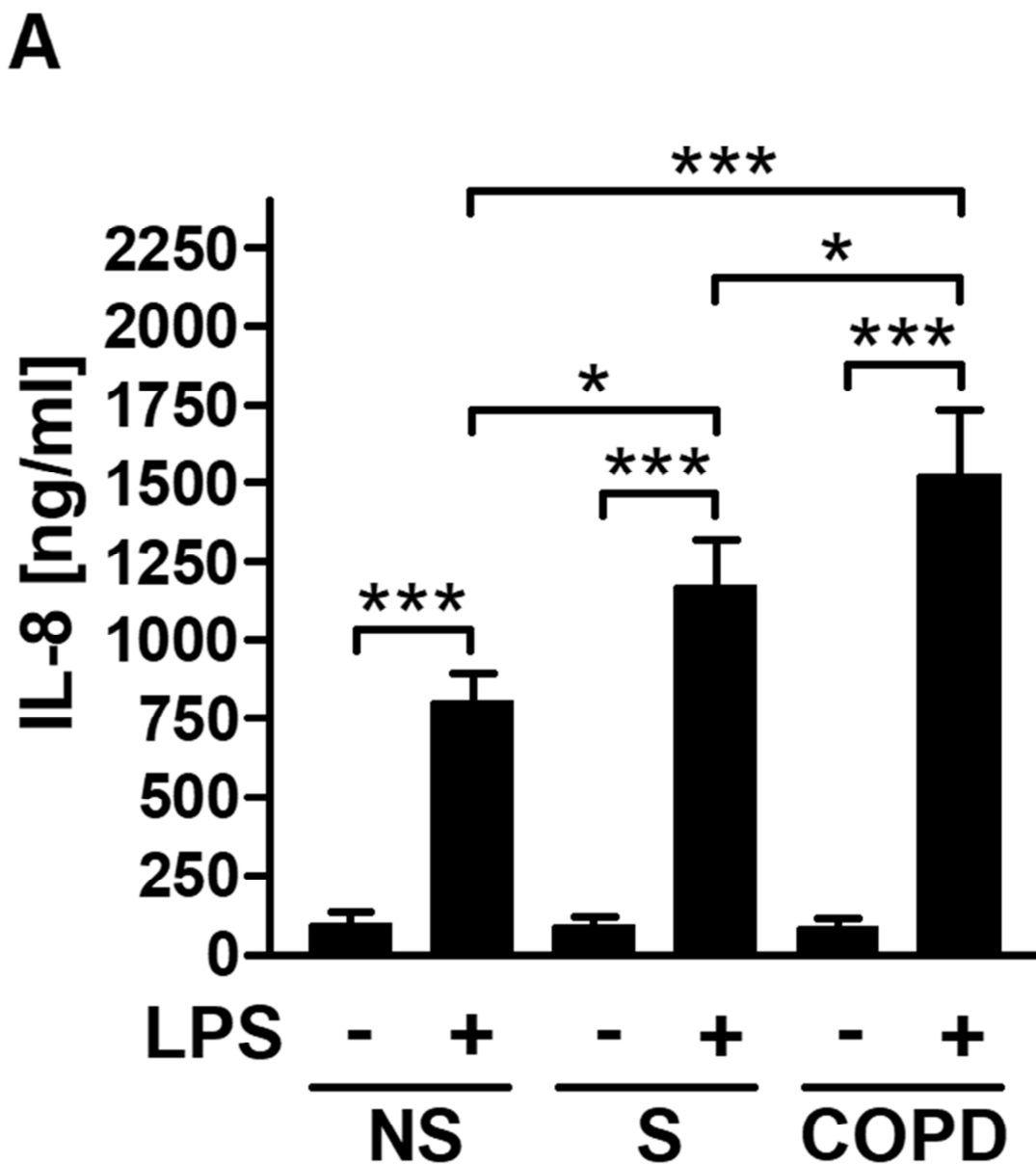


Abbildung 1A.

Dexamethason reduzierte konzentrationsabhängig die IL-8-Freisetzung aus LPS-exponierten Alveolarmakrophagen bis zur Ausgangskonzentration bei NS. Dieser Effekt wurde bei S im Vergleich zu NS und ebenfalls bei COPD im Vergleich zu S vermindert (Abb. 1B, Tabelle 2).

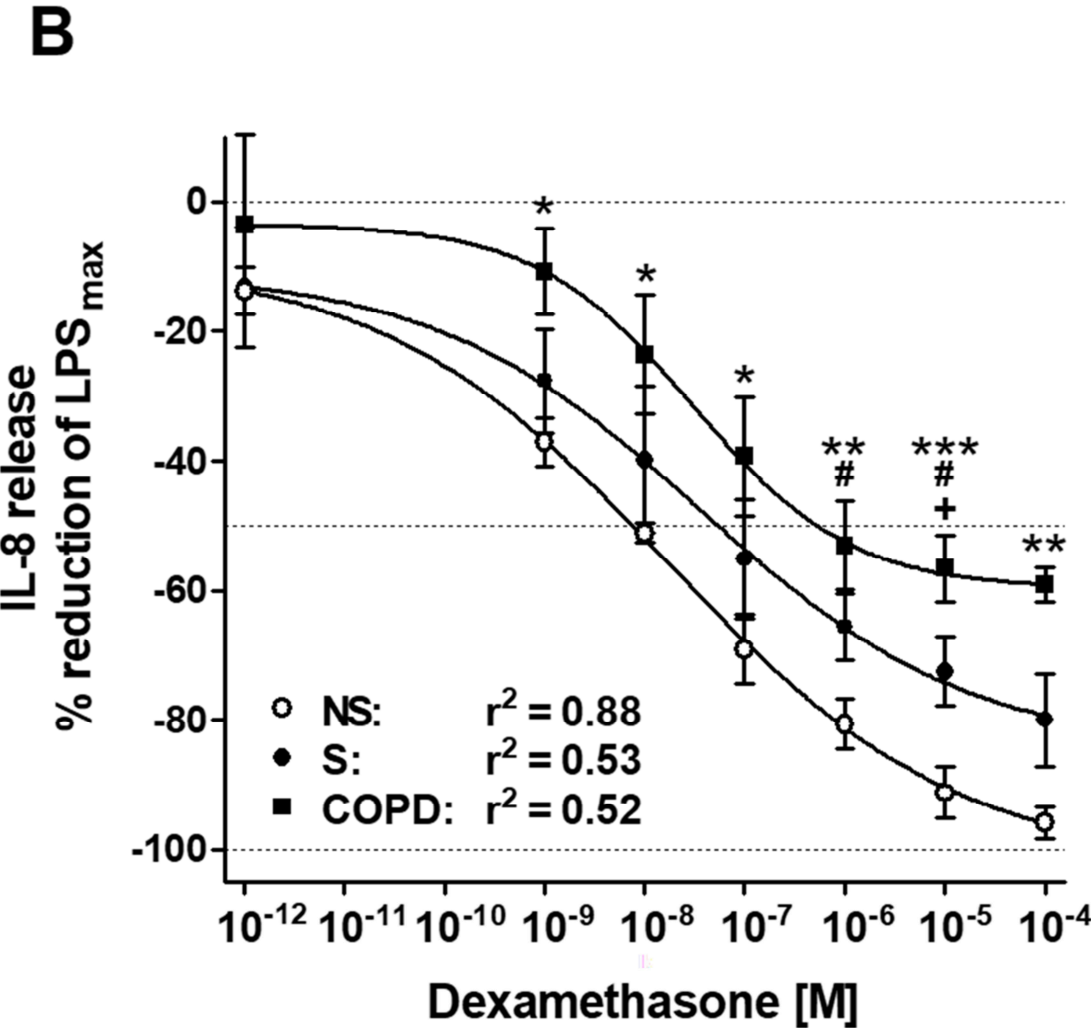


Abbildung 1B.

Im Gegensatz dazu reduzierte Resveratrol konzentrationsabhängig die IL-8-Freisetzung aus LPS-exponierten Alveolarmakrophagen fast bis zur Grundlinie, ohne Unterschiede zwischen den drei Kohorten (Abb. 1C, Tabelle 2).

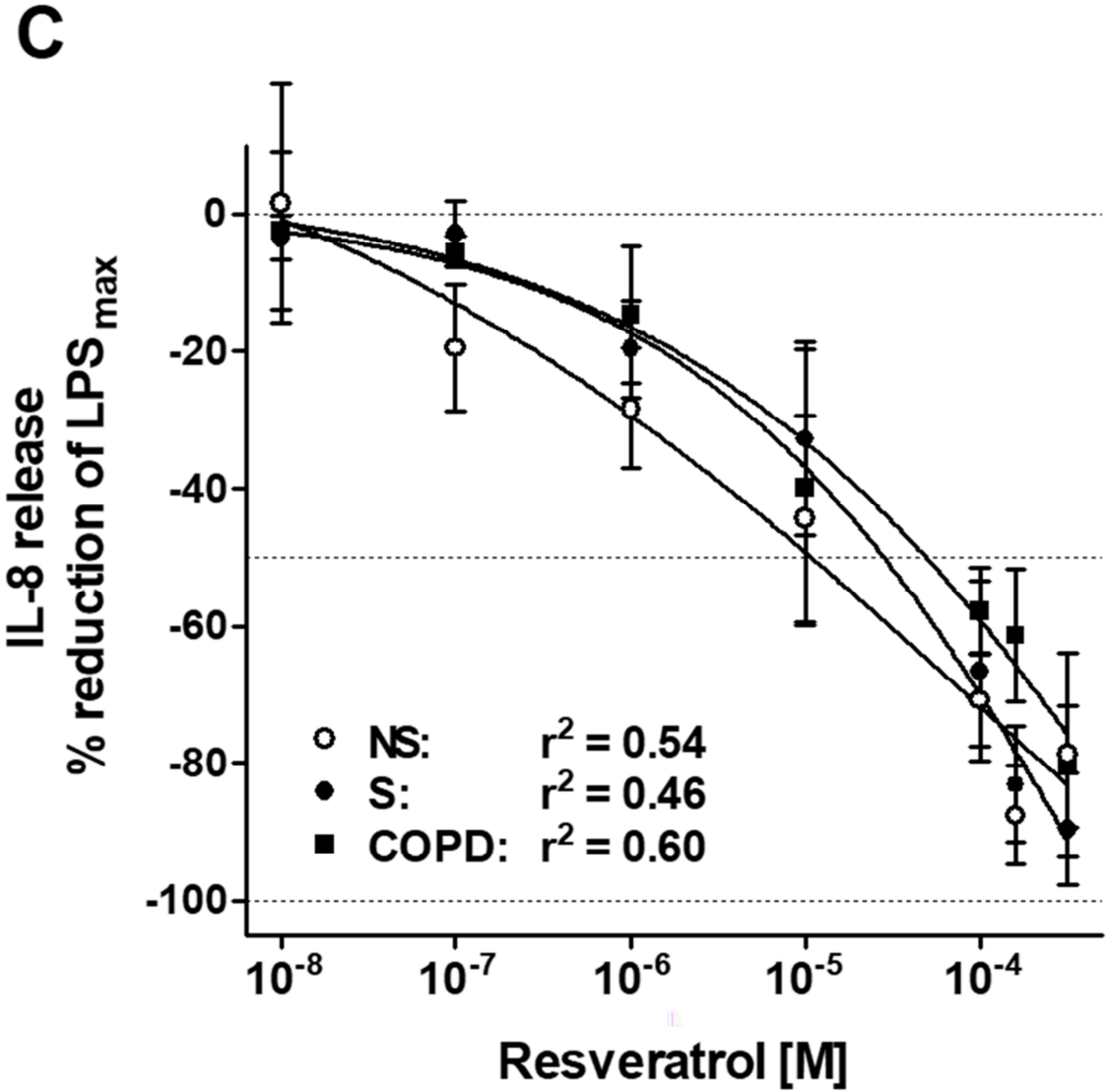


Abbildung 1C.

4.2 GM-CSF

Die GM-CSF-Basalfreisetzung aus den für bereits 24-Stunden kultivierten Alveolarmakrophagen betrug 30.6 ± 6.3 pg/ml bei NS, 24.4 ± 3.6 pg/ml bei S, und 17.5 ± 1.7 pg/ml bei COPD ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Abbildung 1D). Die LPS-induzierte GM-CSF-Freisetzung war bei den S (105-mal Anstieg über den Ausgangswert bis zur 2.55 ± 0.43 ng/ml) und bei COPD (102-mal; 1.78 ± 0.22 ng/ml) im Vergleich zu NS (130-mal; 3.97 ± 0.73 ng/ml) geringer (Abbildung 1D).

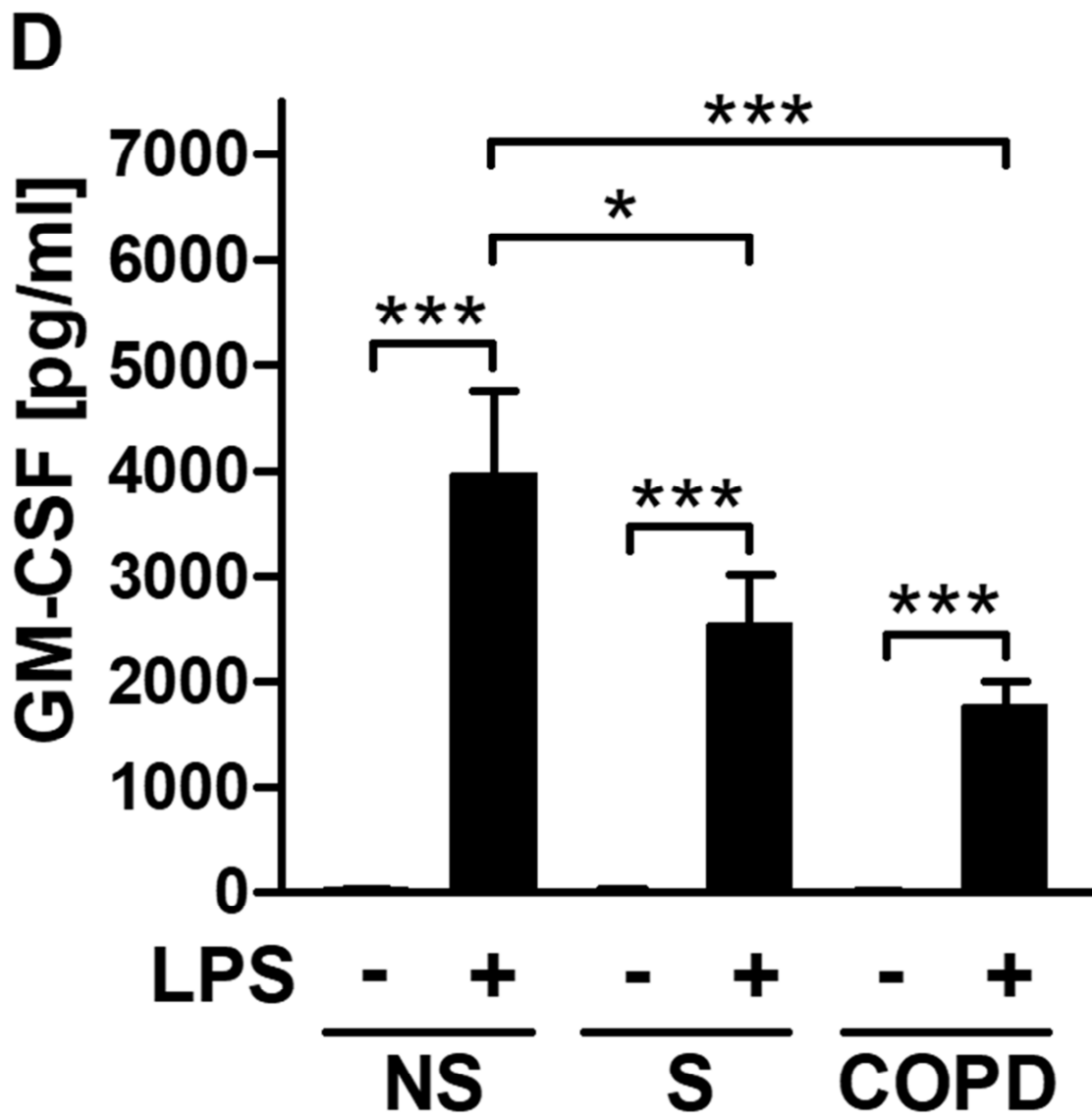


Abbildung 1D.

Dies zeigt, dass das Zigarettenrauchen die LPS-induzierte GM-CSF-Freisetzung beeinträchtigt. Dexamethason reduziert konzentrationsabhängig die GM-CSF-Freisetzung aus LPS-exponierten Alveolarmakrophagen bei NS und S fast bis auf den Ausgangswert. Allerdings war dieser Effekt bei COPD geringer. (Abbildung 1E, Tabelle 2).

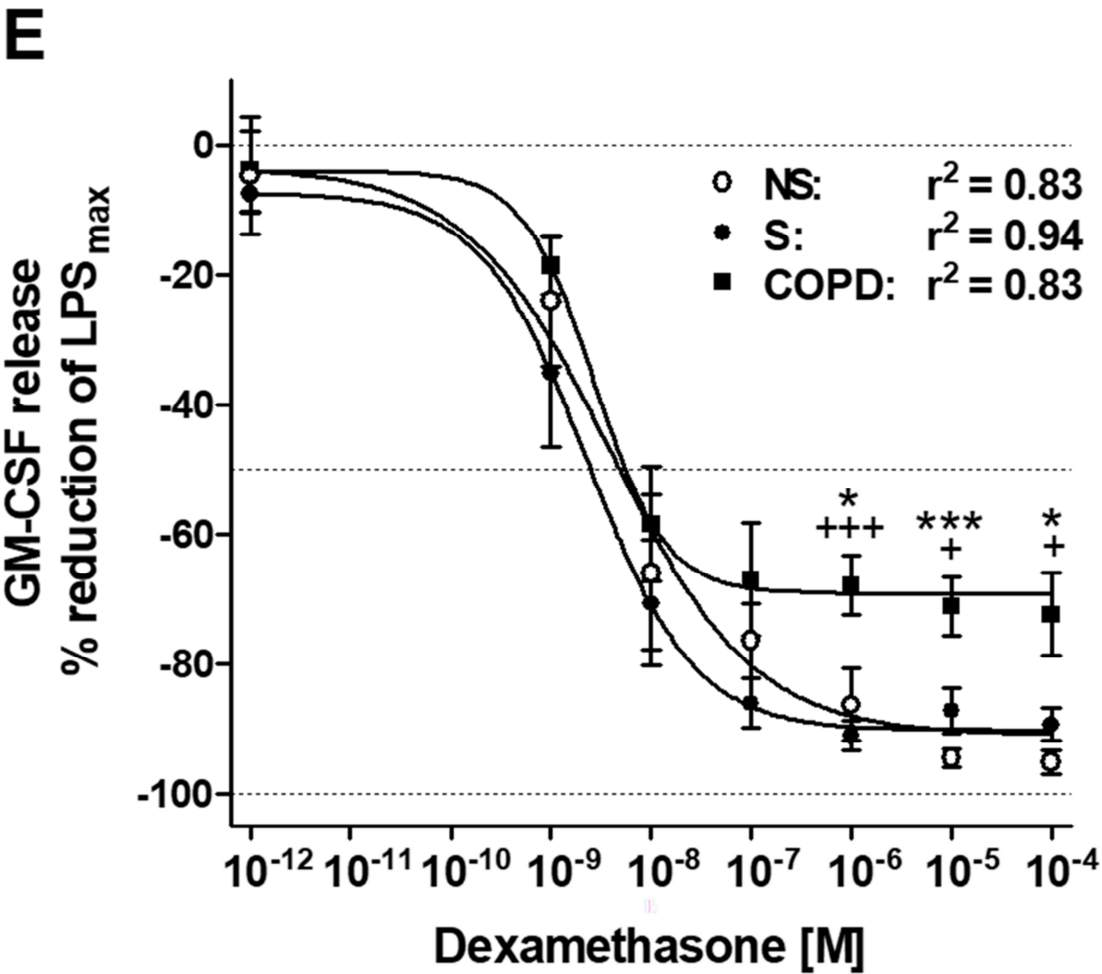


Abbildung 1E.

Im Gegensatz dazu zeigte die konzentrationsabhängige Zugabe von Resveratrol eine Reduzierung der GM-CSF-Freisetzung aus LPS-exponierten Alveolarmakrophagen bis auf den Baselinewert in allen Gruppen, ohne signifikanten Unterschied. (Abbildung 1F, Tabelle 2).

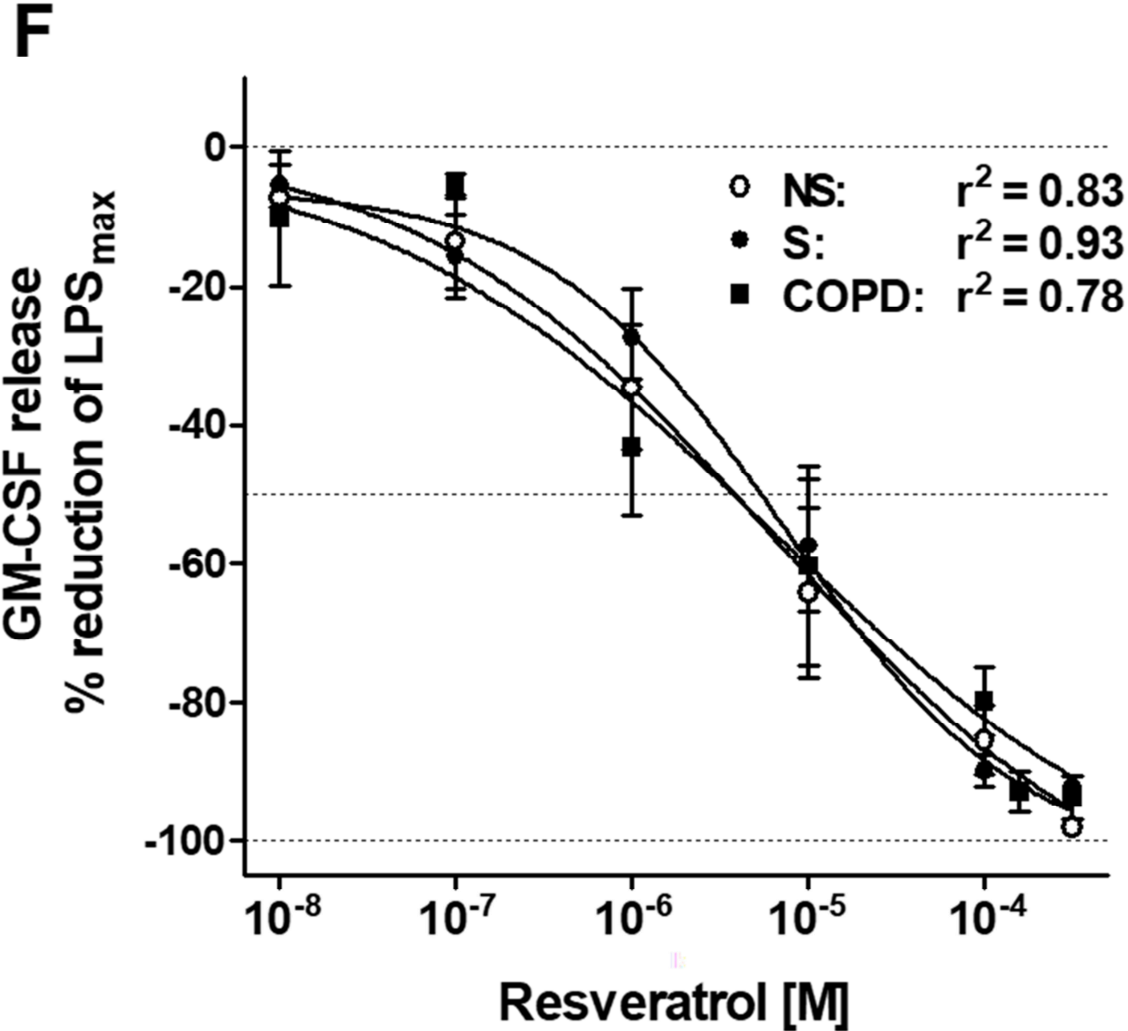


Abbildung 1F.

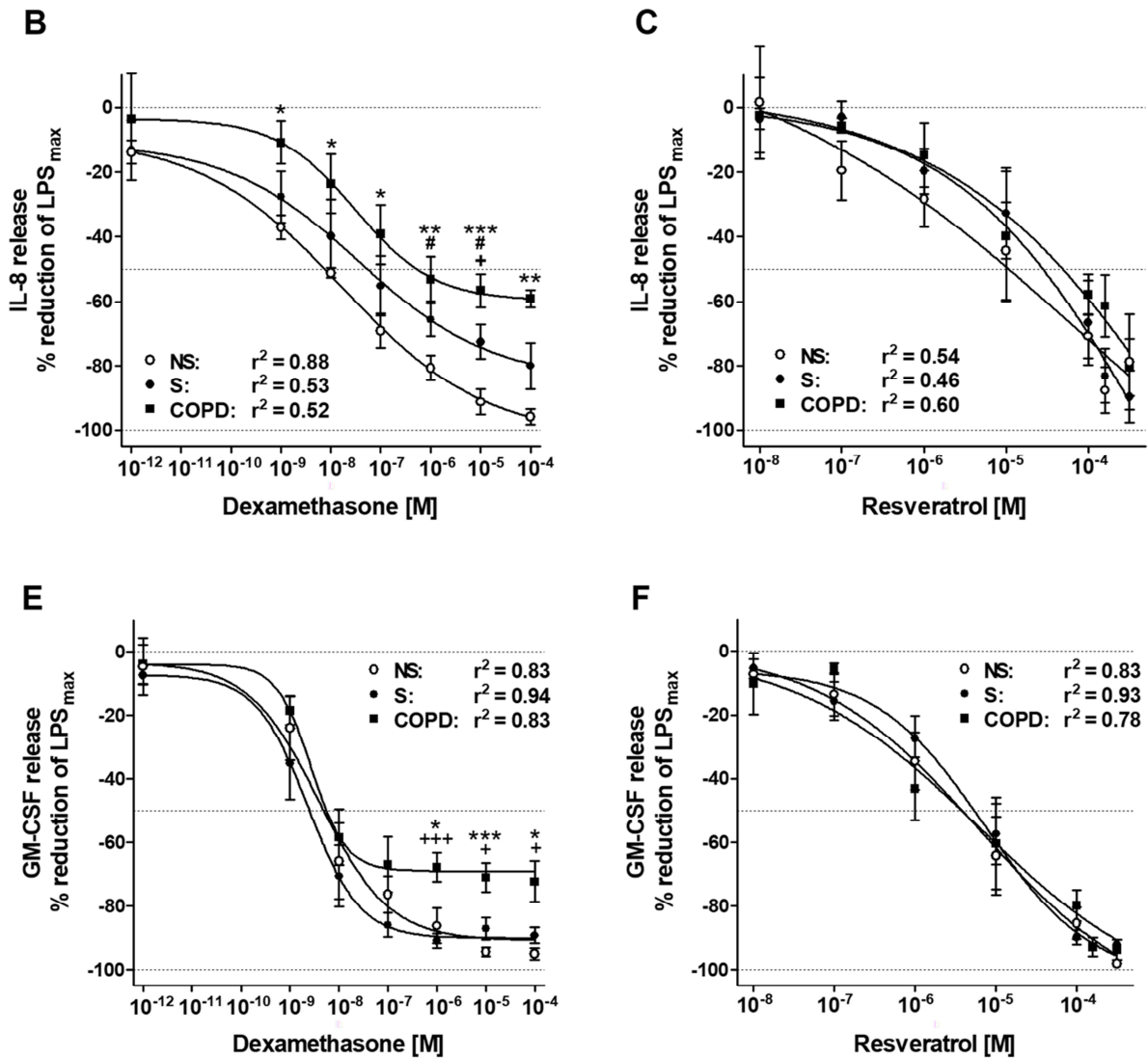


Abbildung 2. (Quelle: modifiziert nach: Knobloch J, Hag H, Jungck D, Urban K, Koch A. Resveratrol impairs the release of steroid-resistant cytokines from bacterial endotoxin-exposed alveolar macrophages in COPD. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2011; 109: 138-143.)

Der Effekt von Dexamethason und Resveratrol auf LPS-induzierte IL-8- und GM-CSF-Freisetzung aus Alveolarmakrophagen. Die Alveolarmakrophagen wurden mit LPS (Konzentration von $1 \mu\text{g/ml}$) für 24-Stunden stimuliert. Dexamethason (linke Spalte) oder Resveratrol (rechte Spalte) wurden in der angegebenen Konzentration zu Medium 1 Stunde vor der Stimulation mit LPS zugegeben. Nach Inkubation wurden IL-8 und GM-CSF mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm S.E.M präsentiert. Die Werte in der linken und rechten Spalte zeigen die prozentige Verringerung im Zusammenhang mit den Zellen, welche vorher lediglich mit LPS stimuliert wurden (LPS_{max}).

Die Konzentration-Response-Kurven wurden nach Durchführung von sigmoidalem Fit erstellt; r^2 , Bestimmtheitsmaß, Die Werte EC₅₀ (mittlere effektive Konzentration), logEC₅₀ und

Emax (extrapolierter maximaler Effekt) zeigt die Tabelle 2. Zu beachten ist, dass in C und F die Emax- Werte in allen Gruppen unter - 100% liegen. Demzufolge wurden die Konzentrations- Response-Kurven mit einem konstanten unteren Wert von -100 % neu berechnet, um die Werte EC50, logEC50 und Emax zu ermitteln (siehe Tabelle 2).

*One-way ANOVA: $p < 0.0001$ (1A&1D; B, C, E&F). Post hoc Bonferroni-Holm Tests in den Abbildungen (1A&1D): * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. Post hoc Bonferroni-Holm Tests in der linken und rechten Spalte (B, C, E&F) wurden durchgeführt, um die Unterschiede in der Substanzwirkung zwischen den Gruppen bei gleicher Konzentration zu untersuchen: NS versus COPD, * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS versus S, # $p < 0.05$; S versus COPD, + $p < 0.05$; +++ $p < 0.001$.*

Tabelle 2.

Emax- und EC50- Werte für den Effekt von Dexamethason und Resveratrol auf die LPS-induzierte Freisetzung von IL-8 /GM-CSF aus Alveolarmakrophagen.

Zytokine	Gruppe	EC ₅₀ (M)	LogEC ₅₀ ± S.E.	E _{max} ± S.E.M. (% reduction)	EC ₅₀ (M)	LogEC ₅₀ ± S.E.	E _{max} ± S.E.M. (%reduction)
		Dexamethason	Dexamethason	Dexamethason	Resveratrol	Resveratrol	Resveratrol
IL-8	NS	1.7 × 10 ⁻⁸	-7.770 ± 0.3437	102 ± 9	6.3 × 10 ⁻⁶	-5.200 ± 0.7051	100
	S	3.7 × 10 ⁻⁸	-7.437 ± 0.8043	85 ± 17	3.4 × 10 ⁻⁵	-4.440 ± 0.3571	100
	COPD	3.1 × 10 ⁻⁸	-7.515 ± 0.6269	60 ± 10	4.0 × 10 ⁻⁵	-4.406 ± 0.3732	100
GM-CSF	NS	3.9 × 10 ⁻⁹	-8.405 ± 0.3139	90 ± 6.1	4.0 × 10 ⁻⁶	-5.400 ± 0.3254	100
	S	2.3 × 10 ⁻⁹	-8.634 ± 0.1373	90 ± 2.1	6.5 × 10 ⁻⁶	-5.189 ± 0.1320	100
	COPD	2.7 × 10 ⁻⁹	-8.565 ± 0.2133	69 ± 3.0	3.9 × 10 ⁻⁶	-5.409 ± 0.4481	100

Die Werte wurden aus den Konzentrations-Wirkungskurven in der vorherigen Abbildung ermittelt. Der Emax-Wert von Resveratroleffekt auf IL-8 und GM-CSF war durch Ermittlung der sigmoiden Konzentrations-Wirkungskurven mit den variablen Basalwerten in allen Gruppen unter -100 % (hundertprozentige Verringerung) (siehe Abbildung 1C, F).

Diese Kurven wurden also für die Ermittlung von Emax- und EC50-Werte mit konstantem Tiefstwert von -100% neu berechnet.

NS, non-smokers; S, smokers; S.E standard error, S.E.M, standard error of the mean; COPD, chronic obstructive pulmonary disease.

5. Diskussion

Der Gesamtspiegel von IL-8 und GM-CSF ist in den Atemwegen von Patienten mit stabiler oder exazerbierter COPD erhöht [8,73]. Unsere Daten zeigen, dass die Aktivierung der Alveolarmakrophagen durch LPS zum Anstieg des IL-8-Spiegels, jedoch zu keinem Anstieg des GM-CSF-Spiegels bei COPD führt [77].

Dennoch wird davon ausgegangen, dass die therapeutische Reduktion nicht nur bei IL-8 und GM-CSF, sondern auch bei den anderen in früheren Studien gemessenen Entzündungsmediatoren bei stabiler und exazerbierter COPD von Nutzen ist [8, 22, 23,73].

In unserer Vorabpublikation (Knobloch et al. 2011) berücksichtigten wir auch die Effekte von Resveratrol und Dexamethason auf die Freisetzung von folgenden Zytokinen: IL-6, MMP-9 und MCP-1.

Wir konnten verdeutlichen, dass die Freisetzung von IL-8 und GM-CSF durch Kortikosteroide gehemmt werden kann. Dexamethason war allerdings nicht in der Lage diese Ausschüttung der beiden Mediatoren aus den Alveolarmakrophagen der COPD vollständig zu reduzieren. Dies belegt, dass die LPS-induzierte IL-8- und GM-CSF- Freisetzung aus den Alveolarmakrophagen teilweise resistent gegenüber Kortikosteroiden bei COPD ist.

Die krankheitsunabhängigen Unterschiede in Bezug auf Kortikosteroiden - Sensibilität von entzündungsfördernden Genen wurden zuvor so postuliert, dass sie auf Unterschieden in der Wirkung von kortikosteroid-sensitiven und - nichtsensitiven Transkriptionsmechanismen beruhen [4]. So hängt beispielsweise die LPS-regulierte Gen-Transkription von Zytokinen in Alveolarmakrophagen normalerweise vom Nuklear-Faktor-kappaB (NF- κ B)- Signal ab, dessen Aktivität sensibel gegenüber Kortikosteroiden ist, und vom Mitogen-aktivierten Protein-kinasen (MAPK)/Aktivator-Protein 1(AP-1)-Signalweg, welcher unempfindlich gegenüber Kortikosteroiden ist [4].

Daher könnte das Ausmaß der Kortikosteroidresistenz eines bestimmten Zytokins vom Verhältnis der kortikosteroidunempfindlichen und -empfindlichen Signalmechanismen abhängen, die für die vollständige transkriptionelle Aktivierung ihres Gens erforderlich sind. Bemerkenswert ist, dass die partielle Kortikosteroidresistenz von der IL-8- und GM-CSF-Freisetzung aus Alveolarmakrophagen charakteristisch für COPD und (im Falle von IL-8) für Raucher ist.

Im Gegensatz dazu verhinderte Dexamethason vollständig die Freisetzung dieser Zytokine aus Alveolarmakrophagen gesunder Nichtraucher.

Diese Tatsache lässt sich mechanistisch durch die verminderte Expression und Aktivität von Histon-Deacetylasen in Alveolarmakrophagen bei COPD erklären, die durch Zigarettenrauch induzierten oxidativen und nitrosativen Stress verursacht werden, da die Histon-Deacetylasen-Aktivität für die antiinflammatorischen Eigenschaften von Kortikosteroiden erforderlich ist [6].

Wie bereits erwähnt, bleibt die Wirksamkeit von Kortikosteroiden bei schwerer und exazerbierter COPD umstritten. Randomisierte kontrollierte Studien, Metaanalysen, Medikamentenzug-Studien und Beobachtungsberichte haben diese Forschungsfrage untersucht, ohne einheitliche Ergebnisse [92]. Die Daten einer durchgeführten großen randomisierten, kontrollierten Studie (Moreover, eine Post-hoc-Analyse der TORCH Studie) deuten darauf hin, dass das Pneumonie-Risiko nach einer COPD-Behandlung mit Kortikosteroiden hoch sein könnte [20]. Darüber hinaus bergen Langzeitbehandlungen mit oralen Kortikosteroiden ein hohes Risiko für signifikante Nebenwirkungen wie Blutzuckeranstieg, Muskelatrophie und Bauchfettleibigkeit [78].

Somit müssen in der Zukunft die antiinflammatorischen Wirkungen der Kortikosteroide bei schwerer oder exazerbierter COPD unter Beweis gestellt werden, um das Risiko für solche Nebenwirkungen als tolerierbar anzuerkennen.

Unsere Ergebnisse demonstrieren, dass die bakterielle Endotoxin-induzierte Freisetzung von COPD-relevanten Entzündungsmediatoren zum Teil unsensibel gegenüber Kortikosteroiden ist. Damit liefern sie ein starkes Argument gegen Verwendung von Kortikosteroiden bei akuter Infekt-Exazerbation einer COPD mit gramnegativen Bakterien.

Im Gegensatz zu Dexamethason reduzierte Resveratrol die LPS-induzierte IL-8-, GM-CSF-Freisetzung aus den Alveolarmakrophagen der COPD bis auf den Ausgangswert. In dieser Hinsicht könnte Resveratrol eine gute Alternative sein, um die entzündliche Reaktion in den Atemwegen bei infektexazerbierter COPD mit gramnegativen Bakterien zu bekämpfen.

Überdies ist Resveratrol auch effizienter als Dexamethason bei der Reduzierung von IL-8- und GM-CSF-Freisetzung aus IL-1 β -aktivierten Alveolarmakrophagen und TNF α -aktivierten glatten Muskelzellen der Atemwege von COPD. Dies könnte bei der Therapie der stabilen COPD nützlich sein [56,23].

Im Gegensatz zu Kortikosteroiden kann Resveratrol nicht nur NF- κ B- sondern auch MAPK-Signalwege blockieren [28 ,107]. Dies könnte die verbesserte Effektivität von Resveratrol, die Freisetzung von Zytokinen aus Alveolarmakrophagen zu reduzieren, erklären.

Bemerkenswert ist, dass die entzündungshemmenden Effekte von Resveratrol relativ hohe Konzentrationen *in vitro* erfordern. Die Plasmakonzentrationen von Resveratrol nach einer einzigen Verabreichung sind beim Menschen relativ niedrig, was auf einen rapiden Stoffwechsel und eine geringe Bioverfügbarkeit hinweist [19]. Allerdings könnten die Plasmaspiegel von unverändertem freiem Resveratrol aufgrund großer Mengen, die möglicherweise in der Zellfraktion enthalten sind, stark unterschätzt werden. Dies wurde in den entsprechenden Studien nicht ausgewertet. Darüber hinaus erhöhte die wiederholte Verabreichung von Resveratrol die Halbwertszeit und die Plasmakonzentration beim Menschen und somit konnte seine wirksame Dosis für entzündungshemmende Effekte verringert werden [57,19]. Des Weiteren versucht man aktuell mit großem Aufwand, die Bioverfügbarkeit zu steigern, zum Beispiel durch strukturelle und chemische Modifikationen.

Somit sind die antiinflammatorischen Wirkungen von Resveratrol auf die Alveolarmakrophagen von COPD, welche hier im Zellkulturmodell von bakterieller Infektion gezeigt wurden, von relevanter Bedeutung in der COPD-Therapie.

Viele Studien deuten zudem auf eine wichtige Rolle von oxidativem Stress bei der Funktionsstörung des Skelett- und Atemmuskels und dem Verlust von Skelettmuskelmasse bei Patienten mit COPD hin [65, 32,74]. Durch Hemmung von oxidativem Stress und Verringerung der Aktivität von NF- κ B würde Resveratrol den Prozess des Muskelabbaus drosseln [79]. Bei einer Studie wurde sogar ein positiver Effekt von Resveratrol auf die Glucocorticoid-induzierte Muskelatrophie beschrieben [2].

Insgesamt zeigen diese Ergebnisse vielversprechende Effekte von Resveratrol auf den oxidativen Stoffwechsel des Skelettmuskels. Dadurch könnten COPD-Patienten, welche eine langfristige Kortisontherapie hinter sich haben, bei einer Behandlung mit Resveratrol sowohl von seinen pulmonalen, als auch von seinen extrapulmonalen Wirkungen profitieren.

Wie bereits erwähnt, beschäftigte sich unsere Vorabpublikation (Knobloch et al. 2011) außerdem mit anderen Zytokinen (Interleukin-6, Monozyten-Chemoattraktorprotein-1 und Matrix metalloproteinase 9), welche bei der COPD-Pathogenese eine entscheidende Rolle spielen.

Interleukin-6 (IL-6) wird von Alveolarmakrophagen, T- und B-Lymphozyten und anderen Zellen synthetisiert und spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Entzündungen, sowohl systemisch als auch lokal. IL-6 ist jedoch nicht nur ein Marker für eine Entzündung der Atemwege, sondern auch ein Prädiktor für eine mögliche Schädigung des Lungenepithels, die zu einem Umbau des Bronchialbaums und einem Elastizitätsverlust des Epithelgewebes führt [99, 109].

Der relative Effekt von LPS auf die IL-6-Freisetzung wurde bei COPD im Vergleich zu S und NS signifikant erhöht. Allerdings wurde die Gesamtmenge des in Kulturüberständen von LPS-exponierten Alveolarmakrophagen gemessenen IL-6 bei COPD verglichen mit NS deutlich reduziert. Ein Vergleich zwischen S und COPD bzw. NS und S zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Sowohl Dexamethason als auch Resveratrol hemmen konzentrationsabhängig die LPS-induzierte IL-6-Ausschüttung aus Alveolarmakrophagen aller Kohorten bis zur Basallinie ohne signifikanten Unterschied.

Dass die Makrophagen mehrere Matrixmetalloproteinasen (MMPs, vor allem MMP-9) sezernieren, wurde bereits in früheren Studien nachgewiesen [100, 85]. Die Alveolarmakrophagen wurden sogar als die MMP-9 Hauptquelle in den Atemwegen von COPD-Patienten mit Emphysem beschrieben [29]. Die Übersekretion von MMP-9, als wichtiger elastolytischer MMP, kann zu einem unerwünschten Abbau von Lungengewebe führen, was eine der Ursachen für COPD [59] sein kann, wahrscheinlich aufgrund der Reize des Tabakrauchs [88]. Die MMP-9-Freisetzung aus LPS-exponierten Alveolarmakrophagen war bei COPD gegenüber S und NS erhöht.

Dexamethason reduzierte teilweise die Freisetzung von MMP-9 aus LPS-exponierten Alveolarmakrophagen, ohne Unterschiede zwischen den Kohorten. Im Gegensatz dazu senkte Resveratrol die MMP-9-Freisetzung aus LPS-exponierten Alveolarmakrophagen nahezu vollständig, ohne Unterschiede zwischen den drei Kohorten. Durch seine vollständige Hemmung von MMP-9- und IL-6-Freisetzung könnte Resveratrol einen positiven Effekt auf die Umbauprozesse (sogenanntes Remodelling) haben.

Das Chemokin MCP-1 wird ebenso von den Alveolarmakrophagen gebildet [103]. Die Sezernierung dieses Chemokins wird durch proinflammatorische Zytokine (unter anderem IL-6 und IL-8) stimuliert [13]. Experimente mit Knockout-Mäusen für das MCP-1-Gen haben gezeigt, dass MCP-1 sogar essentiell für die Rekrutierung von Monozyten ist [106], welche sich im Falle einer Entzündung in Alveolarmakrophagen differenzieren.

Die LPS-induzierte MCP-1-Freigabe war ohne Unterschiede zwischen NS, S und COPD. Dexamethason reduzierte teilweise die MCP-1-Freisetzung aus LPS-exponierten Alveolarmakrophagen ohne Unterschiede zwischen den Kohorten. Im Gegensatz dazu reduzierte Resveratrol die MCP-1-Freisetzung aus LPS-exponierten Alveolarmakrophagen fast vollständig ohne Unterschiede zwischen den drei Kohorten.

Mit dieser Wirkung könnte Resveratrol den durch diese Interaktion von Monozyten, Makrophagen und /MCP-1 verursachten Circulus vitiosus unterbrechen.

Zusammenfassend stützen unsere Daten die Hypothese, dass die entzündungshemmende Eigenschaften von Kortikosteroiden nur begrenzt hilfreich bei der COPD-Therapie sind und stattdessen Resveratrol oder seine Derivate sich als vielversprechende Alternative anbieten.

6. Literaturverzeichnis

1. Agusti A, Anto JM, Auffray C, Barbe F, Barreiro E, Dorca J, Escarrabill J, Faner R, Furlong LI, Garcia-Aymerich J, Gea J, Lindmark B, Monso E, Plaza V, Puhan MA, Roca J, Ruiz-Manzano J, Sampietro-Colom L, Sanz F, Serrano L, Sharpe J, Sibila O, Silverman EK, Sterk PJ, Sznajder JI. Personalized respiratory medicine: exploring the horizon, addressing the issues. Summary of a BRN-AJRCCM workshop held in Barcelona on June 12, 2014. *Am J Respir Crit Care Med*. 2015 Feb 15;191(4):391-401.
2. Alamdari N, Aversa Z, Castellero E, Gurav A, Petkova V, Tizio S, Hasselgren PO. Resveratrol prevents dexamethasone-induced expression of the muscle atrophy-related ubiquitin ligases atrogin-1 and MuRF1 in cultured myotubes through a SIRT1-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012 Jan 6;417(1):528-33.
3. Arai K, Lee F, Miyajima A, Miyatake S, Arai N, Yokota T. Cytokines: coordinators of immune and inflammatory responses. *Annu Rev Biochem*. 1990;59:783-836.
4. Armstrong J, Sargent C, Singh D. Glucocorticoid sensitivity of lipopolysaccharide-stimulated chronic obstructive pulmonary disease alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol*. 2009 Oct;158(1):74-83.
5. Balbi B, Bason C, Balleari E, Fiasella F, Pesci A, Ghio R, Fabiano F. Increased bronchoalveolar granulocytes and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor during exacerbations of chronic bronchitis. *European Respiratory Journal* 1997 10: 846-850.
6. Barnes PJ. Alveolar macrophages as orchestrators of COPD. *COPD* 2004; 1:59–70.

7. Barnes PJ. Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *J Allergy Clin Immunol* 2016; 138:16–27.
8. Barnes PJ. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J Clin Invest* 2008; 118:3546–56.
9. Barnes, P. J. 2000. Chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med* 343:269-280.
10. Barnes, P. J., and M. Karin. 1997. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336:1066-1071.
11. Baur JA, Sinclair DA. Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5:493–506.
12. Bertelli, A., Giovannini, L., Giannessi, D., Migliori, M., Bernini, W. and Fregoni, M., 1995: Antiplatelet activity of synthetic and natural resveratrol in red wine. *Int. J. Tissue React.* 17, 1-3.
13. Bruun JM, Lihn AS, Pederson SB, Richelsen B. Monocyte Chemoattractant Protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): Implication of macrophages resident in the AT. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90(4): 2282-2289.
14. Buist AS, McBurnie MA, Vollmer WM, Gillespie S, Burney P, Mannino DM, Menezes AM, Sullivan SD, Lee TA, Weiss KB, Jensen RL, Marks GB, Gulsvik A, Nizankowska-Mogilnicka E; BOLD Collaborative Research Group.(2007). International variation in the prevalence of COPD (the BOLD Study): a population-based prevalence study. *Lancet.* 2007 Sep 1; 370(9589):741-50.
15. Buist, A.S., Vollmer, W.M., McBurnie, M.A. (2008). Worldwide burden of COPD in high- and low-income countries. Part I. The Burden of Obstructive Lung Disease (BOLD) Initiative. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* 12 (7), 703-708.

16. Chung KF, Adcock IM. (2008). Multifaceted mechanisms in COPD: inflammation, immunity, and tissue repair and destruction. *Eur. Respir. J.* 31,1334-1356.
17. Cosio BG, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock IM, Barnes PJ. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med* 2004;200:689-95.
18. Costabel U., Bross K. J., Matthys H. Bronchoalveoläre Lavage: klinische Bedeutung zytologischer und immunzytologischer Befunde. *Prax. Klein. Pneu-mol.* 1985; 39: 343-355.
19. Cottart CH, Nivet-Antoine V, Laguillier-Morizot C, Beaudoux JL. Resveratrol bioavailability and toxicity in humans. *Mol Nutr Food Res* 2010; 54:7–16.
20. Crim C, Calverley PM, Anderson JA, Celli B, Ferguson GT, Jenkins C, Jones PW, Willits LR, Yates JC, Vestbo J. Pneumonia risk in COPD patients receiving inhaled corticosteroids alone or in combination: TORCH study results. *Eur Respir J.* 2009 Sep;34(3):641-7.
21. Culpitt SV, Maziak W, Loukidis S, Nightingale JA, Matthews JL, Barnes PJ. Effect of high dose inhaled steroid on cells, cytokines, and proteases in induced sputum in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1635-9.
22. Culpitt SV, Rogers DF, Fenwick PS, Shah P, De Matos C, Russell RE, Barnes PJ, Donnelly LE. Inhibition by red wine extract, resveratrol, of cytokine release by alveolar macrophages in COPD. *Thorax.* 2003 Nov;58(11):942-6.
23. Culpitt SV, Rogers DF, Shah P, De Matos C, Russell RE, Donnelly LE, Barnes PJ. Impaired inhibition by dexamethasone of cytokine release by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003 Jan 1;167(1):24-31.

24. Dalal AA, Patel J, D'Souza A, Farrelly E, Nagar S, Shah M. Impact of COPD Exacerbation Frequency on Costs for a Managed Care Population. *J Manag Care Spec Pharm.* 2015 Jul;21(7):575-83.
25. Davies L, Angus RM, Calverley PM. Oral corticosteroids in patients admitted to hospital with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a prospective randomised controlled trial. *Lancet.* 1999 Aug 7;354(9177):456-60.
26. de Ligt M, Timmers S, Schrauwen P. Resveratrol and obesity: can resveratrol relieve metabolic disturbances? *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852:1137–1144.
27. Donaldson GC, Seemungal TA, Bhowmik A et al. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002; 57: 847-852.
28. El-Mowafy AM, White RE. Resveratrol inhibits MAPK activity and nuclear translocation in coronary artery smooth muscle: reversal of endothelin-1 stimulatory effects. *FEBS Lett.* 1999 May 14;451(1):63-7.
29. Finlay, G. A., L. R. O'Driscoll, K. J. Russell, E. M. D'Arcy, J. B. Masterson, M. X. Fitzgerald, and C. M. O'Connor. 1997. Matrix metalloproteinase expression and production by alveolar macrophages in emphysema. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156:240–247.
30. Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Kinsella J.E., 1993: Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 24, 1103-1104.
31. Furth, R. van: Origin and turnover of monocytes and macrophages. *Curr. Top. Pathol.* 1989; 79: 125-50.

32. Gea J, Pascual S, Casadevall C, Orozco-Levi M, Barreiro E. Muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease: update on causes and biological findings. *J Thorac Dis.* 2015 Oct;7(10): E418-38.
33. Geldmacher, H., Biller, H., Herbst, A., Urbanski, K., Allison, M., Buist, A.S., Hohlfeld, J.M., Welte, T. (2008). Die Prävalenz der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) in Deutschland – Ergebnisse der BOLD-Studie. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 133, 2609-2614.
34. Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic pulmonary disease, executive summary. (2006) updated 2007, Medical Communication Resources, Inc.
35. Gomez Perdiguero, E., et al., Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature*, 2015. 518(7540):547-51.
36. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:2335.
37. Gough NM, Nicola NA. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Immunology series*, 1990; 49: 111-153.
38. Groenewegen KH, Schols AM, Wouters EF. Mortality and mortality-related factors after hospitalization for acute exacerbation of COPD. *Chest.* 2003 Aug;124(2):459-67.
39. Hain, R., Reif, H.J., Krause E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stöcker, R.H., Stenzel, K., 1993: Disease resistance result from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature* 361, 153-156.
40. Hettwer, U., 1997: Kurzberichte aus der Wissenschaft: Brot und Wein gegen Krebs. *Naturw. Rdsch.* 50. Jahrgang (9), 358-359.

41. Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med.* 2000 Sep;109(4):288-95.
42. Hipskind, J.D., Paiva, N.L., 2000: Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Mol. Plant Microbe Interact* 13, 551-562.
43. JC1, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L, Cherniack RM, Rogers RM, Sciurba FC, Coxson HO, Paré PD. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2004 Jun 24;350(26):2645-53.
44. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Locantore N, Müllerova H, Tal-Singer R, Miller B, Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *N Engl J Med.* 2010 Sep 16;363(12):1128–38.
45. Ito K, Lim S, Caramori G, Chung KF, Barnes PJ, Adcock IM. Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression, and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages. *FASEB J* 2001; 15: 1110-2.
46. Ito K1, Yamamura S, Essilfie-Quaye S, Cosio B, Ito M, Barnes PJ, Adcock IM. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med.* 2006 Jan 23;203(1):7-13.
47. Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, Fong HH, Farnsworth NR, Kinghorn AD, Mehta RG, Moon RC, Pezzuto JM, 1997: Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes.
48. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153:530-4.

49. Keatings VM, Jatakanon A, Worsdell YM, Barnes PJ. Effects of inhaled and oral glucocorticoids on inflammatory indices in asthma and COPD. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155:542-8.
50. Kimura, Y., Pkuda, H. and Arichi, S., 1985: Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 834, 275-278.
51. Kindl, H., 1985: Biosynthesis of stilbenes. In: *Biosynthesis and biodegradation of wood components* (T. Higuchi, Ed.), Academic Press, New York, 349-377.
52. Kirkham PA, Barnes PJ. Oxidative stress in COPD. *Chest* 2013; 144:266–273.
53. **Knobloch J, Hag H, Jungck D, Urban K, Koch A. Resveratrol impairs the release of steroid-resistant cytokines from bacterial endotoxin-exposed alveolar macrophages in COPD. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 109: 138-143.**
54. Knobloch J, Peters H, Jungck D, Müller K, Strauch J, Koch A. TNF α -induced GM-CSF release from human airway smooth muscle cells depends on activation of an ET-1 autoregulatory positive feedback mechanism. *Thorax* 2009;64:1044–52.
55. Knobloch J, Schild K, Jungck D, Urban K, Müller K, Schweda EK, Rupp J, Koch A. The T-helper cell type 1 immune response to gram-negative bacterial infections is impaired in COPD. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011 Jan 15;183(2):204-14
56. Knobloch J, Sibbing B, Jungck D, Lin Y, Urban K, Stoelben E, Strauch J, Koch A. Resveratrol impairs the release of steroid-resistant inflammatory cytokines from human airway smooth muscle cells in chronic obstructive pulmonary disease. *J Pharmacol Exp Ther*. 2010 Dec;335(3):788-98.

57. Koch A, Giembycz M, Ito K, Lim S, Jazrawi E, Barnes PJ. Mitogenactivated protein kinase modulation of nuclear factor-kappaB-induced granulocyte macrophage-colony-stimulating factor release from human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30(3):342-349.
58. Koch A, Giembycz M, Stirling RG, Lim S, Adcock I, Wassermann K, Erdmann E, Chung KF. Effect of smoking on MAP kinase-induced modulation of IL-8 in human alveolar macrophages. *Eur Respir J*. 2004 Jun;23(6):805-12.
59. Kukkonen M. K., Tiili E., Vehmas T., Oksa P., Piirilä P., Hirvonen A. Association of genes of protease-antiprotease balance pathway to lung function and emphysema subtypes. *BMC Pulmonary Medicine*. 2013;13(1) doi: 10.1186/1471-2466-13-36.
60. Langcake, P. and Pryce, R.J., 1976: The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 77-86.
61. Leckband, G. and Lörz, H., 1998: Transformation and expression of a stilbene synthase gene of *Vitis vinifera* L. in barley and wheat for increased fungal resistance. *Theor. Appl. Genet.* 96, 1001-1012.
62. Lewis C.E., McGee J.D.: *The Macrophage*. Oxford University Press 1993; 3-27.
63. Lundbäck B, Lindberg A, Lindström M, Rönmark E, Jonsson AC, Jönsson E, Larsson LG, Andersson S, Sandström T, Larsson K; Obstructive Lung Disease in Northern Sweden Studies. *Respir Med*. 2003 Feb; 97(2):115-22.
64. Makris D, Moschandreas J, Damianaki A, Ntaoukakis E, Siafakas NM, Milic Emili J, Tzanakis N. Exacerbations and lung function decline in COPD: new insights in current and ex-smokers. *Respir Med*. 2007 Jun;101(6):1305-12.

65. Maltais F, Decramer M, Casaburi R, et al. An official American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: update on limb muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2014; 189:e15–e62.
66. Manna, S.K., Mukhopadhyay, A., Aggarwal, B.B., 2000: Resveratrol suppresses TNF-induced activation of nuclear transcription factors NF- κ B, Akt, and p38, and apoptosis: potential role of reactive oxygen intermediates and lipid peroxidation. *J. Immunol.* 164, 6509- 6519.
67. Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends.
68. McDonald VM, Higgins I, Wood LG et al. Multidimensional assessment and tailored interventions for COPD: respiratory utopia or common sense?. *Thorax* 2013; 68: 691-694.
69. Mukaida N, Matsushima K: Regulation of IL-8 and the characteristics of the receptors for IL-8. *Cytokines* 1992; 4:41-53.
70. Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* 2004;104:2224-34.
71. Nishikawa M, Kakemizu N, Ito T, Kudo M, Kaneko T, Suzuki M, Udaka N, Ikeda H, Okubo T. Superoxide mediates cigarette smoke-induced infiltration of neutrophils into the airways through nuclear factor- κ B activation and IL-8 mRNA expression in guinea pigs in vivo. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1999 Feb;20(2):189-98.
72. Nowak D, Dietrich ES, Oberender P, Uberla K, Reitberger U, Schlegel C, Albers F, Ruckdäschel S, Welsch R. [Cost-of-illness Study for the Treatment of COPD in Germany]. *Pneumologie.* 2004 Dec;58(12):837-44.

73. Papi A, Luppi F, Franco F, Fabbri LM. Pathophysiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3:245–51.
74. Passey SL, Hansen MJ, Bozinovski S, McDonald CF, Holland AE, Vlahos R. Emerging therapies for the treatment of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Ther.* 2016 Oct;166:56-70.
75. Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, Hurd SS. 2001. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary.
76. Richman-Eisenstat JB, Jorens PG, Hebert CA, Ueki I, Nadel JA (1993) Interleukin-8: an important chemoattractant in sputum of patients with chronic inflammatory airway diseases. *Am J Physiol* 264:L413-418.
77. Russell RE, Culpitt SV, DeMatos C, Donnelly L, Smith M, Wiggins J, Barnes PJ. Release and activity of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 by alveolar macrophages from patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 May;26(5):602-9.
78. Saag KG, Furst DE. Major side effects of systemic glucocorticoids.
79. Sadeghi A, Seyyed Ebrahimi SS, Golestani A, Meshkani R. Resveratrol ameliorates palmitate-induced inflammation in skeletal muscle cells by attenuating oxidative stress and JNK/NF- κ B pathway in a SIRT1-independent mechanism. *J Cell Biochem* 2017; 118:2654–2663.
80. Saetta M, Baraldo S, Corbino L, Turato G, Braccioni F, Rea F, Cavallese G, Tropeano G, Mapp CE, Maestrelli P, Ciaccia A, Fabbri LM. CD8+ve cells in the lungs of smokers

with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Aug;160(2):711-7.

81. Saetta M, Turato G, Facchini FM, Corbino L, Lucchini RE, Casoni G, Maestrelli P, Mapp CE, Ciaccia A, Fabbri LM. Inflammatory cells in the bronchial glands of smokers with chronic bronchitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Nov;156(5):1633-9.

82. Saetta M, Turato G, Maestrelli P, Mapp CE, Fabbri LM. Cellular and structural bases of chronic obstructive pulmonary disease. *American journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 163: 1304-1309 (2001).

83. Schoepner, A. and Kindl, H., 1984: Purification and properties of a stilbene synthase from induced cell suspension cultures of peanut. *J. Biol. Chem.* 259, 6806-6811.

84. Schrauwen P, Timmers S. Can resveratrol help to maintain metabolic health? *Proc Nutr Soc* 2014; 73:271–277.

85. Senior, R. M., G. L. Griffin, C. J. Fliszar, S. D. Shapiro, G. I. Goldberg, and H. G. Welgus. 1991. Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases. *J. Biol. Chem.* 266:7870–7875.

86. Sköld CM, Lundahl J, Halldén G, Hallgren M, Eklund A. Chronic smoke exposure alters the phenotype pattern and the metabolic response in human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol.* 1996 Oct; 106(1):108-13.

87. Soler-Cataluna JJ, Martinez-Garcia MA, Román Sanchez P, Salcedo E, Navarro M, Ochando R. Severe acute exacerbations and mortality in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax.* 2005 Nov;60(11):925-31. Epub 2005 Jul 29.

88. Somborac-Bacura A., Popovic-Grle S., Zovko V., Zanic-Grubisic T. Cigarette Smoke Induces Activation of Polymorphonuclear Leukocytes. *Lung*. 2018;196(1):27–31.
89. Stellato C: Post-transcriptional and nongenomic effects of glucocorticoids. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(3):255-63.
90. Subbaramaiah, K., Chung, W.J., Michaluart, P., Telang, N., Tanabe, T., Inoue, H., Jang, M., Pezzuto, J.M. and Dannenberg, A., 1998: Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J. Biol. Chem*. 273, 21875-21882.
91. Suissa S, Dell'Aniello S, Ernst P. Long-term natural history of chronic obstructive pulmonary disease: severe exacerbations and mortality. *Thorax* 2012; 67: 957-963.
92. Suissa S, McGhan R, Niewoehner D, Make B. Inhaled corticosteroids in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4:535–42.
93. Suissa S, Patenaude V, Lapi F, Ernst P. Inhaled corticosteroids in COPD and the risk of serious pneumonia. *Chest*. 2013 Nov; 68(11):1029-36.
94. Tak PP, Firestein GS. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001 Jan; 107(1):7-11.
95. Targowski T, Jahnz-Rozyk K, From S et al. [Relationship between disease severity, smoking index age and direct costs of hospital treatment of COPD exacerbations]. *Pneumonol Alergol Pol* 2005; 73: 32-35.
96. Tomioka R., Kawayama T., Suetomo M., Kinoshita T., Tokunaga Y., Imaoka H., Matsunaga K., Okamoto M., Hoshino T.. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2016 Feb 3; 11:207-16. doi: 10.2147/COPD.S98205. eCollection 2016.

97. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martinez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, Chen R, Decramer M, Fabbri LM, Frith P, Halpin DM, López Varela MV, Nishimura M, Roche N, Rodriguez-Roisin R, Sin DD, Singh D, Stockley R, Vestbo J, Wedzicha JA, Agustí A. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report. GOLD Executive Summary. *Am J Respir Crit Care Med.* 2017 Mar 1;195(5):557-582.
98. Wedzicha JA, Seemungal TA. COPD exacerbations: defining their cause and prevention. *Lancet* 2007; 370:786–96.
99. Whittaker L., Niu N., Temann U.A., Stoddard A., Flavell R.A., Ray A., Homer R.J., Cohn L. Interleukin-13 mediates a fundamental pathway for airway epithelial mucus induced by CD4 T cells and interleukin-9. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2002, Vol. 27, pp. 593-602.
100. Woessner, J. F. Jr. 1991. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *FASEB J.* 5:2145–2154.
101. Woodruff PG, Agusti A, Roche N, Singh D, Martinez FJ. Current concepts in targeting chronic obstructive pulmonary disease pharmacotherapy: making progress towards personalised management. *Lancet.* 2015 May 2;385(9979):1789-1798.
102. <https://goldcopd.org/wp-content/uploads/2018/11/GOLD-2019-v1.7-FINAL-14Nov2018-WMS.pdf>
103. Wysocki SJ, Zheng MH, Smith A, Lamawansa MD, Iacopeta BJ, Robertson TA, Papadimitriou JM, House AK, Norman PE. Monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in injured pig artery coincides with early appearance of infiltrating monocyte/macrophages. *J Cell Biochem.* 1996; 62(3): 303-313.

104. Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K, Narita N. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest*. 1997 Aug; 112(2):505-10.
105. Yang IA, Clarke MS, Sim EH, Fong KM. Inhaled corticosteroids for stable chronic obstructive pulmonary disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2012 Jul 11 ;(7):CD002991.
106. Yoshimura T, Leonard EJ (1990): Identification of high affinity receptors for human monocyte chemoattractant Protein – 1 on human monocytes. *J Immunol* 145: 292-29.
107. Zhenghua Ren, Lei Wang, Jianhua Cui , Zeren Huoc, Jinru Xue , Hao Cui , Qi-qi Mao, Rirong Yang. Resveratrol inhibits NF-κB signaling through suppression of p65 and I B kinase activitie. *Pharmazie* 68: 689–694 (2013).
108. Zhou J, Cidlowski JA: The human glucocorticoid receptor: one gene, multiple proteins and diverse responses. *Steroids*. 2005 May-Jun; 70(5-7):407-17.
109. Zhu Z., Homer R.J., Wang Z., Chen Q., Geba G.P., Wang J., Zhang Y., Elias J.A. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol. 103, pp. 779-788.

Publikationen:

1. **H. Hag**, M. Raidl, K. Müller, A. Koch. Anti-inflammatorische Wirkung von Resveratrol auf die IL-8-Expression in menschlichen Alveolar-Makrophagen- Vergleich mit Dexamethason. Pneumologie 2006; 60 - P119.
2. **H. Hag**, M. Raidl, K. Müller, A. Koch. Anti-inflammatorische Wirkung des Rotweinextrakts Resveratrol auf die GM-CSF- und IL-8-Expression in menschlichen Alveolar-Makrophagen von Rauchern und Nichtrauchern - Vergleich mit Dexamethason. Pneumologie 2007; 61 - P202.
3. Andrea Koch, Jürgen Knobloch, Cathrin Dammhayn , Maria Raidl , Andrea Ruppert, **Haitham Hag** , Dennis Rottlaender ,Katja Müller , Erland Erdmann. Effect of bacterial endotoxin LPS on expression of INF- γ and IL-5 in T-lymphocytes from asthmatics. J Clin Immunol 2007;125(2)194-204
4. Jürgen Knobloch, **Haitham Hag**, David Jungck, Katja Urban, Andrea Koch. Resveratrol Impairs the Release of Steroid-resistant Cytokines from Bacterial Endotoxin-Exposed Alveolar Macrophages in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Basic& Clinical Pharmacology & Toxicology, 03/2011; 109 138-143

Eidesstattliche Versicherung

Haitham Hag

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Antiinflammatorische Wirkung von Resveratrol auf die
IL-8- und GM-CSF-Expression in menschlichen
Alveolarmakrophagen-
ein Vergleich mit Dexamethason**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Schwelm, den 25.11.19

Haitham Hag