

**Hemmung der monozytären Zytokinproduktion (IL-1 $\beta$ ,  
IL-6, TNF- $\alpha$ ) durch die ätherische Öle Myrtol N,  
Orangenöl und Eukalyptusöl in vitro**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med.

an der medizinischen Fakultät der  
Universität Leipzig

eingereicht von: Bettina Carolin Penzel, geb. Dölling  
geb. am 08. Juli 1983 in Oelsnitz/ Vogtland  
angefertigt an: Robert-Koch-Klinik Leipzig  
Thoraxzentrum des Klinikums St. Georg  
betreut von: Professor Dr. med. Adrian Gillissen

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 16.11.2010

**Bibliographische Beschreibung:**

Penzel, Bettina Carolin

**Hemmung der monozytären Zytokinproduktion (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) durch die ätherische Öle Myrtol N, Orangenöl und Eukalyptusöl in vitro**

Universität Leipzig, Dissertation

105 S., 199 Lit., 21 Abb., 22 Tab.

**Referat:**

**Einleitung:** COPD wird zunehmend als eine von den Atemwegen und der Lunge ausgehende systemische Erkrankung verbunden mit einer systemischen Entzündungsreaktion verstanden. Monozyten wird eine Schlüsselrolle in der Inflammation zugeschrieben, so dass sich die Suche nach einer verträglichen, antientzündlich wirkenden Substanz als therapeutische Konsequenz ergibt. Ätherische Öle wurden in letzter Zeit verstärkt bezüglich ihrer antientzündlichen Wirkung evaluiert. **Methodik:** Die Untersuchung wurde als offene, single-center Studie durchgeführt. Primärer Endpunkt war die Reduktion der aus in vitro von COPD-Patienten (n=26) kultivierten Monozyten sezernierten Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6. Die Zellen wurden mit LPS mit Myrtol N, Eukalyptus-, oder Orangenöl über 20 Stunden coinkubiert und die Zytokinkonzentrationen im Zellüberstand mittels ELISA quantifiziert. **Ergebnisse:** Die Zellvitalität nach Inkubation betrug jeweils >80%. **Orangenöl:** Eine Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  nicht aber  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  reduzierte das extrazellulär sezernierte IL-6 um 7,5%. Extrazelluläres IL-1 $\beta$  wurde bei  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  um 17,1% reduziert. Bei Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$ ,  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-6}\%$  blieb TNF- $\alpha$  nahezu konstant.  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  führte dagegen zu einer TNF- $\alpha$ -Steigerung um 17,24%. **Myrtol N:** IL-6 sank bei Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  -  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  um 4,76%, 2,81% und 7,02%. IL-1 $\beta$  blieb bei Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  -  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  nahezu konstant (Reduktion: -3,66%, -2,91%, +6,73%).  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  senkte TNF- $\alpha$  um 27,5% (p=0,341), während Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  TNF- $\alpha$  nicht beeinflussten. **Eukalyptusöl:** Bei Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  kam es zu einem leichten Anstieg von IL-6 um 7,89% und 2,42%.  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  führte zu einer leichten IL-6-Reduktion (-3,11%). IL-1 $\beta$  wurde von Eukalyptusöl ( $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$ ) tendenziell um 4,38% und 6,76% reduziert. TNF- $\alpha$  wurde durch Eukalyptusöl ( $1,5 \cdot 10^{-3}\%$ - $1,5 \cdot 10^{-5}\%$ ) dagegen um 18-22% gesteigert. **Schlussfolgerung:** Ein eindeutiger antiinflammatorischer Effekt der Öle konnte in dem hier auf Monozyten basierenden Zellmodell durch die Arbeit nicht verifiziert werden.

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die chronisch- obstruktive Lungenerkrankung (COPD).....	1
1.1.1	Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2	Ätiologie und Risikofaktoren.....	3
1.1.3	Pathogenese und Pathophysiologie.....	5
1.1.4	Klinik, Diagnostik und Einteilung.....	13
1.2	COPD- eine systemische Erkrankung.....	16
1.2.1	Die systemische Entzündung im Rahmen der COPD.....	16
1.2.2	Die systemische Entzündung als Prognosefaktor.....	23
1.2.3	Extrapulmonale Manifestationen der COPD.....	25
1.3	Die therapeutische Beeinflussbarkeit der Entzündung im Rahmen der COPD.....	33
1.3.1	Allgemeine Therapieprinzipien der COPD.....	33
1.3.2	Kortikosteroide.....	36
1.3.3	N- Acetylcystein.....	38
1.3.4	Ambroxol.....	40
1.4	Ätherische Öle.....	42
1.4.1	Allgemeine Wirkung und Eigenschaften.....	42
1.4.2	Eukalyptusöl und sein Hauptinhaltsstoff 1,8- Cineol.....	43
1.4.3	Orangenöl.....	45
1.4.4	Myrtol N.....	46
2	Aufgabenstellung.....	48
3	Material und Methoden.....	49
3.1	Studiendesign und Patientenauswahl.....	49
3.2	Isolierung humaner Monozyten aus peripherem Blut.....	50
3.3	Zellzählung und Einstellung der Zellkonzentration.....	52
3.4	Präparatherstellung zur Reinheitsbestimmung.....	53
3.5	Stimulation und Kultivierung der Monozyten.....	54
3.6	Gewinnung der Überstände und Vitalitätsprüfung mittels Trypanblau.....	56
3.7	Zytokinbestimmung.....	57
3.7.1	Allgemeines.....	57
3.7.2	TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 und Interleukin- 1 $\beta$ .....	58
3.8	Statistik.....	59
4	Ergebnisse.....	60
4.1	Patientencharakteristika.....	60
4.2	Medikamentenanamnese der Patienten.....	60
4.3	Lungenfunktion der Patienten.....	62
4.4	Serumchemie der Patienten.....	63
4.5	Zytotoxizität von Orangenöl, Eukalyptusöl und Myrtol N.....	64

4.6	Antiinflammatorische Wirkung von Orangenöl .....	64
4.6.1	Interleukin-6 .....	64
4.6.2	Interleukin-1 $\beta$ .....	66
4.6.3	Tumornekrosefaktor $\alpha$ .....	68
4.7	Antiinflammatorische Wirkung von Myrtol N .....	69
4.7.1	Interleukin-6 .....	69
4.7.2	Interleukin -1 $\beta$ .....	70
4.7.3	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	71
4.8	Antiinflammatorische Wirkung von Eukalyptusöl .....	73
4.8.1	Interleukin-6 .....	73
4.8.2	Interleukin-1 $\beta$ .....	74
4.8.3	Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .....	75
4.9	Antiinflammatorische Wirkung von Orangenöl, Myrtol N und Eukalyptusöl im Vergleich... 76	
5	Diskussion.....	79
6	Zusammenfassung .....	87
7	Abbildungsverzeichnis.....	90
8	Tabellenverzeichnis .....	91
9	Literatur .....	92
10	Erklärung .....	103
11	Danksagung .....	104
12	Lebenslauf.....	105

## Abkürzungsverzeichnis

Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
ARDS	Adult respiratory distress syndrome
ATS	American Thoracic Society
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BMI	Body mass index
BODE	BMI, airflow obstruction, dyspnea, exercise capacity
BRONCHUS	Bronchtitis Randomized an NAC Cost- Utility Study
C	Komplementfaktor
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CD	Cluster of differentiation
CI	Konfidenzintervall
CIIS	Cardiac Infarction Injury Score
CO	Kohlenmonoxid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CRP	C- reaktives Protein
CT	Computertomographie
CTGF	Connective tissue growth factor
CXCR	Chemokin- Rezeptor
DNA	Deoxyribonucleid acid
E.coli	Escherichia coli
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme- linked immunosorbent assay
ERS	European Respiratory Society
FEV <sub>1</sub>	Forced expiratory volume in one second , 1- Sekunden- Kapazität
FFMI	Fat- free mass index
FKS	Fetales Kälberserum
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
GRO	Growth-related oncogene
GSH	Reduziertes Gluthation
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HDAC	Histone Deacetylase

---

HOCL	Hypochlorous acid, unterchlorige Säure
HRP	Meerrettich- Peroxidase
ICAM	Intracellular adhesion molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IP	Interferon- $\gamma$ inducible protein
IRDS	Infant respiratory distress syndrome
I-TAC	Interferon-inducible T-cell $\alpha$ -chemoattractant
KHK	Koronaren Herzkrankheit
LPS	Lipopolysaccharid
LTB	Leukotriene B
MCP-1	Monocyte chemotactic peptide-1
MFI	Mean fluorescence intensity
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MHC	Major Histocompatibility Complex
Mig	Monokine- induced by interferon- $\gamma$
MMP	Matrix Metalloproteasen
MMRC	Modified Medical Research Council
MPS	Mononukleäres phagozytisches System
NAC	N-Acetylcystein
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduziert)
NE	Neutrophile Elastase
NF	Nuclearfactor
NIV	Nicht- invasive Beatmung
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidanion
OH <sup>·</sup>	Hydroxylradikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrat
PAF	Plättchenaktivierender Faktor

---

Pa <sub>O2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PBS	Phosphate Buffered Saline
pCO <sub>2</sub>	Kohlendioxidpartialdruck
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetate
RANTES	Zytokin
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
Rpm	Rounds per minute
RPMI	Zellkulturmedium (Roswell Park Memorial Institute- Medium)
RV	Residualvolumen
SLPI	Sekretorischer Leukoprotease- Inhibitor
SOD	Superoxid- Dismutase
TGF	Transforming growth factor
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TORCH	Towards a Revolution in COPD Health
TNF	Tumor necrosis factor
VC	Vital capacity, Vitalkapazität
WHO	World Health Organization
w/o	Without

# 1 Einleitung

## 1.1 Die chronisch- obstruktive Lungenerkrankung (COPD)

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Durch eine Vielzahl unterschiedlicher Definitionen und Kriterien war lange eine einheitliche und global anerkannte Charakterisierung der COPD schwer zu treffen. 2005 erstellten die American Thoracic Society (ATS) zusammen mit der European Respiratory Society (ERS) neue Richtlinien für die Diagnose und Therapie der COPD, die sich auf die GOLD- Kriterien (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) stützen. Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf diese Richtlinien.

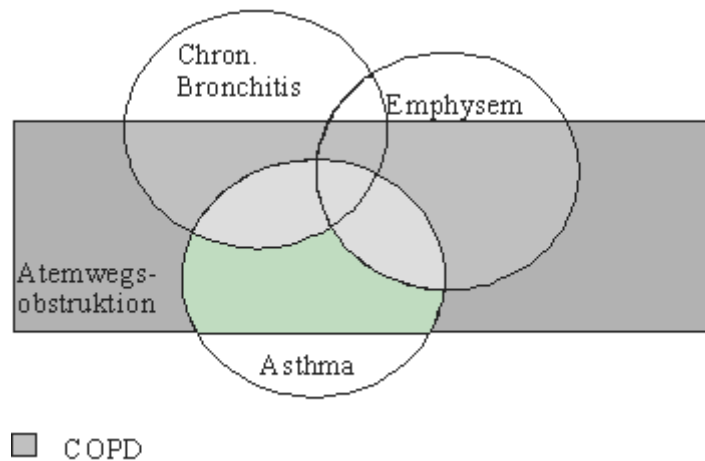
Bei der chronisch- obstruktiven Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease = COPD) handelt es sich in erster Linie um eine nicht mehr vollständig reversible und typischerweise progrediente Atemwegsobstruktion. (Vogelmeier 2007)

Sie ist mit einer abnormalen Entzündungsreaktion der Lunge assoziiert, die durch Noxen in Form von Partikeln oder Gasen (v.a. Zigarettenrauch) hervorgerufen wird. Neben dem Haupteffekt auf die Lunge sind weitere systemische Auswirkungen bekannt. (American Thoracic Society 2004)

In diese Definition fließen außerdem die chronische Bronchitis und das Lungenemphysem mit ein. Dabei gilt die chronische Bronchitis laut WHO (World Health Organization)- Definition von 1961 als „eine Erkrankung, die durch übermäßige Schleimproduktion im Bronchialbaum gekennzeichnet ist und die sich mit andauerndem oder immer wieder auftretendem Husten, mit oder ohne Auswurf an den meisten Tagen von mindestens drei aufeinanderfolgenden Monaten während mindestens zwei aufeinanderfolgenden Jahren manifestiert.“ (WHO 1961)

Das pathologisch- anatomisch diagnostizierbare Lungenemphysem stellt eine dauerhafte und irreversible Erweiterung der Atemwege distal der Bronchioli terminales dar, welches ein Charakteristikum für das fortgeschrittene Erkrankungsstadium ist. (Gillissen 2000) Mittels differenzierter Lungenfunktionsanalyse und bildgebender Diagnostik lassen sich auch im Hinblick auf die optimale Nutzung vorhandener Therapieoptionen die chronisch- obstruktive Bronchitis und das Lungenemphysem unterscheiden, die allerdings in praxi meist kombiniert vorkommen.





**Abbildung 1** Schematische Darstellung der COPD- Definition

Von der COPD sind andere Erkrankungen, die mit einer chronischen Atemwegsobstruktion einhergehen, wie beispielsweise Asthma, Mukoviszidose und Sarkoidose, abzugrenzen. (Vogelmeier 2007)

Derzeit ist die COPD weltweit an 4. Stelle der Todesursachenstatistik. Nach Schätzungen der WHO wird sie im Jahr 2020 bereits die dritthäufigste Todesursache sein. In Deutschland nimmt sie momentan den 7. Rang unter den häufigsten Todesursachen ein. (Murray 1997)

Die sozioökonomischen Folgen sind erheblich. In Deutschland kostet jeder COPD-Patient 3.027 € pro Jahr, die zu 26% durch Krankenhauskosten, zu 23% durch Medikamentenkosten und zu 17 % durch Ausgaben in Folge von Frühberentungen entstehen. (Nowak 2004)

## 1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Bei der Ätiologie der COPD wird bezüglich der Risikofaktoren zwischen endogenen und exogenen Ursachen unterschieden. (Tabelle 1)

endogene Faktoren	exogene Faktoren
<ul style="list-style-type: none"> <li>- genetische Faktoren</li> <li>- Geschlecht</li> <li>- Hyperreagibilität des Bronchialsystems</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rauchen</li> <li>- sozioökonomischer Status</li> <li>- Arbeitsplatz- bedingte Exposition</li> <li>- Luftverschmutzung</li> <li>- perinatale Ereignisse und Erkrankungen in der Kindheit</li> <li>- rezidivierende bronchopulmonale Infekte</li> <li>- Diät</li> </ul>

**Tabelle 1 Risikofaktoren und Verursacher für die Entstehung einer COPD (American Thoracic Society 2004)**

Hauptverursacher der COPD ist das jahre- /jahrzehntelange Zigarettenrauchen. Es ist in 80-90% verantwortlich für die Entstehung der COPD, wobei eine Korrelation zwischen Menge und Dauer des Tabakkonsums und Entstehungsrisiko der Erkrankung besteht. (Halpin 2002)

Die Zigarettenrauch- bedingte Lungenfunktionsabnahme der FEV<sub>1</sub> (forced expiratory volume in one second, 1- Sekundenkapazität) beträgt 0,25% vom Sollwert pro Packungsjahr (eine Zigarettschachtel pro Tag und Jahr = ein Packungsjahr). (Burrows 1977)

Der Anteil der Raucher, die eine durch Lungenfunktionsdiagnostik verifizierbare COPD entwickeln, liegt bei 10-20% („anfällige Raucher“). (Fletcher 1977)

Wodurch diese erhöhte Anfälligkeit verglichen mit nicht- erkrankten Rauchern entsteht, ist weitestgehend unbekannt, jedoch werden genetische Faktoren sowie die Koexistenz anderer Risikofaktoren vermutet.(Gillissen 2000)

Weitere exogene Faktoren stellen beispielsweise die arbeitsplatzbedingte Schadstoffbelastung (z.B durch silikathaltige oder Getreidestäube), eine hohe

Luftverschmutzung (Smog), Passivrauchexposition und sozioökonomische Faktoren dar.

Bezüglich genetischer Einflüsse ist am besten der autosomal- rezessiv vererbte  $\alpha$ -1-Antitrypsinmangel beschrieben, bei dem ein Defizit des Proteaseinhibitors  $\alpha$ -1-Antitrypsin besteht. (American Thoracic Society 2004) Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht zugunsten proteolytisch wirkender Proteasen, die das Lungengewebe „andauern“, woraus eine Emphysementstehung resultiert. (Köhnlein 2003) Obwohl die Erkrankung eine Inzidenz von „nur“ 0,1-0,3% hat (Gillissen 2000), sollte bei obstruktiven Atemwegserkrankungen mit positiver Familienanamnese, sowie bei frühzeitig auftretenden Atemwegsobstruktionen (4.-5. Lebensdekade) an einen  $\alpha$ -1-Antitrypsinmangel gedacht werden. (American Thoracic Society 2004)

Im Vergleich zu nicht- rauchenden Erkrankten verringert ein zusätzlicher Tabakkonsum die Lebenserwartung von homozygoten Mangelträgern von 60 -68 Jahren auf 48 -52 Jahren. (Wittes 2006)

Als weitere relative endogene Risikofaktoren sind eine bronchiale Hyperreagibilität und ein langjährig nicht oder unzureichend behandeltes Asthma aufzuführen. Allerdings besteht dann auch immer der Verdacht auf ein primäres Vorliegen eines allergischen Asthma bronchiale, das sich im späteren Erkrankungsverlauf als COPD klinisch manifestiert. Da etwa 1/3 dieser Patienten rauchen, ist eine klinische Differenzierung deutlich erschwert. (Gillissen 2007)

Auch das männliche Geschlecht gilt als Risikofaktor, wobei dies wahrscheinlich im Zusammenhang mit den exogenen Faktoren Rauchen und berufsbedingter Belastung gesehen werden muss. (American Thoracic Society 2004)

Größere Studien zeigen sogar eine höhere Empfindlichkeit bei Frauen bezüglich der Auswirkungen von Zigarettenkonsum. Die zugrunde liegenden Mechanismen müssen allerdings noch näher untersucht werden. (Prescott 2000)

## 1.1.3 Pathogenese und Pathophysiologie

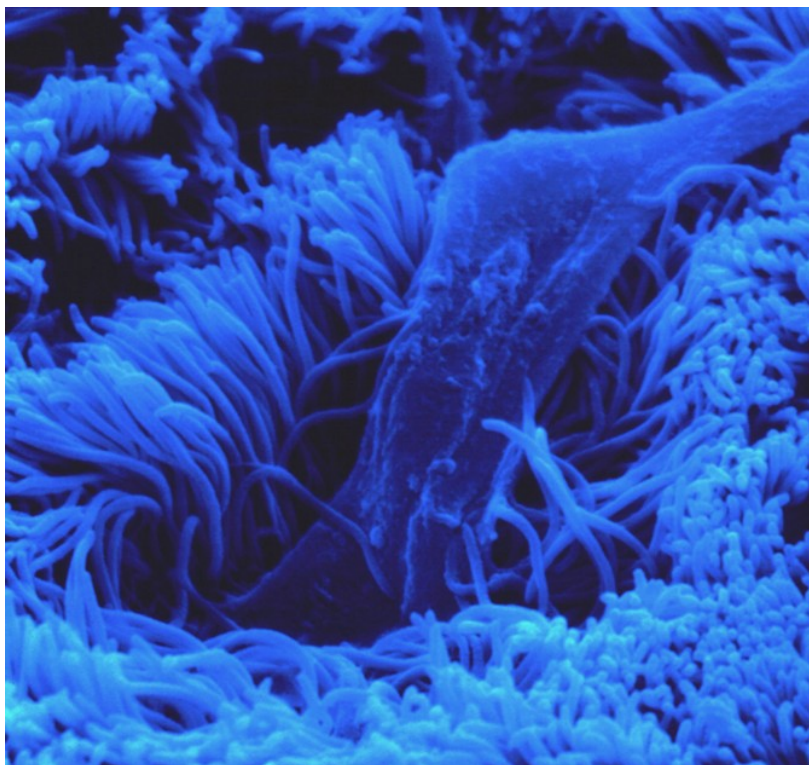
### 1.1.3.1 Befunde

Das pathologische Korrelat der chronisch- obstruktiven Atemwegserkrankung beinhaltet:

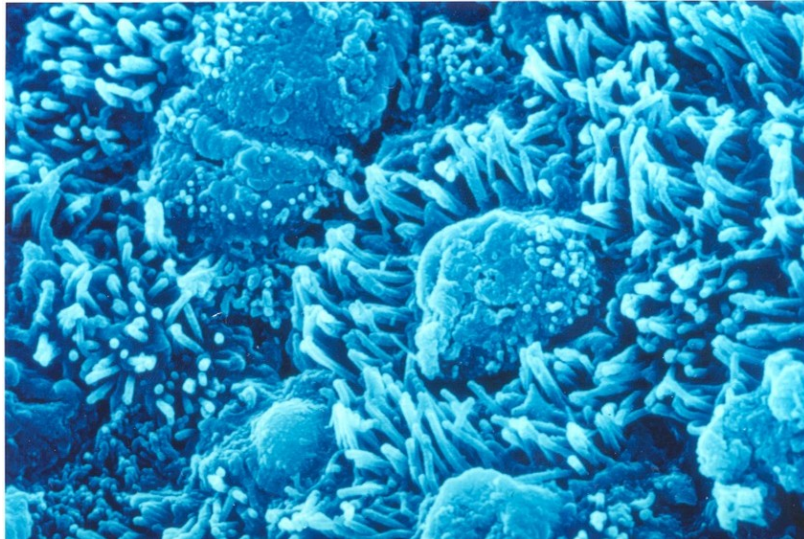
- Mukushypersekretion
- mukozilliäre Dysfunktion mit Mukostase
- Atemwegsobstruktion
- Überblähung der Lunge
- gestörter Gasaustausch (respiratorische Partial- bzw. Globalinsuffizienz)
- pulmonale Hypertension und Cor pulmonale im fortgeschrittenem Stadium
- systemische Effekte (z.B. pulmonale Kachexie, Atrophie der quergestreiften Muskulatur, Osteoporose)

(American Thoracic Society 2004)

Diese komplexe Pathologie ergibt sich aus dem Zusammenspiel verschiedener Faktoren, die nachfolgend erläutert werden.



**Abbildung 2** Elektronenmikroskopisches Bild des physiologischen Sekretstroms über die Zilien (Morgenroth 2007)



**Abbildung 3** Breitflächiger Zilienverlust am Bronchialepithel bei chronischer Bronchitis (Morgenroth 1987)

### 1.1.3.2 Entzündungsreaktion und beteiligte Zellen

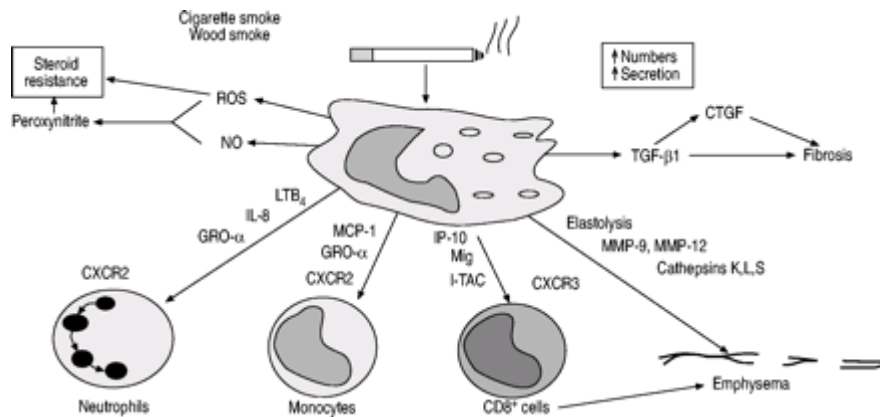
Pathophysiologisch liegt der COPD eine chronische Entzündungsreaktion in den Atemwegen zugrunde. Dabei können durch proteolytische und pro-oxidative zelluläre Entzündungsreaktionen das Lungenparenchym und das pulmonale Gefäßbett mit involviert werden. Die Ausbildung eines Lungenemphysems und/oder eines Cor pulmonale sind die Folgen. Die Entzündung bei der COPD wird durch folgende Zellen dominiert: alveoläre Makrophagen, neutrophile Granulozyten und in schweren Fällen auch T- Lymphozyten (v.a. CD (cluster of differentiation) 8<sup>+</sup>) (Saetta 1993; Saetta 1994; Saetta 1998; Saetta 1999)

Der neutrophile Granulozyt ist die Schlüsselzelle dieser zellulären Entzündung. Diese Granulozyten werden sowohl von aktivierten alveolären Makrophagen rekrutiert als auch direkt durch inhalede Noxen aus dem pulmonalen Gefäßbett angelockt. Sie erreichen den Bronchialraum aus dem Kapillarbett durch aktive Wanderung durch die Alveolarwand hindurch, wo sie an Epithelzellen des Bronchialsystems adhären. Die für die Entzündungsreaktion prädominierend von den Entzündungszellen freigesetzten Mediatoren sind: Proteasen (z.B. neutrophile Elastase, Matrix Metalloproteasen) die, sofern nicht durch Antiproteasen (z.B. alpha1-Antitrypsin, SLPI= secretory leukoprotease inhibitor) inhibiert, die alveoläre Destruktion fördern und somit die

Emphysementstehung initiieren, sowie die Mukusproduktion steigern (Hyperkrinie). (Gillissen 1993) (Barnes 2003) Zudem wirken Entzündungszellen, sofern nicht durch Antioxidantien (z.B. Glutathion, Katalase, Superoxid Dismutase) inaktiviert, über die Freisetzung reaktiver Sauerstoffmetabolite (Oxidantien) destruierend auf das Lungengewebe. (Buhl 1994) (Gillissen 1995) Passend dazu besteht eine Korrelation zwischen zirkulierenden neutrophilen Granulozyten und dem Abfall der FEV<sub>1</sub>. (Sparrow 1984)

Eine bedeutende Rolle im Entzündungsgeschehen der COPD wird auch den alveolären Makrophagen zugeschrieben. Sie wirken proinflammatorisch, ihnen wird aber auch physiologisch eine Schutzfunktion zuteil, indem sie als fremd erkannte Partikel, Mikroorganismen und mitogene Zellen phagozytieren, sowie chemotaktisch auf andere Entzündungszellen wirken und somit eine Immunantwort hervorrufen. (Thepen 1994) Sie differenzieren sich aus zirkulierenden Monozyten, die bei COPD- Patienten aufgrund erhöhter chemotaktischer Enzyme (z.B. monocyte chemotactic peptide-1 = MCP-1) vermehrt rekrutiert werden. Solche Monozyten- selektiven Chemokine finden sich vermehrt im Sputum und der BAL (bronchoalveoläre Lavage) von COPD- Patienten. (Capelli 1999) (Traves 2002) Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Anzahl alveolärer Makrophagen und Schweregrad der COPD. (Di Stefano 1998) (Russell 2002)

Alveoläre Makrophagen exprimieren eine Reihe inflammatorischer Proteine, die den Entzündungsprozess im Rahmen der COPD unterhalten, indem sie ihrerseits andere Entzündungszellen (v.a. neutrophile Granulozyten, aber auch Monozyten und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten) aus dem Gefäßbett rekrutieren. Außerdem wirken sie, ähnlich wie Granulozyten, durch freigesetzte Oxidantien und Proteasen, sofern sie nicht adäquat abgebaut werden, selbst destruierend. Hierbei sind v.a. elastolytisch wirksame Matrix Metalloproteasen, wie MMP-9 und 12 zu nennen. (Hubbard 1991) Die Freisetzung inflammatorischer Proteine und das elastolytische Potential sind in alveolären Makrophagen von COPD- Patienten verglichen mit normalen Rauchern deutlich erhöht. (Russell 2002) (Lim 2000) Einen Überblick über die Wirkung der alveolären Makrophagen bietet Abbildung 4.



**Abbildung 4** Schematische Darstellung der Rolle von alveolären Makrophagen im Rahmen der COPD aus (Barnes 2003)

Zudem wird diesen Zellen eine Beteiligung an der schwachen Wirksamkeit von Glukokortikosteroiden auf die Inhibition der TNF (tumor necrosis factor)- $\alpha$ -, IL (Interleukin)-8- und MMP-9-Freisetzung bei COPD- Patienten zugeschrieben. Dies wird auf eine Reduktion der Histone Deacetylase (HDAC) in Makrophagen von Erkrankten zurückgeführt, deren eigentliche Aufgabe in der Ausschaltung inflammatorischer Gene besteht. Der Mangel der HDAC korreliert dabei mit einer gesteigerten Freisetzung von TNF- $\alpha$  und IL-8 und einer verminderten Wirksamkeit von Glukokortikosteroiden. (Ito 2001)

Die dritte wichtige Gruppe der Entzündungszellen sind Lymphozyten. Ihre Rolle im Rahmen der COPD ist noch nicht vollständig geklärt. Es wird angenommen, dass bei COPD- Patienten infolge der chronischen Bakterien- und Viren- Kolonisation der unteren Atemwege eine gesteigerte immunologische Antwort hervorgerufen wird, die sich in einer erhöhten Anzahl dieser Zellpopulation widerspiegelt und mit der Schwere der Erkrankung korreliert. (Hogg 2004) Im Vergleich zu gesunden Rauchern finden sich bei COPD- Patienten (aktive Raucher) vermehrt CD8<sup>+</sup> T- Lymphozyten im peribronchialen (Lungen-) Gewebe. (Saetta 1998) Möglicherweise stellt die erhöhte Anzahl CD8<sup>+</sup> T- Lymphozyten einen Diskriminierungsfaktor zwischen "empfindlichen" (Ausbildung einer COPD) und "nicht-empfindlichen" Raucher (gesunde Raucher) dar. Offenbar nähern sich die Erkrankungsbilder schweres Asthma und schwere COPD

histomorphologisch an, da im Bronchial-/Lungengewebe der COPD Lymphozyten nachgewiesen werden und beim schweren Asthma das histologische Bild durch eine Neutrophilie dominiert wird. (Di Stefano 2002) Lymphozyten transkribieren und sezernieren Entzündungsmediatoren, wie z.B. TNF- $\alpha$ , Perforine und Granzyme. Diese Mediatoren wirken proapoptotisch und induzieren Granulozyten zur Freisetzung weiterer proinflammatorischer Faktoren. (Cosio 2002) Eine weitere wichtige Funktion der T-Lymphozyten besteht in der Aktivierung von Makrophagen durch die Freisetzung des Zytokins IFN (Interferon)- $\gamma$ , das als wichtigster Stimulator der Makrophagen gilt. Diese wiederum sezernieren in der Folge Zytokine, u.a. IL-12, die z.B. eine weitere Differenzierung der Lymphozyten zur Folge haben. (Cosio 2002)

Epithelzellen kleiden die Atemwege aus und haben diverse physiologische Aufgaben, die weit über die reine Barrierefunktion zwischen der Lunge und der Umwelt hinausgehen. So sind bronchiale Epithelzellen in der Lage als Reaktion auf inhalative Noxen Entzündungsmediatoren, u.a. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8 und GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) zu sezernieren. Außerdem setzen sie den TGF (transforming growth factor) - $\beta$  frei, ein die Fibrose stimulierender zellulärer Mediator. (Takizawa 2001) Die Produktion von Endothelin bei COPD-Patienten, welches vaso- und bronchokonstriktorisch wirkt, zeigt eine weitere regulatorische Funktion dieser Zellen. (Gillissen 2000) (MacNee 2005)

### **1.1.3.3 Proteasen- Antiproteasen- System und oxidativer Stress**

Neben der Entzündungsreaktion sind ein Ungleichgewicht des Proteasen-Antiproteasensystems, sowie das Oxidantien- Antioxidantiensystem zwei für die Ausbildung eines Lungenemphysems und die Ausbildung und Unterhaltung der chronischen bronchialen Entzündung an der Entstehung der COPD beteiligten Mechanismen.

Proteasen wirken durch Spaltung der Peptidbindungen ihrer Zielproteine. Die für die COPD wichtigsten Proteasen gehören zu den Gruppen der Serin-, Metallo- und Cystein-Proteasen und werden von Vorstufen neutrophiler Granulozyten und Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Strukturzellen der Lunge produziert. (Owen 2005) Elastin, Hauptkomponente von elastischen Fasern, wird von Proteasen angedaut,



wodurch im Rahmen des Verlustes an elastischen Fasern aus einer gesunden Alveolarstruktur ein Lungenemphysem entsteht. Ein vermehrter Elastinabbau korreliert bei Rauchern mit einem schnellen Abfall der Lungenfunktion. (Gottlieb 1996) Die größte Bedeutung für die Entstehung eines Lungenemphysems besitzt die Serin-Protease Neutrophile Elastase (NE) mit einer elastolytische Kapazität von 100%. (Abramson 1991) (Hubbard 1991) Sie wird von neutrophilen Granulozyten freigesetzt und wirkt zusätzlich u.a. steigernd auf die Mukussekretion und die Freisetzung von Zytokinen aus Epithelzellen. (Sommerhoff 1990) (Nakamura 1992) Weitere Proteasen, die in erhöhter Konzentration bei COPD- bzw. Emphysem- Patienten gefunden werden, sind die Serin- Proteasen Cathepsine G und Proteinase 3, die Cystein- Proteasen Cathepsine L und S, sowie die Matrix Metalloproteasen MMP 1, 9 und 12. (Barnes 2003)

Antiproteolytisch und damit schützend wirken v.a.  $\alpha$ -1-Antitrypsin, SLPI und Gewebeinhibitoren (tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)). Ein Ungleichgewicht zwischen Proteolyse und Antiproteolyse entsteht einerseits im Rahmen von Entzündungsprozessen mit vermehrter Freisetzung von Proteasen aus Entzündungszellen und andererseits durch ein Defizit (s.1.1.2) bei Inaktivierung von Antiproteasen. (Hubbard 1991) (Sibille 1990)

Oxidantien sind z.T. hoch reaktive Sauerstoffmetabolite, die einen Elektronentransfer von einer ganzen Reihe von Molekülen fördern können, wodurch diese oxidiert werden. Oxidantien sind Elektronenakzeptoren, die in der Lage sind, direkt Proteine, Lipide und Kohlenhydrate zu schädigen, wodurch diese für ihre normale Funktion unbrauchbar werden. Als direkte Folge kommt es zu einer Schädigung von Zellen bzw. Zellverbänden, die insbesondere auch Parenchym- und Bindegewebszellen betreffen kann: DNA (Desoxyribonucleid acid)- Zerstörung, Enzym- und Proteininaktivierung und Lipidperoxidation. Zum anderen wirken Oxidantien indirekt über die Regulation proinflammatorischer Mediatoren (z.B. IL-8, TNF- $\alpha$ , NO(Stickstoffmonoxid)) via Transkriptionsfaktoren. NF (nuclearfactor)-  $\kappa$ B wird durch ROS (reactive oxygen species) aktiviert mit der Folge einer gesteigerten Produktion und zellulären Freisetzung proinflammatorischer Zytokine. (Adcock 1994) (Rusznak 1996) Außerdem aktivieren Oxidantien die zelluläre Elastasen- und MMP- -Freisetzung und inaktivieren über die

Oxidation des Methion-haltigen aktiven Zentrums Antiproteasen z.B.  $\alpha$ -1-Antitrypsin, SLPI und TIMPs- sowie Antioxidantien. (Köhnlein 2003)

Oxidantien werden im Rahmen der unspezifischen Immunantwort von Entzündungszellen enzymatisch (s.u.) generiert (respiratory burst) oder extern z.B. beim Zigarettenrauch oder beim beatmeten Patienten bei einer Sauerstoffzufuhr inhaliert. Es werden ROS und RNS (reactive nitrogen species) unterschieden. (Owen 2005) Oxidantien und Proteasen sind nichts grundsätzliche Schlechtes, da Sie für biochemische Reaktionen und im Rahmen der unspezifischen Immunantwort (innated immunity) unabdingbarer Bestandteil biologischer Systeme sind. Allerdings ist für die Aufrechterhaltung einer normalen Funktion ein ausgeglichenes Gleichgewicht zwischen toxisch- wirkenden Oxidantien und protektiv- wirkenden Antioxidantien eine *conditio sine qua non*. Wird diese Balance z.B. im Rahmen einer Entzündung (Mangel an Antioxidantien) oder einer zu hohen exogenen Sauerstoffbelastung (Hyperoxie z.B. bei der invasiven Beatmung) zugunsten der Oxidantien verschoben, entsteht ein so genannter oxidativer Stress. Solch ein solcher Zustand wird z.B. bei der COPD- Exazerbation oder beim ARDS (adult respiratory distress syndrome) angenommen. (MacNee 2001)

Zellen generieren über die NADP (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)-/ NADPH- Oxidase- und die Xanthin- /Xanthin- Oxidase- Reaktion das Superoxidanion  $O_2^-$  (Superoxidanion), das selbst – wenn auch nur schwach- oxidativ wirkt oder spontan bzw. unter Mithilfe der Superoxid- Dismutase in das reaktivere Wasserstoffperoxid  $H_2O_2$  umgewandelt wird.  $H_2O_2$  reagiert wiederum durch die in Entzündungszellen vorkommende Myeloperoxidase in die hochreaktive unterchlorige Säure HOCL. Außerdem reagiert  $H_2O_2$  mit Eisen (Fenton-Reaktion). Das Produkt ist das hochreaktive Hydroxylradikal  $OH\cdot$ .  $O_2^-$  und Stickstoffmonoxid NO bilden Peroxynitrat  $ONOO^-$ . (Owen 2005)

Zum Schutz vor diesen reaktiven Sauerstoffmetaboliten besitzen Zellen ein mehrfach abgesichertes antioxidatives intra- und extrazelluläres System. So reagiert reduziertes Gluthation (GSH) im  $\gamma$ - Glutamylzyklus mit  $H_2O_2$  zu Sauerstoff und Wasser, Superoxid- Dismutase (SOD) reagiert mit  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$ . Die Katalase baut ebenfalls  $H_2O_2$  ab. (Heffner 1991) Ein Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen System konnte im Ausatemkondensat, in der BAL, im Plasma, im Urin und in Leukozyten sowohl von Rauchern als auch von exazerbierten COPD- Patienten

nachgewiesen werden. (Pratico 1998) (Morrow 1995) (Rahman 1997) (Morrison 1999) Beispielsweise ist der Anteil an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Ausatemkondensat bei exazerbierten COPD-Patienten verglichen mit gesunden Rauchern erhöht. (Nowak 1996) Durch eine bei Rauchern beschriebene kompensatorische GSH- Erhöhung in der BAL sind Raucher allerdings ausreichend vor diesen ROS geschützt. (Owen 2005) Eine Imbalanz besteht bei stabilen COPD- Patienten oder rauchenden Patienten mit einer chronischen Bronchitis nicht. (Lukas 2005)

### 1.1.3.4 Weitere beteiligte Mechanismen

Reparaturmechanismen sind ein Teil von Entzündungsvorgängen - so auch in der Lunge- und haben zum Ziel, die geschädigte Gewebearchitektur und die Gewebefunktion wiederherzustellen. Allerdings kann die Reparatur selbst unvollständig ablaufen und, falls ineffektiv, in einem letztendlich schadhafte Endzustand münden. (Jeffery 1991) Die im Rahmen der zellulären Reparatur freigesetzten Mediatoren (z.B. TGF-β; IL-1, -6, -8; Wachstumsfaktoren, wie z.B. GM-CSF) stimulieren die Freisetzung von Proteinen, wie z.B. dem Fibronectin und es kommt an den Wundrändern des bronchoepithelialen Schadens zur Dedifferenzierung der dort befindlichen gesunden Epithelzellen. Man nimmt an, dass diese zellulären Vorgänge fibrotische Vorgänge in den Bronchien von COPD- Patienten fördern oder sogar die Ausbildung eines Lungenemphysems triggern können. (Cantral 1995) (Wang 2001)

Exazerbationen sind häufig durch Viren verursacht. Die Rolle einer chronisch-persistierenden Virusbesiedlung ist bei der COPD allerdings ungeklärt. Möglicherweise unterhält aber eine chronische Virusbeseidlung inflammatorische Prozesse in den Bronchien oder sogar im Lungenparenchym. So wurde bei Patienten mit einem Lungenemphysem die Adenovirus- DNA- Sequenz E1A im Vergleich zu gesunden Rauchern vermehrt gefunden und korreliert mit dem Ausmaß der zellulären Entzündung. (Retamales 2001)

Kontrovers wird die pathogene Rolle bakterieller Infektionen gesehen. Die „Teufelskreishypothese“, nach der durch das Wirken exogener Noxen Entzündungszellen aktiviert werden, die Mediatoren freisetzen, welche wiederum eine bakterielle Kolonisation begünstigen, scheint möglicherweise nur bei einem Teil der

Patienten von tatsächlich pathogener Bedeutung zu sein, z.B. bei zusätzlich bestehenden Bronchiektasen und einer chronischen *Pseudomonas aeruginosa*-Besiedlung. Die dadurch unterhaltende Entzündung ist mit einem beschleunigten jährlichen FEV<sub>1</sub>-Abfall und einer Erkrankungsinstabilität in Form rezidivierender COPD- Exazerbationen assoziiert. (Wilson 1992)

#### 1.1.4 Klinik, Diagnostik und Einteilung

Klinisch imponiert die COPD durch:

- chronischen Husten mit
- Hyperkrinie und/oder
- Dyspnoe

(Bundesärztekammer 2006) (GOLD 2006) (Vogelmeier 2007)

Risikofaktoren (z.B. Rauchen, Hyperreagibilität des Bronchialsystems) wirken für den COPD- Verlauf agravierend (s.1.1.2). Die Diagnose wird primär klinisch anhand der Anamnese und der o.g. Leitsymptome, welche in ihrer Ausprägung jedoch variieren können, gestellt. Klinisch imponieren die Zeichen der chronischen Bronchitis und der Atemwegsobstruktion (verlängertes Expirium mit Giemen, Brummen und Pfeifen). Beim Lungenemphysem sind das Atemgeräusch und die Herztöne nur abgeschwächt auskultierbar und der perkutorische Klopfeschall ist charakteristischer Weise hyper sonor. Ein Emphysepatient imponiert durch einen Faßthorax als Zeichen der chronischen Überblähung und dem Einsatz der Hilfsmuskulatur. Zeichen der Rechtsherzbelastung sind periphere Ödeme und Halsvenenstauung.(Gillissen 2000) (Schneider 2005)

Die Schweregradeinteilung der COPD erfolgt auf dem Boden des lungenfunktionsanalytischen Ergebnisses (Spirometrie, Ganzkörperplethysmographie, Fluss- Volumen- Diagramm) und wird in 4 Stufen gegliedert (s. Tabelle 3). (Vogelmeier 2007) Bei nachgewiesener Atemwegsobstruktion muss mittels einer Reversibilität das therapeutische Ansprechen getestet werden. Eine Verbesserung der FEV<sub>1</sub> durch ein kurz- wirksames  $\beta_2$ -Mimetikum um 15% und 200ml ist für die COPD untypisch und wäre für ein Asthma charakteristisch. Die Abgrenzung zum Asthma bronchiale ist allerdings in manchen Fällen schwierig, da bei lange bestehender Erkrankung eine vollständige Reversibilität nicht mehr gegeben sein muss und bei vielen COPD- Patienten eine leichte- wenn auch nicht vollständige- Reversibilität vorliegt. (Vogelmeier 2007)

<b>Merkmal</b>	<b>COPD</b>	<b>Asthma</b>
Alter bei Erstdiagnose	meist 6. Lebensdekade	meist Kindheit, Jugend
Tabakrauch	überwiegend Raucher	kein Kausalzusammenhang
Atemnot	bei Belastung	anfallsartig auftretend
Allergie	selten	häufig
Reversibilität der Obstruktion	nie voll reversibel, $\Delta FEV_1 < 15\%$	gut, $\Delta FEV_1 > 20\%$
Obstruktion	persistierend, progredient	variabel, episodisch
bronchiale Hyperreagibilität	möglich	regelmäßig vorhanden
Ansprechen auf Kortison	gelegentlich	regelmäßig vorhanden

**Tabelle 2 Differentialdiagnose Asthma und COPD (Vogelmeier 2007)**

Die spirometrische Klassifikation der COPD bezieht sich neben dem Quotienten  $FEV_1/VC$  (Vitalkapazität) vor allem auf den Einzelwert  $FEV_1$ , der zwar der Komplexibilität der Erkrankung nicht gerecht werden kann, jedoch einen Richtwert für die Einordnung in Krankheitsstadien und für die Mortalität liefert. (American Thoracic Society 2004)

Leicht (I)	- $FEV_1 \geq 80\%$ , - $FEV_1/VC < 70\%$ - mit/ ohne Symptome (Husten, Auswurf)
Mittel (II)	- $50\% \leq FEV_1 < 80\%$ - $FEV_1/VC < 70\%$ - mit/ ohne chronische Symptome (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
Schwer (III)	- $30\% < FEV_1 < 50\%$ - $FEV_1/VC < 70\%$ - mit/ ohne chronische Symptome (Husten, Auswurf, Dyspnoe)
Sehr schwer (IV)	- $FEV_1 \leq 30\%$ - $FEV_1/VC < 70\%$ - $FEV_1 < 50\%$ + chronisch respiratorische Insuffizienz

**Tabelle 3 Schweregradeinteilung der COPD nach (GOLD 2006) (Vogelmeier 2007)**

Als weiterführende Diagnostik der Lungenfunktion können die Messung der CO (Kohlenmonoxid)- Diffusionskapazität und des inspiratorischen Drucks mittels Mundverschlussmethode zur Differenzierung zwischen chronisch- obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem beitragen. (Schmidt 1990) (Ulmer 1991) (Deutsche Atemwegsliga 1994)

Mit der Blutgasanalyse wird eine Hypoxämie und Hyperkapnie, welche für eine respiratorische Insuffizienz typisch wäre, erkannt. Ein erniedrigter pH- Wert zeigt bei Hyperkapnie ein drohendes respiratorisches Versagen an und ist für die Beatmungsindikation entscheidungsbestimmend. (Plant 2000) Kann das Symptom Dyspnoe mit den genannten diagnostischen Instrumenten keiner Erkrankung zugeordnet werden, sind weiterführende differentialdiagnostische Maßnahmen, wie z.B. Bronchoskopie mit BAL, Computertomographie (CT) des Thorax, Echokardiographie, ggf. eine Herzkatheteruntersuchung, eine Polysomnographie etc. indiziert (Vogelmeier 2007) (Gillissen 2000)

## 1.2 COPD- eine systemische Erkrankung

### 1.2.1 Die systemische Entzündung im Rahmen der COPD

#### 1.2.1.1 Das Monozyten- Makrophagen- System

Die Ausreifung der Monozyten aus pluripotenten Knochenmarkstammzellen erfolgt über das Stadium der Monoblasten und Promonozyten noch im Knochenmark. Nach Ausschleusen aus diesem und ca. 20-40-stündiger Zirkulation in der Blutbahn erfolgt der Übertritt in verschiedene Gewebe. Dort differenzieren sich die Zellen weiter zu Makrophagen, die im Rahmen der zellulären Immunabwehr je nach Lokalisation organspezifische Aufgaben übernehmen:

Niere	intraglomeruläre, mesangiale Zellen
Gehirn	Mikroglia
Serosa	Serosamakrophagen
Lunge	Alveolarmakrophagen
Leber	Kupffer- Sternzellen
Milz	Sinusmakrophagen
Knochenmark	Knochenmarkmakrophagen
Lymphknoten	Lymphknotenmakrophagen (Hoffbrand 2003)

Monozyten stellen durch ihre hohe Beweglichkeit, Adhäsivität und Größenvariabilität eine sehr vielfältige Zellpopulation dar. Die Größe differiert zwischen 12- 40µm, womit sie die größten Zellen im peripheren Blut sind. Sie werden zusammen mit ihren Vorstufen- den Monoblasten und Promonozyten- und den Makrophagen zum mononukleären phagozytischen System (MPS) gezählt. (Furth 1972)

Zellart	Menge in $10^9/ml$
Leukozyten gesamt	4 – 11
neutrophile Granulozyten	2,5 – 7,5
eosinophile Granulozyten	0,04 – 0,4
basophile Granulozyten	0,01 – 0,1
Monozyten	0,2 – 0,8
Lymphozyten	1,5 – 3,5

Tabelle 4 Leukozyten im normalen Blutbild (Erwachsener)

Wichtige Funktionen der Monozyten und Makrophagen sind die zelluläre Immunabwehr eingedrungener Mikroorganismen, der Abbau geschädigter oder gealterter Körperzellen (z.B. Erythrozyten, Thrombozyten) und die tumorhemmende Wirkung. Dabei erfolgt eine chemotaktisch initiierte Zellmobilisation und -migration an den Ort der Schädigung, worauf die Phagozytose und anschließende Abtötung mit enzymatischen Umbau des erkannten Schadstoffes erfolgt.

Eine größere Bedeutung wird den mononukleären Zellen allerdings im Rahmen der Immunregulation zuteil. Sie sezernieren eine Vielzahl verschiedener biologisch aktiver, immunmodulatorischer Substanzen, z.B. Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ), Enzyme (Kollagenase, Elastase), Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren und Plasmaproteine ( $\alpha_2$ - Makroglobulin,  $\alpha_1$ - Antiprotease).

Monozyten sind selbst durch eine Reihe Substanzen aktivierbar bzw. supprimierbar. Eine Stimulation erfolgt beispielsweise durch IFN- $\gamma$ , IFN- $\alpha$ , LPS (Lipopolysaccharid), IL-1, IL-2 oder GM-CSF, während durch Prostaglandin E2 eine Suppression erzielt wird.

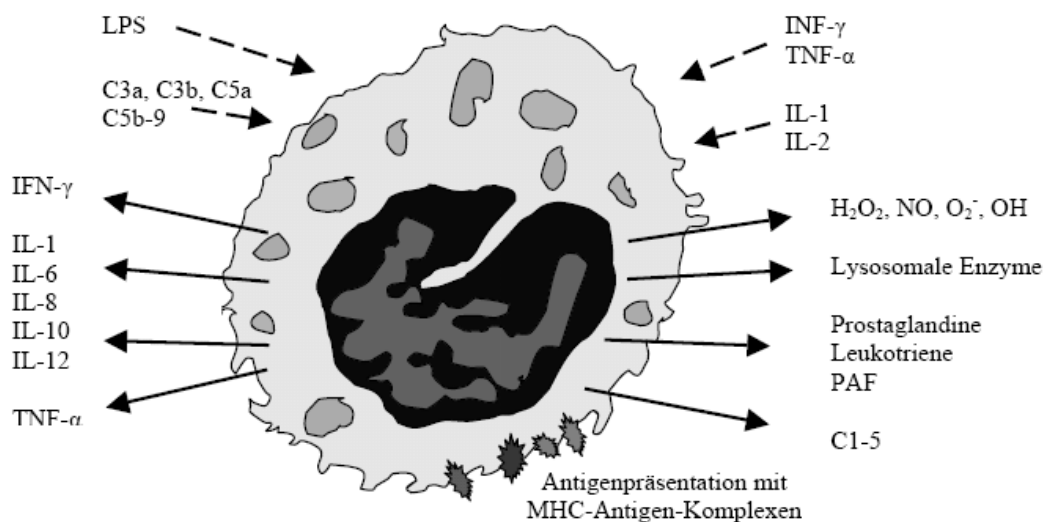


Abbildung 5 Sekretion, Antigenpräsentation und Stimulation der Monozyten nach (Dohle 2004)



Eine weitere Aufgabe besteht in der Präsentation körperfremder Stoffe. Mononukleäre Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche an MHC (major histocompatibility complex)-Klasse-2- Moleküle gebundene Fragmente der aufgenommenen Antigene, die dadurch wiederum von T-Lymphozyten erkannt werden.

Im Rahmen der COPD wird Monozyten und den daraus entstehenden Alveolarmakrophagen eine Schlüsselrolle im Entzündungsgeschehen und der zellulären und humoralen Immunantwort zugeschrieben. Hierzu einige Beispiele: In der BAL von COPD- Patienten oder bei lungengesunden Rauchern ist die Makrophagenanzahl verglichen mit gesunden Personen 5-10- fach höher. (Barnes 2000)

Traves et al. fanden im Sputum von COPD- Patienten signifikant erhöhte Spiegel von MCP-1, einem Chemokin, welches die Aktivierung von Monozyten bewirkt (COPD- Patienten: 0.8ng/ml, Nichtraucher: 0.2ng/ml, gesunde Raucher: 0.1ng/ml,  $p < 0.05$ ). (Traves 2002)

Aldonyte et al. untersuchten bei aus Blut isolierten Monozyten die basale und LPS-stimulierte Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren von COPD- Patienten und einer gesunden Kontrollgruppe. Bei diesen Patienten war die basale Konzentration an MMP-9 2,5-fach erhöht ( $p < 0,028$ ). Des Weiteren waren auch die IL-6- Serumspiegel 1,9-fach sowie MCP-1 2,6-fach nach LPS- Stimulation gegenüber den von Gesunden gewonnenen Zellen erhöht ( $p < 0,01$ ). (Aldonyte 2003)

Im Hinblick auf die systemische Entzündung bei der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Monozyten.

### 1.2.1.2 Zytokine

Der Begriff Zytokin beschreibt eine Gruppe löslicher Proteine und Peptide, die in sehr geringen Konzentrationen (nano- und pikomolarer Bereich) zellmodulatorisch wirken. Sie stimulieren oder inhibieren die Zellaktivität und dienen somit der zellulären Kommunikation. (Kuhlmann 2006) (Dietel 2002)

Sie lassen sich nach Chung am sinnvollsten funktionell nach folgendem Muster einteilen, wobei einzelne Zytokine durch ein überlappendes Wirkspektrum Vertreter mehrerer Gruppen sein können:

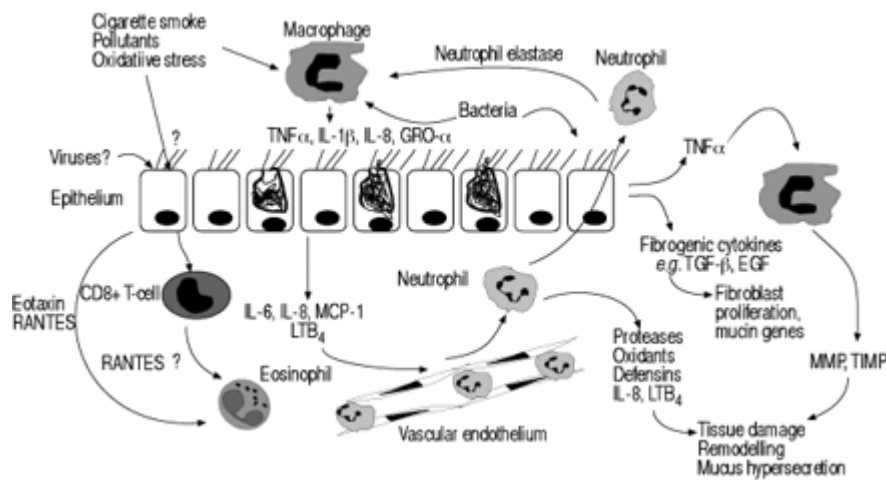
- Chemokine (chemotaktisch wirkende Zytokine für bestimmte Zellen)
- Wachstumsfaktoren
- Lymphokine (von aktivierten Lymphozyten freigesetzt)
- proinflammatorisch Zytokine
- antiinflammatorische Zytokine

Die wichtigsten Vertreter der jeweiligen Gruppen im Rahmen der COPD sind Tabelle 5 zu entnehmen. (Chung 2001)

Kategorie	Zytokine
Proinflammatorische Zytokine	IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6
Antiinflammatorische Zytokine	IL-10, IFN- $\gamma$
Lymphokine	IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13
Wachstumsfaktoren	TGF- $\beta$ , IGF (insulin- like growth factor)
Chemokine für Neutrophile	IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-17
Eosinophile	GM-CSF
Monozyten/ Makrophagen	MCP-1
T- Zellen	IL-16, MCP-1

**Tabelle 5 Die bei der COPD pathophysiologisch bedeutsamsten Zytokine (Chung 2001)**

Die für diese Arbeit relevanten Zytokine sind IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ , die der Gruppe der inflammatorischen Zytokine angehören. Diese Auswahl hat diverse Vorteile, da sie die für die bei der COPD bedeutungsvolle Entzündung seitens der Zytokine abdeckt (s. Abbildung 6).



**Abbildung 6 Zell- und Zytokininteraktion der Inflammation im Rahmen der COPD (Chung 2001)**

Diese Einschätzung lässt sich wie folgt begründen:

- IL-1 $\beta$  wird v.a. von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Fibroblasten, Epithelzellen, neutrophilen Granulozyten und glatten Muskelzellen produziert. Es induziert die Freisetzung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark, die Ausschüttung anderer Zytokine- beispielsweise IL- 2, 6, 8, IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$ - sowie die Bildung von Akute- Phase- Proteinen in der Leber. IL-1 $\beta$  stimuliert Fibroblasten zur Proliferation, steigert die Sekretion von Prostaglandin E2 und Kollagenasen sowie die Synthese von Fibronectin und Kollagen.
- IL-6 wird ebenfalls von Monozyten und Makrophagen, aber auch von Lymphozyten, Fibroblasten, Endothel- und Epithelzellen produziert. Es wirkt pyrogen und induziert in der Leber die Synthese von Akutphaseproteinen. Außerdem wirkt es proliferativ auf T- Lymphozyten und Reifung von B- Lymphozyten. Eine TNF- $\alpha$ - Freisetzung wird gehemmt. (Hasday 1994)
- TNF- $\alpha$  ist ein zentrales proinflammatorisches Zytokin in allen Entzündungsformen und wird von Makrophagen, Monozyten sowie Lymphozyten, Epithelzellen und Mastzellen gebildet. Die Sekretion wird von anderen Zytokinen, v.a. IL-1, GM-CSF und IFN-  $\gamma$ , reguliert. TNF- $\alpha$

induziert die Expression von ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1), einem Adhäsionsmolekül, das die Rekrutierung mononukleärer Zellen steigert. Des Weiteren aktiviert es den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der wiederum eine verstärkte Freisetzung von IL-8 bewirkt. Außerdem stimuliert TNF- $\alpha$  in Makrophagen die Freisetzung von IL-6, IL-8 und MMP. Gesteigerte Konzentrationen von TNF- $\alpha$  finden sich v.a. bei COPD- Patienten mit Gewichtsverlust. (Chung 2001)

### **1.2.1.3 Die COPD als proinflammatorisch wirksame Systemerkrankung**

Zunehmend wird die COPD als eine von der Lunge ausgehende systemische Erkrankung verstanden, die insbesondere in den schweren Erkrankungsstadien z.T. schwerwiegende extrapulmonale Affektionen nach sich zieht (s.1.2.3.) und mit einer abnormen systemischen Entzündungsreaktion verbunden ist. So dokumentierten Gan et al. in ihrer 14 Studien umfassenden Metaanalyse eine auffällige Häufung erhöhter systemischer Entzündungsparameter. Es fanden sich bei Patienten mit stabiler COPD im Vergleich zu lungengesunden Studienteilnehmern signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von CRP (C- reaktives Protein) (1,86mg/l höher bei COPD), Fibrinogen (0,37g/l höher bei COPD), Leukozyten ( $0,88 \times 10^9$  Zellen/l höher bei COPD), IL-6 (13,1pg/ml höher bei COPD) und TNF- $\alpha$  (2,64pg/ml höher bei COPD). (Gan 2004) Bei Exazerbationen steigen diese Entzündungsparameter weiter an. Perera et al. fanden bei COPD- Patienten eine signifikant erhöhte Serumkonzentration von IL-6 (12,1pg/ml) und CRP (10,9mg/l) während Exazerbationen verglichen mit deren Basiswerten im stabilen Zustand (5,6pg/ml und 6,5mg/l,  $p < 0,01$ ). (Perera 2007)

Pinto- Plata et al. belegten 2006 einen signifikant erhöhten Serum- CRP- Spiegel bei COPD- Patienten (5.03mg/l) verglichen mit gesunden Rauchern (2.02mg/l) und Nichtrauchern (2.24mg/l), aus dem sich auch eine prognostische Aussage im Sinne einer höheren Morbidität ableiten ließ. (Pinto-Plata 2006)

Doch wie kann man sich die von der Lunge ausgehende klinisch und laborchemisch nachweisbare systemische Entzündung pathophysiologisch vorstellen? Die Erklärung

hierfür scheint multifaktorieller Natur zu sein.

Möglicherweise ergibt sich der gemeinsame Nenner über die jahrzehntelange Zigarettenrauch- Exposition. Zigarettenrauch löst per se- sogar bei Passivrauchern- eine systemische Entzündung aus. (Hogg 2004) Van Eeden und Hogg fanden eine gesteigerte Anzahl polymorphkerniger Leukozyten im Blut von Rauchern verglichen mit Nichtrauchern ( $p < 0,003$ ). Außerdem fand sich bei diesen Zellen eine gesteigerte Expression des Adhäsionsmoleküls L- Selectin (3,2 versus 2,6 MFI (mean fluorescence intensity),  $p < 0,05$ ). Diese phänotypische Veränderung weist auf eine vermehrte Freisetzung polymorphkerniger Leukozyten aus dem Knochenmark bei Rauchern hin. (Van Eeden 2000)

Eine weitere Theorie beschreibt das "Überschwappen" (spilling over) der pulmonalen Entzündung in den systemischen Kreislauf. Demnach steigern die proinflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , GM-CSF, Oxidantien) ab einem gewissen Schwellenwert durch Übertritt die entsprechenden Werte in der systemischen Zirkulation und/oder Entzündungszellen werden während der Passage in der pulmonalen Zirkulation aktiviert, was sich im großen Kreislauf bemerkbar macht. (Agusti 2003) Allerdings fanden Vernoooy et al. im Sputum und im Plasma von COPD-Patienten keine Korrelation zwischen löslichem TNF- $\alpha$  bzw. IL-8. (Vernoooy 2002) Auch Hurst et al. konnten keine solche Beziehung darstellen, weshalb die von Agusti formulierte Hypothese des „spilling over“ wahrscheinlich nicht zutrifft. (Hurst 2005)

Eine andere Hypothese bezieht sich auf die myogene Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie z.B. TNF- $\alpha$ , die bei physischer Belastung im Blut quantifiziert werden können. Rabinovich et al. zeigten, dass schon bei leichter Betätigung (11 Minuten Ergometertraining bei 40% der maximalen Belastung) die Plasma- TNF- $\alpha$ - Spiegel von  $17 \pm 3,2$ pg/ml vor Belastung auf  $23 \pm 2,7$ pg/ml nach Belastung anstiegen ( $p < 0,01$ ). Die gesunde Kontrollkohorte wies dagegen keine Steigerung der TNF- $\alpha$ - Spiegel im Plasma auf. (Rabinovich 2003)

Auch die Schwere der Gewebhypoxie (gemessen am Sauerstoffpartialdruck = PaO<sub>2</sub> mmHg) korrelierte bei COPD- Patienten mit systemischen Entzündungsmarkern. Takabatake et al. fanden im Blut von COPD- Patienten verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe eine signifikante Korrelation zwischen dem verminderten PaO<sub>2</sub> (62,2

versus 88,6mmHg,  $p < 0,0001$ ) sowie erhöhten TNF- $\alpha$  Serumwerten (6,15 versus 5,41pg/ml,  $p < 0,05$ ), löslichem TNF- $\alpha$ -Rezeptor R55 (1,15 versus 0,67ng/ml,  $p < 0,0001$ ) und TNF- $\alpha$ -Rezeptor R75 (3,54 versus 2,25ng/ml,  $p < 0,0001$ ). Es wurde für die COPD- Gruppe- nicht aber für die Kontrollgruppe- eine inverse Korrelation zwischen PaO<sub>2</sub> und den Inflammationsmarkern im Serum gefunden. (Takabatake 2000)

### **1.2.2 Die systemische Entzündung als Prognosefaktor**

In zahlreichen Studien und mittlerweile auch Übersichten fanden sich Belege, dass bei COPD -aber interessanterweise auch in der „gesunden“ Allgemeinbevölkerung- erhöht gemessene systemische Entzündungsparameter, wie z.B. das CRP, mit einer Prognoseverschlechterung assoziiert waren. (Andreassen 2003)

So ist eine inverse Beziehung zwischen der Konzentration des Akute- Phase- Proteins Fibrinogen und des FEV<sub>1</sub>- Wertes in der Allgemeinbevölkerung belegt. Außerdem zeigten sich bei Fibrinogen- Werten im oberen und mittleren Drittel ein 1,7- und 1,4-fach erhöhtes Risiko für Hospitalisationen infolge COPD verglichen mit Werten im unteren Drittel. (Dahl 2002)

Gewichtsverlust als eine systemische Komplikation der COPD (pulmonale Kachexie) ist zum einen mit einer signifikanten Steigerung von TNF- $\alpha$  (s.1.2.3.2), zum anderen mit einer schlechteren Prognose verbunden. Landbo et al. untersuchten bei 1.218 COPD- Patienten über einen Zeitraum von 17 Jahren, ob sich in Bezug auf den body mass index BMI (<20 Untergewicht, 20-24,9 Normgewicht, 25-29,9 Übergewicht,  $\geq 30$  Fettleibigkeit) eine Beziehung zur Mortalität ergibt. Interessanter Weise zeigte sich bei untergewichtigen Patienten eine 1,64-fach (Männer) bzw. 1,42-fach (Frauen) erhöhte Mortalität verglichen mit der normalgewichtigen COPD- Gruppe. Eine signifikante Beziehung ( $p < 0,001$ ) lässt sich allerdings nur bei schwerer COPD (FEV<sub>1</sub> <50%) darstellen. (Landbo 1999) Andere Studien untersuchten die Beziehung zwischen Gewichtsveränderung und Prognose. So zeigte sich, dass die Mortalität während eines Beobachtungszeitraums von 14 Jahren bei 1.612 COPD- Patienten, die einen Gewichtsverlust von >3 BMI- Einheit (ca. 10kg) innerhalb von 5 Jahren aufwiesen, 1,71-fach erhöht war- verglichen mit gewichtsstabilen Patienten. (Prescott 2002) Die pulmonale Kachexie ist somit bei den schwerkranken COPD- Patienten ein guter Prädiktor für ein erhöhtes Mortalitätsrisiko.

Es gibt auch genetische Alternationen, die für eine systemische Entzündungsreaktion mit begleitender Prognoseverschlechterung prädisponieren. Ein Polymorphismus in der Promotorregion des TNF- $\alpha$ - Gens an Position 308, der bei etwa 10% der Bevölkerung auftritt, ist bei COPD- Patienten mit einer signifikant erhöhten Mortalität unabhängig der Raucheranamnese verbunden und prädisponiert für schwerere Atemwegsobstruktionen. (Keatings 2000)

In einer 2007 von Dahl et al. veröffentlichten Studie erwies sich CRP als starker und unabhängiger Prädiktor für eine Prognoseverschlechterung. Es wurden 1.302 Patienten über 8 Jahre bezüglich Krankenhauseinweisung und Sterblichkeit weiter verfolgt. Die COPD- Gruppe wurde arbiträr entsprechend des CRP- Grenzwertes von +/- 3mg/l geteilt. Während des Beobachtungszeitraumes wurden 185 (14%) Patienten auf Grund ihrer Erkrankung stationär betreut, 83 (6%) Patienten verstarben infolge der COPD. Dabei war für Patienten mit einem CRP- Wert > 3mg/l das Risiko für eine Krankenhauseinweisung 1,4-fach bzw. für ein Versterben 2,2-fach –und zwar unabhängig von Lungenfunktion und Rauchgewohnheiten- erhöht. Der Vergleich bezog sich dabei immer auf Patienten mit CRP- Werten  $\leq$  3,0mg/l. (Dahl 2007)

### 1.2.3 Extrapulmonale Manifestationen der COPD

#### 1.2.3.1 Dysfunktion und Atrophie der quergestreiften Muskulatur

Mit zunehmendem Schweregrad der COPD nimmt die Muskelmasse der Patienten, besonders an den unteren Extremitäten, und damit verbunden die Belastungsfähigkeit ab. (Bernard 1998) Ein zusätzlich bestehendes oder sich ausbildendes Müdigkeitsgefühl und die Dyspnoesyndromatik führen zu einer weiteren Immobilität des Patienten, die im Rahmen des sich ausbildenden Circulus vitiosus im schlimmsten Fall zur vollständigen Immobilität führen kann. (s. Abbildung 7)

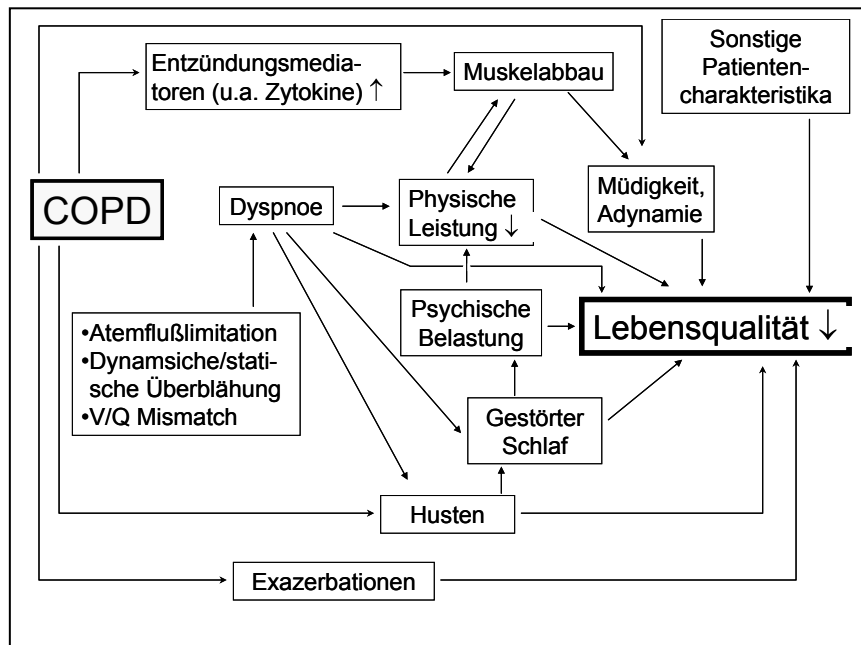


Abbildung 7 Einfluss verschiedener Faktoren auf die Lebensqualität und die Psyche bei COPD

Das Ausmaß der Atrophie der quergestreiften Muskulatur korreliert mit dem Anstieg der COPD-Mortalität. Marquis et al. untersuchten computertomographisch Oberschenkeldurchmesser von COPD-Patienten und fanden dabei eine 4-fach erhöhte Mortalitätsrate bei einem Durchmesser  $<70\text{cm}^2$  verglichen mit Patienten mit einem Oberschenkeldurchmesser  $\geq 70\text{cm}^2$  ( $p=0004$ ) und zwar unabhängig von Alter, Rauchgewohnheiten oder Lungenfunktion. Damit stellt die Muskelatrophie einen wichtigen singulären Prognosefaktor dar. (Marquis 2002)



Eine gesteigerte Proteolyse, Störungen in der Regulation der Skelettmuskelregeneration und eine Aktivierung der Apoptose können Ursachen der Skelettmuskelatrophie sein, zumal sich in peripheren Muskeln von COPD- Patienten eine signifikante Reduktion von langsam- kontrahierenden Typ I- Muskelfasern mit relativer Steigerung von schnell- kontrahierenden Typ II- Fasern fand. (Mador 2001)

So wird die Myozyten- Differenzierung durch NF- $\kappa$ B gehemmt, dessen Aktivierung durch TNF- $\alpha$  induziert wird. (Guttridge 2000) Langen et al. untersuchten die Wirkung von TNF- $\alpha$  auf die Myozyten- Zelllinie C2C12 und fanden eine signifikante Aktivitätssenkung der muskulären Kreatinkinase und eine Verminderung der Menge an schweren Myosinketten nach 72-stündiger Behandlung mit TNF- $\alpha$ . (Langen 2002) Auch einige der bei COPD- Patienten erhöhten Entzündungsmediatoren scheinen mit dem Verlust an Muskelmasse (gemessen an Kreatinin im 24-Stunden-Urin) zu korrelieren. IL-6 ( $p=0,001$ ), TNF-  $\alpha$  ( $p=0,032$ ) und ihre löslichen Rezeptoren ( $p=0,03$ ,  $0,002$  und  $0,001$ ) sind bei Patienten mit verminderter Muskelmasse verglichen mit Patienten mit normaler Muskelmasse signifikant erhöht. (Eid 2001)

Des Weiteren zeigte sich bei COPD- Patienten mikroskopisch eine beschleunigte Apoptose sowie eine Steigerung des oxidativen Stresses und der Entzündung in der quergestreiften Muskulatur. Musculus quadriceps femoris- Biopsien von COPD- Patienten mit einem BMI $<20$  wiesen eine signifikant höhere Apoptoserate ( $p<0,005$ ) auf als die Biopsien, die von COPD- Patienten mit normalen BMI, bei gesunden und orthopädischen Patienten ohne Lungenerkrankung oder Steroidtherapie gewonnen wurden. Die Muskelatrophie trägt damit wesentlich zum Gewichtsverlust im Rahmen der COPD bei. Zusammen mit der höhere Apoptoserate und dem Muskelschwund fand sich in den Muskelbiopsien von COPD- Patienten mit niedrigem BMI ( $<21$ ) eine 30%-ige Steigerung der Bindungsaktivität von NF- $\kappa$ B, sowie eine signifikant erhöhte Expression der induzierbaren NO- Synthase ( $p<0,05$ ). (Agusti 2002) (Agusti 2004) Da sich bei normgewichtigen Patienten diese Veränderungen nicht nachweisen ließen, wird die Inflammation als Bindeglied zwischen COPD, einer Muskelatrophie und dem Gewichtsverlust im Rahmen der COPD angenommen, welche für das Outcome Mortalität von großer Bedeutung sind. (Sin 2006)

### 1.2.3.2 Gewichtsverlust und Kachexie

Etwa 50% der Patienten mit schwerer COPD, aber auch 10-15% der Patienten mit leichter oder moderater Erkrankung, verlieren an Gewicht (Schols 1993) Hauptsächlich geht dieser Gewichtsverlust zu Lasten der (abnehmenden) Muskelmasse. Sowohl der Gewichtsverlust als auch die pulmonale Kachexie sind mit einer Prognoseverschlechterung und einer gesteigerten Exazerbationsrate assoziiert. (Wilson 1989) (Schols 1998)

Der von Celli et al. definiert BODE- Index (BMI; airflow obstruction, dyspnea, exercise capacity), der eine gute Prognoseabschätzung erlaubt, berücksichtigt dieses Phänomen, da mit ihm folgende Parameter erfasst werden: BMI, Atemwegsobstruktion (definiert durch den FEV<sub>1</sub>- Wert), Dyspnoe (gemessen an der modifizierten Medical Research Council (MMRC) Dyspnoe- Skala) und Belastbarkeit (im 6- Minuten- Gehstest quantifizierbar) (Celli 2000). Die multidimensionale 10- Punkte- Skala, die sich aus jeweils 0-3 Punkten für Atemwegsobstruktion, Dyspnoe und Belastbarkeit sowie 0-1 Punkt für den BMI- Wert ergibt, korreliert dabei positiv mit dem Mortalitätsrisiko (s.Tabelle 6).

Variable	Punkte im BODE- Index			
	0	1	2	3
FEV <sub>1</sub> (%)	≥65	50- 64	36- 49	≤ 35
6-Min-Gehstest (m)	≥350	250- 349	150- 249	≤149
MMRC Dyspnoe- Skala	0- 1	2	3	4
BMI	>21	≤21		

**Tabelle 6 Berechnung des BODE- Index (Celli 2000)**

Der pathophysiologische Hintergrund des Gewichtsverlustes resultiert im Wesentlichen aus einer negativen Energiebilanz. Insbesondere bei COPD- Patienten mit einem höheren Schweregrad entsteht eine hypermetabolische Situation, die sich aus der vermehrten Atemarbeit infolge einer höhergradigen Atemwegsobstruktion- mit oder ohne einem Emphysem- und einer Hypoxämie -mit oder ohne einer zusätzlichen

Hyperkapnie- ergibt. Inwieweit die oben diskutierte systemische Entzündung diesen Prozess evt. verstärkt, ist Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Diesbezüglich untersuchten de Godoy et al. aus dem Blut isolierte, mit LPS- stimulierte Monozyten von COPD- Patienten mit (>5% des Körpergewichts) und ohne (<5% des Körpergewichtes) Gewichtsverlust im vorangegangenen Jahr und verglichen die zelluläre IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ - Produktion mit einer gesunden Kontrollkohorte. Die IL-1 $\beta$ - Produktion unterschied sich in keiner der drei untersuchten Gruppen signifikant. Die TNF- $\alpha$ - Werte lagen jedoch in diesem in vitro Ansatz bei COPD- Patienten mit Gewichtsverlust signifikant höher (20,2ng/ml) als bei Patienten ohne Gewichtsverlust (6,9ng/ml) oder der Kontrollgruppe (5,7ng/ml). (De Godoy 1996)

Dieser Zusammenhang ist aber offenbar noch unsicher, denn in einer ähnlichen Untersuchung mit einem etwas anderen Testansatz zeigten sich im Vergleich von kachektischen und nicht- kachektischen COPD- Patienten (gemessen am fat- free mass index (FFMI) in kg/m<sup>2</sup>), sowie bei einer gesunden Kontrollgruppe keine signifikant differenten Serumspiegel von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  zwischen diesen Gruppen. (Broekhuizen 2005) Allerdings sind diese Ergebnisse nicht direkt vergleichbar, da es sich bei de Godoy um einen zellulären in vitro Ansatz handelt, während Broekhuizen Messungen im Blut durchführte.

### 1.2.3.3 Kardiovaskuläre Folgen

Retrospektive EKG- Analysen bei COPD- Patienten mit schwerer Atemwegsobstruktion belegten im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe eine 2,1-fach erhöhte Myokardinfarkt- Inzidenz. Dazu bestätigend wurde eine umgekehrt proportionale Korrelation zwischen der Inzidenz einer koronaren Herzkrankheit (KHK) mit zunehmender Atemwegsobstruktion ( $FEV_1$ ) beschrieben. (Sin 2003a) Auch Hole et al. fanden bezogen auf  $FEV_1$ - Werte bei 15.411 Personen eine inverse Beziehung zur KHK- und Schlaganfall- Inzidenz. (Hole 1996) Eine großangelegte retrospektive Kohortenanalyse konnte eine signifikant erhöhte Rate an Krankenhauseinweisungen bei COPD- Patienten belegen, die aus kardiovaskulärer Indikation behandelt werden mussten. Das Risiko, wegen der folgenden kardialen Diagnosen stationär behandelt werden zu müssen, war bei den Patienten, die gleichzeitig noch an einer COPD litten, gegenüber den nicht- COPD- Patienten wie folgt erhöht: Arrhythmien 1,67-fach, Angina pectoris 2,08-fach, chronische Herzinsuffizienz 3,45-fach. Außerdem errechnete sich bei den COPD- Patienten ein signifikant erhöhtes Risikoprofil an Arrhythmien, akutem Myokardinfarkt oder chronischer Herzinsuffizienz zu versterben. (Curkendall 2006)

Zweifelsohne ist Zigarettenrauchen ein Risikofaktor für die Entstehung sowohl der COPD als auch kardiovaskulärer Erkrankungen. Aber offenbar bildet davon unabhängig die COPD einen Risikofaktor solche Krankheiten zu entwickeln. Die bei der COPD beschriebene (und oben diskutierte) systemische Entzündung könnte das Bindeglied in der Pathogenese zu den kardiovaskulären Erkrankungen darstellen. (Hansson 2005) (Ross 1999)

Die Hypothese einer über die systemische Entzündung getriggerten kardiovaskulären Erkrankung wird z.B. durch eine epidemiologische Studie untermauert, in der KHK- Patienten eine 2,13-fach erhöhte Wahrscheinlichkeit für das Auftreten ihrer Erkrankung aufwiesen, wenn die CPR- Serumwerte im oberen Drittel ( $>2,4\text{mg/l}$ ) lagen. Diejenigen Herzpatienten mit CRP- Werten im unteren Drittel ( $<0,9\text{mg/l}$ ) wiesen dagegen dieses Risiko nicht auf. (Danesh 2000)

Der Zusammenhang zwischen einer systemischen Entzündungsreaktion, der Entstehung einer Atemwegsobstruktion und der KHK –Entstehung lässt sich am besten in großen

Datenbankanalysen bestätigen oder widerlegen. In einer großen kanadischen Untersuchung wiesen tatsächlich Patienten mit einer schweren Atemwegsobstruktion ( $FEV_1 < 50\%$ ) im Vergleich zu Lungengesunden 2,18-fach häufiger einen erhöhten CRP- Serumwert ( $\geq 0,22\text{mg/dl}$ ) vor. Die Leukozyten-, Thrombozytenzahlen und die Fibrinogenserumspiegel von Patienten mit schwerer Obstruktion waren gegenüber denen Lungengesunder um  $460/\mu\text{l}$ ,  $39510/\mu\text{l}$  und  $41,63\text{mg/dl}$  erhöht. Bei gleichzeitigem Auftreten einer COPD mit einer CRP- Erhöhung fand sich ein aus dem Elektrokardiogramm ableitbarer erhöhter Cardiac Infarction Injury Score (CIIS). Bei einem erhöhten CRP- Serumwert ( $>1,00\text{mg/dl}$ ) und moderater ( $FEV_1 50\text{-}80\%$ ) bzw. schwerer Atemwegsobstruktion lag der CIIS 2,68- bzw. 5,88-fach höher als der CRP- Werte von Lungengesunden. Damit liegt das Herzinfarkttrisiko bei COPD- Patienten mit einem erhöhten systemischen Entzündungsprofil deutlich über dem von Patienten ohne COPD und ohne systemisch nachweisbaren Entzündungswerten. (Sin 2003a)

Zusammenfassend ist die systemische Inflammation pathophysiologisch die wahrscheinlichste Ursache für das gehäufte Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen im Rahmen der COPD

### 1.2.3.4 Weitere systemische Effekte

Osteoporose ist eine weit verbreitete Erkrankung, die gerade auch bei COPD vermehrt auftritt. Immobilität und die Therapie mit hoch dosierten inhalativen bzw. systemischen Kortikosteroiden sind die Hauptgründe, allerdings wurde in Studien auch bei COPD-Patienten ohne Steroidtherapie eine verminderte Knochendichte nachgewiesen. (Berry 2004)

COPD- Patienten mit niedrigerer Knochendichte waren durchschnittlich dünner ( $BMI \leq 22$ , odds ratio 4,18) und wiesen eine Tendenz zu niedrigeren  $FEV_1/VC$ - Quotienten auf als COPD- Patienten ohne nachweisbarer Osteoporose. (Incalzi 2000)

Da  $TNF-\alpha$  und andere inflammatorische Zytokine den Knochenabbau begünstigen, kann die bei der COPD beschriebene systemische Entzündung (s.o.) als Verursacher der bei der COPD gehäuft beobachteten Osteoporose angesehen werden, wenn man von den beiden anderen o.g. Ursachen (Immobilität, Steroideffekt) einmal absieht. (Gross 2001)

Auch psychische Erkrankungen- wie Depression und Angstzustände- sind bei COPD-Patienten nicht selten. Zwar konnte eine statistische Signifikanz in der systematischen Übersicht zu diesem Themenkomplex von van Ede et al. 1999 nicht nachgewiesen werden, aber wurde dies der oft niedrigen methodischen Qualität der ausgewerteten Studien angeschuldet, die häufig ohne gesunde Kontrollgruppe und mit jeweils niedriger Teilnehmerzahl durchgeführt wurden. (Van Ede 1999) Nachfolgende Studien, beispielsweise von Wagena et al., wiesen dagegen signifikant erhöhte Raten von Angstzuständen und Depressionen bei Patienten mit COPD nach. (Wagena 2005)

### **1.2.3.5 Neues Verständnis einer alten Erkrankung**

Aufgrund der Häufigkeit von systemischen Manifestationen sowie der gesteigerten systemischen Entzündung im Rahmen der COPD wurde von Fabbri und Rabe 2007 die Einführung des Begriffs „chronic systemic inflammatory syndrom“ vorgeschlagen. Das Syndrom kann bei Vorliegen von drei der sechs folgenden Komponenten diagnostiziert werden:

- Alter > 40 Jahre
- Raucheranamnese > 10 Packungsjahre
- Symptome und abnormale Lungenfunktion entsprechend COPD- Definition
- chronische Herzinsuffizienz
- metabolisches Syndrom
- erhöhtes CRP. (Fabbri 2007)

### ***1.3 Die therapeutische Beeinflussbarkeit der Entzündung im Rahmen der COPD***

#### **1.3.1 Allgemeine Therapieprinzipien der COPD**

Die Therapieoptionen der COPD kann man in einen medikamentösen und einen nicht-medikamentösen Ansatz unterteilen. Die Basis der medikamentösen Therapie bilden Bronchodilatoren (Anticholinergika,  $\beta_2$ - Sympathomimetika, Theophyllin). Inhalative Glukokortikoide kommen als Dauertherapie bei einer  $FEV_1 < 50\%$  (Grad III) und mindestens einer Exazerbation im letzten Jahr, die den Einsatz von systemischen Kortikosteroiden u./o. Antibiotika notwendig machte, zum Einsatz. Eine Langzeittherapie mit systemischen Kortikosteroiden ist, wie Studien von Niewoehner et al (Niewoehner 1999) gezeigt haben, nicht wirksamer als Placebo. Ganz im Gegenteil ist ein solcher Therapieansatz mit einer erhöhten COPD- Mortalität assoziiert. Die Langzeittherapie mit inhalativen Kortikosteroiden führt zu einer Reduktion der COPD- Exazerbationenrate und ist daher auch nur bei solchen Patienten indiziert. (GOLD 2006) Inhalative Kortikosteroide sind der ideale Partner für eine bronchodilatative Therapie (insbesondere mit langwirksamen  $\beta_2$ - Mimetika), da ein solcher Behandlungsansatz gegenüber dem jeweiligen Monotherapeutikum folgende signifikante Effekte aufweist: Reduktion des jährlichen  $FEV_1$ -Abfalls, Verbesserung der Lebensqualität, Reduktion der Exazerbationsfrequenz und -stärke. (Calverley 2007)

Die größte Studie zur Wirksamkeit eines Fluticason/ Salmeterol- haltigen inhalativen Kombinationspräparates im Vergleich zu den jeweiligen Einzelkomponenten und Placebo war die TORCH-(Towards a Revolution in COPD Health) Studie. Es wurden 6221 krankheitsstabile COPD- Patienten über einen Zeitraum von 3 Jahren therapiert. Zwar konnte mit dem Kombinationspräparat der Primärparameter Mortalität nur im Trend ( $p < 0,052$ ) dagegen aber diverse Sekundärparameter signifikant ( $p < 0,01$ ) gesenkt werden, wie z.B. die Exazerbationenrate um 25% und die Klinikeinweisungen um 17%. Gleichzeitig nahm die  $FEV_1$  im Mittel um 0,029l zu, während sie sich in der Placebogruppe um 0,062l reduzierte. Trotz dieser klinischen Erfolge lässt sich durch inhalative Kortikosteroide, sowohl als Einzelpräparat als auch in Kombination mit einem langwirksamen  $\beta_2$ - Mimetikum, die Prognose nicht verändern. (Peter 2007)



Grundsätzlich müssen alle Therapieansätze durch präventive Maßnahmen flankiert werden:

- insbesondere Raucherentwöhnung
- Influenza und/oder Pneumokokken- Schutzimpfungen.

Sie werden ergänzt durch (fakultative Auswahl):

- Patientenschulungen, einschließlich der Schulung der Inhalationstherapie und Verhalten in Notfällen
- körperliches Training
- Lungensport.

Zu dem nicht- medikamentöse Ansatz zählt die apparative/ operative Behandlung (Langzeitsauerstofftherapie, nicht- invasive (NIV) und invasive Beatmung, Lungenvolumenreduktionschirurgie, Transplantationschirurgie). (Vogelmeier 2007) (American Thoracic Society 2004)

Das Therapiekonzept der stabilen COPD zeigt Tabelle 7.

<b>Schweregrad</b>	<b>Medikamentöse Therapie</b>	<b>Nicht- medikamentöse Therapie</b>
Leicht	+ bei Bedarf kurzwirksame Bronchodilatoren ( $\beta_2$ -Mimetika, Ipratropiumbromid, Theophyllin)	Vermeidung von Risikofaktoren (Tabakrauchentwöhnung), Peumokokken-, Influenza-Schutzimpfung
Mittel	+ Dauertherapie mit einem oder mehreren langwirksamen Bronchodilatoren ( $\beta_2$ -Mimetika, Tiotropiumbromid, Theophyllin)	+ Rehabilitation
Schwer	+ inhalative Glukokortikoide bei wiederkehrenden Exazerbationen	
Sehr schwer	ergänzend nur supportive Maßnahmen (rechte Säule)	+Langzeitsauerstofftherapie bei respiratorischer Insuffizienz, eventuell chirurgische Behandlung

**Tabelle 7** Stufenplan für die Langzeittherapie der COPD nach (Vogelmeier 2007)

Von dem stabilen Krankheitsstatus wird die Exazerbation unterschieden. Laut Definition der Fachgesellschaften ATS, ERS, Deutsche Atemwegsliga/Deutsche Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin sowie GOLD stellt die Exazerbation ein Ereignis im Krankheitsverlauf der COPD dar, welches durch eine Veränderung der Dyspnoe, des Hustens und/ oder der Sputumproduktion, nicht erklärbar durch normale tägliche Schwankungen, gekennzeichnet ist und akut beginnt. (American Thoracic Society 2004) Die Änderungen der Therapie im Falle einer Exazerbation sowie die Symptome der unterschiedlichen Schweregrade werden in Tabelle 8 aufgezeigt.

<b>Schweregrad</b>	<b>Symptome</b>	<b>Therapie</b>
Alle Schweregrade		Nikotinverzicht, Antibiotikagabe bei purulentem Sputum, Therapie der Komorbiditäten
Leichtgradig	Leichte subjektive Verschlechterung ± Verschlechterung der Lungenfunktion	Anticholinergika u./o. $\beta_2$ -Mimetika
Mittelgradig	Atemnot ↑, Husten ↑, Verschlechterung der Lungenfunktion	Evtl. + systemische Glukokortikoide + Theophyllin
Schwergradig	Bewusstseinstäubung, Tachykardie/ -pnoe, Zyanose (neu/ progredient), Ödeme	+ Sauerstoff, ± NIV, ± Therapie der Komplikationen

**Tabelle 8** Symptomatik und Schweregrade der akuten Exazerbation sowie schweregradorientierte Therapie (Vogelmeier 2007)

Im Folgenden werden die verfügbaren und möglichen antiinflammatorischen Therapieoptionen näher beleuchtet, die für die hier vorgelegte Arbeit von Bedeutung sind. Darunter werden gezählt:

- Kortikosteroide, die topisch (inhalativ) oder in der Exazerbation auch systemisch gegeben werden.

- Ambroxol, ein sekretomotorisch wirkendes Medikament, dem anti-inflammatorische Effekte zugesprochen werden. (Poole 2001) (Gillissen 1997)
- N-Acetylcystein (NAC), ein antioxidativ wirksames Sekretolytikum. (Dekhuijzen 2004) (Pela 1999) (Gillissen 1996)
- Ätherische Öle, Gegenstand der hier vorgelegten Arbeit, s.1.4. Cineol und Myrtol scheinen im in- vitro Ansatz antioxidative bzw. antiinflammatorische Eigenschaften zu besitzen. (Graßmann 2000) (Jürgens 1998b) (Jürgens 1998c) (Jürgens 2003) (Jürgens 2004)

### 1.3.2 Kortikosteroide

Kortikosteroide werden systemisch (oral, intravenös) oder topisch appliziert. Die inhalativ- topische Gabe ist ab dem Schweregrad III indiziert, sofern die Patienten an einer erhöhten COPD- Exazerbationensrate leiden (siehe 1.3.1). (Burge 2000) Da inhalative Kortikosteroide kaum den jährlichen FEV<sub>1</sub>-Abfall reduzieren (Vestbo 1999) (Pauwels 1999) (Burge 2000) (The-Lung-Health-Study-Research-Group 2000) ist das primäre Therapieziel die Exazerbationssenkung bei Patienten mit einem schweren Erkrankungsstadium.

Systemische Kortikosteroide haben nur einen Stellenwert in der Notfallmedizin und werden in Dosen von 20- 40mg Prädnisolonäquivalent über maximal 14 Tage empfohlen, da bei längerer Anwendung die unerwünschten Wirkungen (z.B. Mb. Cushing, Osteoporose, erhöhte Infektanfälligkeit/Mortalität, Muskeldystrophie, Diabetes mellitus, Katarakt) überwiegen bzw. sich der Therapieerfolg nicht von einem Placebopräparat unterscheidet. (Thompson 1996) (Davies 1999) (Niewoehner 1999) (MacIntyre 2006)

Im Rahmen der Therapie mit inhalativen Steroiden ist ebenfalls eine Verminderung der Knochendichte zu nennen, ohne jedoch die Frakturhäufigkeit zu erhöhen. (Sin 2003b) Bei falscher Atemtechnik und wenn der Mund-Rachenraum nach Anwendung nicht gespült wurde, finden sich gehäuft Infektionen im Mund- und Rachenraum sowie Heiserkeit. Bei hohen inhalativen Steroiddosen (>1000mg/Tag Beclomethason-Äquivalent) werden spontane Hämatome der Haut und Katarakte diagnostiziert. (American Thoracic Society 2004) Zudem scheint die Pneumonieinzidenz unter diesen Bedingungen gegenüber Patienten, die nicht mit hohen topischen Kortikosteroiden

behandelt wurden, erhöht zu sein, wie mittlerweile mehrere große Medikamentenstudien belegten. (Ernst 2007) (Calverley 2007)

Der schlechte Therapieeffekt von Kortikosteroiden bei COPD- Patienten beruht zum einen auf vorliegende, durch meist jahrzehntelangen Zigarettenabusus verursachte, irreversible Umbauvorgänge (Remodelling) in den Atemwegen, zum anderen auf den bei dieser Erkrankung prädisponierenden neutrophilen Entzündungstyp, der - eben im Gegensatz zur eosinophilen Entzündung beim Asthma bronchiale- kaum auf Kortikosteroide reagiert. Es gibt sogar Hinweise auf eine Verlängerung der Überlebenszeit von neutrophilen Granulozyten durch die Anwendung von Kortikosteroiden. (Meagher 1996)

Bei Steroid- Respondern ist immer eine asthmatische Komponente mit verstärkter bronchialer Hyperreagibilität, ein eher durch Eosinophile und/oder Lymphozyten dominierter Entzündungstyp in den Atemwegen bzw. eine Reversibilität der Obstruktion zu diskutieren. Außerdem wird die schlechte Wirksamkeit mit der Verminderung der HDAC in Makrophagen von Rauchern in Zusammenhang gebracht, da sie durch reaktive Sauerstoffmetabolite deaktiviert wird. Dadurch wird die Inaktivierung von proinflammatorischen Genen reduziert, wodurch die bronchiale Entzündung perpetuiert. Die Folge ist eine vermehrte Sekretion von Zytokinen mit wiederum vermindertem Ansprechen von Kortikosteroiden. (Ito 2001)

### 1.3.3 N- Acetylcystein

N- Acetylcystein (NAC), ein Derivat der Aminosäure L- Cystein, ist ein seit den 60er Jahren eingesetztes Mukolytikum und wirkt über die Spaltung der Disulfidbrücken von Glykoproteinen des Bronchialschleimes und als Cysteindonator. Es wird postuliert, dass die daraus resultierende Senkung der Viskosität den oralen Abtransport des bronchialen Mukus erleichtert, wodurch die mukoziliäre Clearance gesteigert wird. Des Weiteren besitzt NAC antioxidative Eigenschaften, denn es wirkt einerseits direkt Oxidantien-abbauend, indem seine freie Thiol- Gruppe oxidiert werden kann. Diese Elektronen-Akzeptorfunktion führt in der Folge zu einer Reduktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten wie z.B.  $H_2O_2$ ,  $OH\cdot$  oder  $HOCL$ . Andererseits kann durch Deacetylierung des NAC- Moleküls frei werdendes Cystein zur Glutathionproduktion genutzt werden, welches über dem Glutathionredoxzyklus zu einer Erhöhung des antioxidativen Schutzes in der Zelle führt.

Die antioxidative Wirkung von NAC ist in einer Reihe tierexperimenteller, in vitro- und in vivo- Studien bewiesen worden. In Mäuselungen wurde der Zigarettenrauch-induzierte Abfall der pulmonalen Glutathionspiegel durch NAC- Gabe aufgehalten. (Moldeus 1986) Im Rattenmodell beugt die präventive Gabe von NAC vor Zigarettenrauch- induzierten zellulären Schäden (Reduktion morphologisch nachweisbarer inflammatorischer Zellveränderungen) der kleinen Atemwege vor. (Rubio 2000) An der Zelllinie BEAS2B reduzierte NAC gegenüber den Negativkontrollen die  $H_2O_2$ -induzierte Zytotoxizität um 31% ( $p < 0,00001$ ) und war damit effektiver als Katalase (Reduktion 29%). (Cotgreave 1987b) (Schreck 1992)

Offenbar sind diese in vitro an Zellkulturen erhobenen Daten nicht oder nur unter bestimmten Bedingungen auf die in vivo- Situation übertragbar. So konnten Bridgeman et al keine Auswirkung einer oralen fünftägigen NAC- Gabe (600mg/Tag) auf den pulmonalen und Plasma- Glutathionspiegel von gesunde Probanden und Patienten mit einer leichtgradigen COPD nachweisen. (Bridgeman 1991) (Bridgeman 1994) Auch Lukas et al fanden, dass die orale Gabe von 3x300mg NAC mit und ohne Vitamin C keinen auf das Antioxidationsystem messbaren Effekt hatte. So blieben im Blut die Glutathionspiegel und die zelluläre Aktivität, definiert über die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffmetaboliten, von der therapeutischen Intervention unbeeinflusst. (Lukas 2005) Andere Quellen bestätigen diese fehlende Wirkung auf den pulmonalen

und Serum- Glutathionspiegel. (Kleinvelde 1992) Möglicherweise verhindert ein negativer Feedbackmechanismus die therapeutische Erhöhung der Glutathionkonzentrationen, sofern diese nicht aus anderen Gründen erniedrigt sind. (Cotgreave 1987a) Bei einem Glutathiondefizit hingegen, wie z.B. bei der idiopathischen Lungenfibrose, dem ARDS oder der Paracetamol- und Paraquatintoxikation beschrieben, ist eine Erhöhung zellulärer Glutathionkonzentrationen durch NAC- Gabe nachgewiesen. (Meyer 1995) (Meyer 1993) Der direkten antioxidativen Funktion von NAC nach oraler oder i.v.- Gabe wird in vivo bis auf eine einzige Ausnahme, nämlich der Paracetamol- Intoxikation, keine Bedeutung mehr zugeschrieben (Prescott 1989).

Inwiefern sekretolytische, mukomotorische und antioxidativen Eigenschaften von NAC klinisch bedeutsame positive Effekte für COPD- Patienten (z.B. in Form einer Senkung der Exazerbationrate, Reduktion des FEV<sub>1</sub>-Abfalls) haben, wurde bis zur Publikation der BRONCHUS- Studie (Bronchitis Randomized an NAC Cost- Utility Study) in drei großen Metaanalysen untersucht. Die Ergebnisse zeigten bei prophylaktischer Gabe von 400-1200mg NAC eine Reduktion der Rate akuter Exazerbationen während der Wintermonate um 22-29%.(Grandjean 2000) (Stey 2000) (Poole 2001) Die 2005 veröffentlichte multizentrische, prospektive, placebokontrollierte BRONCHUS- Studie zeigte dagegen keine Vorteile für die Verumgruppe. In die Studie wurden 523 COPD- Patienten eingeschlossen, die täglich 600mg NAC oder Placebo über die Dauer von 3 Jahren erhielten. Die primären Endpunkte (jährliche Reduktion der FEV<sub>1</sub>, Anzahl der Exazerbationen pro Jahr) zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen Verum und Placebogruppe. (Decramer 2005)

Darauf basierend empfiehlt die Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin die Indikation zum Einsatz von Mukopharmaka kritisch zu stellen, da der Effektivitätsnachweis in großen randomisiert durchgeführten kontrollierten Studien fehlt. Die Kompromissformel lautet, dass der zeitlich limitierte Einsatz von Mukopharmaka bei einigen Patienten mit viskösem Sekret hilfreich sein kann (Evidenzgrad D = Expertenmeinung). (Vogelmeier 2007)

### 1.3.4 Ambroxol

Auch Ambroxol ist ein seit den 60er Jahren eingesetztes Mukopharmakon, das über eine mukomotorische Wirkung mit Produktion eines sehr flüssigen Bronchialschleims zu einer Senkung der Sputumviskosität führt und dadurch ebenfalls die mukoziliäre Clearance steigern soll. (Cegla 1988). Ambroxol induziert Pneumozyten Typ II zur vermehrten Sekretion von Surfactant und wurde daher zur Stimulations- Therapie beim ungeborenen Föten und Neugeborenen verwendet. (Gillisen 2003) Heute hat Ambroxol in dieser Indikation aber keinen Stellenwert mehr, da präpartal Kortikosteroide und postpartal beim IRDS (infant respiratory distress syndrome) und der unzureichenden Lungenreife Surfactant eingesetzt wird. Auch Ambroxol wird- wie NAC- neben seiner mukoregulativen Wirkung ein antioxidativer Effekt zugeschrieben. Nowak et. al fanden 1994, dass Ambroxol in mikromolaren Konzentrationen als suffizienter Radikalfänger von HOCl und OH $\cdot$  wirkt und auch H $_2$ O $_2$  abzubauen vermag. (Nowak 1994) Der vermutete Wirkmechanismus beruht auf Oxidierung der Hydroxylgruppe am Ambroxolmolekül mit resultierender Reduzierung reaktiver Sauerstoffmetabolite.

In in vitro- Versuchen wurde außerdem ein antiinflammatorischer Effekt nachgewiesen. In isolierten Alveolarmakrophagen von Kaninchen hemmte Ambroxol die Aktivität der Phospholipase A. (Grabner 1987) Außerdem reduzierte es in LPS- stimulierten humanen Monozyten die IL-1- und TNF- $\alpha$ - Freisetzung. (Bianchi 1990)

Rückschließend aus der im Zellexperiment verwendeten Ambroxolmenge und der beim Menschen erzielbaren Ambroxolkonzentration im Lungengewebe wurde postuliert, dass eine antioxidative und antiinflammatorische pulmonale Wirkung erwartet werden könne.(Mezzetti 1990)

Wiederum lassen sich die in vitro gewonnenen Studienergebnisse nur bedingt oder gar nicht auf die in vivo- Situation beim Menschen übertragen. Bei COPD- Patienten gibt es bezüglich der klinischen Effekte von Ambroxol unterschiedliche Angaben. Olivieri et al. beschrieben 1987 in einer doppelblinden, placebokontrollierten, multizentrischen Studie eine signifikante Reduktion von Exazerbationen und Beschwerden bei 6-monatiger oraler Ambroxol- Gabe.(Olivieri 1987) Im Gegensatz dazu fanden Malerba et al. in einer doppelblinden, randomisierten, multizentrischen und placebokontrollierten Studie bezüglich der Anzahl der Exazerbationen nach 6 bzw. 12 Monaten Therapie keinen Vorteil für die Verumgruppe. (Malerba 2004)

Die Indikation für den klinischen Einsatz von Ambroxol zur Behandlung der chronischen Bronchitis und der COPD wird in gleicher Weise, wie alle anderen Substanzen in dieser Substanzgruppe, kritisch gestellt, soll nur zeitlimitiert (z.B. 14 Tage) erfolgen und orientiert sich am besten am subjektiven Therapieerfolg. Die Therapieempfehlung entspricht der oben bei NAC genannten. (Vogelmeier 2007)



## 1.4 Ätherische Öle

### 1.4.1 Allgemeine Wirkung und Eigenschaften

Als ätherische Öle werden flüssige, lipophile Stoffgemische bezeichnet, die in der chemischen Zusammensetzung stark variieren und einen typischen, aromatischen Geruch besitzen. (Hildebrandt 1998) Sie werden aus verschiedenen Pflanzenteilen durch das Verfahren der Wasserdampfdestillation, bzw. aus Zitrusfrüchten durch das Pressen der Schale hergestellt (Falbe 1995) (Schneider 1990) Die starke Lipophilie verleiht den Ölen die Eigenschaft, sich gut im Organismus zu verteilen, wodurch sie oral, parenteral, perkutan und inhalativ appliziert werden können. (Grimm 1987) Das Hauptanwendungsgebiet ätherischer Öle ist die Parfüm- und Aromastoffindustrie. (Falbe 1995) (Leung 1996) (Lis- Balchin 1997).

Ihnen werden folgende Eigenschaften zugesprochen, weshalb sie in der Medizin auch entsprechende Anwendungen finden:

- Expektoration, Sekretolyse z.B. Eukalyptusöl, Anisöl
- Spasmolyse, z. B. Fenchelöl, Kümmelöl
- Entzündungshemmung, z.B. Salbeiöl, Kamillenöl
- Desinfektion, z.B. Lavendelöl, Pfefferminzöl.(Schneider 1990) (Gessner 1974) (Wichtl 1997).

Aufgrund dieser Eigenschaften sind einige ätherische Öle (Myrtol, Cineol) auch bei der akuten und chronischen Bronchitis als Präparate zugelassen. (Grimm 1987)

Sie können nur in verdünnter Form verabreicht werden, da sie in hohen Konzentrationen stark haut- und schleimhautreizend wirken. Der reizende Effekt ist durch die Zytotoxizität bei hohen Konzentrationen zu erklären, durch welche Zellmembranen und eingelagerte Enzyme angegriffen werden. (Graßmann 2000)

Chemisch bestehen ätherische Öle hauptsächlich aus einem Gemisch verschiedener Terpene, welche Polymerisationsprodukte des Kohlenwasserstoffs Isopren ( $C_5$ ) sind. (Jürgens 2003) Je nach Anzahl der vorliegenden Terpenreste wird unterschieden: Monoterpene ( $C_{10}$ ), Sesquiterpene ( $C_{15}$ ), Diterpene ( $C_{20}$ ), Sesterterpene ( $C_{25}$ ), Triterpene ( $C_{30}$ ), Tetraterpene ( $C_{40}$ ) und Polyterpene. (Vetter 1998)

Von den schwächer lipophilen Substanzen wurde eine ausgeprägtere Sauerstoff-Radikalfängereigenschaft beschrieben, die auf eine größere Oberflächeneigenschaft

zurückgeführt wird, womit sie besser mit z.B. OH<sup>•</sup>- Radikalen interagieren können.(Graßmann 2000)

Da in der vorliegenden Arbeit die folgenden Öle untersucht wurden:

- Eukalyptusöl
- 1,8- Cineol
- Orangenöl
- Myrtol N

sollen diese hier in einer Übersicht vorgestellt werden.

#### 1.4.2 Eukalyptusöl und sein Hauptinhaltsstoff 1,8- Cineol

Eukalyptusöl wird durch Wasserdampfdestillation aus den Blättern und Zweigen des Eukalyptusbaumes gewonnen. In diesem Zustand besitzt es jedoch noch viele Aldehyde, die eine Irritation des Respirationstraktes hervorrufen würden. Daher werden diese in einem weiteren Herstellungsschritt entfernt, wonach das gewonnene Öl zu etwa 70-90% aus dem gesättigten Monoterpen 1,8- Cineol besteht. (Vetter 1998) (Graßmann 2000)

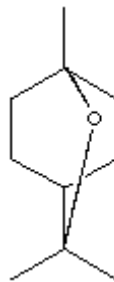


Abbildung 8 1,8- Cineol (Pohl Boskamp 2005)

Dieser Wirkstoff zählt zu den relativ- verglichen mit anderen Terpenen- hydrophilen Substanzen und hat somit vergleichsweise stärkere antioxidative Eigenschaften. (Graßmann 2000)

1,8- Cineol werden folgende Eigenschaften und Wirkungen zugeschrieben:

- Erhöhung des serösen Sekretanteils in der Lunge
- schwacher (im Vergleich zu  $\beta_2$ -Mimetika) bronchospasmolytischer Effekt
- desinfizierende Wirkung
- entzündungshemmende und antioxidative Wirkung
- Aktivierung der Ziliartätigkeit mit Steigerung der mukoziliären Clearance
- glukokortikoidsparende Effekte bei Asthma bronchiale
- Verbesserung von Lungenfunktionsparameter z.B. Senkung Atemwegwiderstand, Erhöhung Peak-flow-Wert und FEV<sub>1</sub>
- Verbesserung des subjektiven Krankheitsgefühls und der asthmatischen Symptomatik, wie z.B. Verminderung von Husten, Auswurf, Ruhe- und Belastungsdyspnoe

(Grimm 1987) (Schäfer 1981) (Konietzko 1983) (Schilcher 1984) (Wagner 1986) (Habich 1994) (Vetter 1998) (Vetter 1998) (Mahlo 2002) (Dorow 1989) (Graßmann 2000)

Aufgrund dieser Wirkungen hat Eukalyptusöl zur Behandlung akuter und chronischer Bronchitiden, Sinusitiden und respiratorischer Infekte, sowie äußerlich bei rheumatischen Erkrankungen eine breite Anwendung gefunden. (Vetter 1998) (Graßmann 2000)

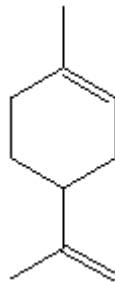
Die beschriebenen klinischen Wirkungen von 1,8- Cineol lassen sich zellbiologisch stützen, da antiinflammatorische Effekte in vitro, z.B. in Bezug auf die Zytokinproduktion von Monozyten belegt sind. Jürgens et al. fanden, dass 1,8- Cineol die Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, Leukotrien B<sub>4</sub>, Thromboxan B<sub>2</sub> und Prostaglandin E<sub>2</sub> von aus dem Blut isolierten mononukleäre Zellen signifikant senkt. (Jürgens 2004) (Jürgens 1998b) (Jürgens 1998c)

Aufgrund dieser bereits untersuchten Eigenschaften wurde Cineol in dieser Arbeit in Vorversuchen zur Monozytenisolation verwendet.

Die Wirkung des Gemisches Eukalyptusöl auf die Zytokinproduktion in Monozyten- bislang noch nicht getestet- wird in dieser Arbeit geprüft

### 1.4.3 Orangenöl

Da bei der Herstellung durch Wasserdampfdestillation nur ein minderwertiges Öl entsteht, wird Orangenöl heute durch Pressen von Orangenschalen gewonnen. Es ist das am häufigste produzierte ätherische Öl und wird vorrangig in der Aroma- und Duftstoffindustrie genutzt. Den Hauptinhaltsstoff bildet mit 70-90% das Monoterpen (+)-Limonen. (Graßmann 2000)



**Abbildung 9** (+)-Limonen (Pohl Boskamp 2005)

Zwar findet Orangenöl in der Medizin bisher noch keine Anwendung, jedoch wurden in den letzten Jahren mehrere Studien zu antiinflammatorischen Eigenschaften mit dem Hauptwirkstoff publiziert. (Graßmann 2000; Souza 2003; Keinan 2005; Jeferson 2007)

Oral appliziert unterdrückt (+)-Limonen im Maus- Modell die LPS- induzierte Entzündung durch Inhibition der NO-, IFN-  $\gamma$ - und IL- 4- Produktion. (Souza 2003) In inhalativer Darreichungsform konnte es bei Ratten einer bronchialen Obstruktion sowie einer peribronchiolaren und perivaskulären Inflammation vorbeugen. (Keinan 2005) Ein antinozizeptiver Effekt wurde durch chemische Tests an Mäusen (Injektion von Essigsäure intraperitoneal bzw. Formalin subplantar) nachgewiesen. (Jeferson 2007)

Die Eigenschaft als Radikalfänger ist bei (+)-Limonen- verglichen mit den anderen betrachteten Ölen- geringer ausgeprägt. Dies ist durch eine starke Lipophilie verbunden mit Mizellenbildung zu erklären. (Graßmann 2000)

Auch für dieses Öl gibt es keine Daten über die Wirkung auf die Mediatorfreisetzung in Monozyten.

#### 1.4.4 Myrtol N

Myrtol N stellt ein Destillat der beiden Öle Eukalyptusöl und Orangenöl im Verhältnis 2:1 dar. Es enthält als Hauptinhaltsstoffe die beiden Monoterpene 1,8- Cineol und (+)-Limonen, die wirkungsbestimmend sind. Es wurde basierend auf den Erfahrungen mit Myrtol standardisiert entwickelt und hat zu diesem eine große Ähnlichkeit. Es wird deshalb auf die Untersuchungen mit Myrtol standardisiert verwiesen. (Pohl and Boskamp 2005)

Myrtol standardisiert enthält neben 1,8- Cineol und (+)-Limonen zusätzlich das Monoterpen (+)  $\alpha$ -Pinen und ist u.a. auf dem deutschen Markt in magensaftresistenten Kapseln erhältlich. Dabei enthält eine Kapsel Gelomyrtol<sup>®</sup> mit 120mg Myrtol standardisiert 30mg 1,8- Cineol, 30mg Limonen und 8mg (+)  $\alpha$ -Pinen. Eine Kapsel Gelomyrtol<sup>®</sup> forte mit 300mg Myrtol standardisiert enthält 75mg 1,8- Cineol, 75mg Limonen und 20mg (+)  $\alpha$ -Pinen. Die Wirkstoffe werden erst im Dünndarm aus den Kapseln freigesetzt, schnell resorbiert und unter anderem über die Bronchialschleimhaut abgeatmet. (Zimmermann 1995)

Myrtol standardisiert findet durch seine sekretorische und mukolytische Wirkung in der Behandlung der chronischen und akuten Bronchitis sowie der Sinusitiden seit vielen Jahren breite Anwendung.

Offenbar besitzt Myrtol neben den sekretolytischen und sekretomotorischen Effekten auch entzündliche (Leukotrien C<sub>4</sub> -, Prostaglandin E<sub>2</sub> -Senkung) und antioxidative Eigenschaften. (Meister 1999) (Graßmann 2000) (Beucher 1998)

Die klinische Wirkung wurde in mehreren Studien belegt. So evaluierten Matthys et al 2000 bei akuten Bronchitiden die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Myrtol standardisiert im Vergleich zu dem Sekretolytikum Ambroxol und dem Antibiotikum Cefuroxim. Myrtol war dabei wirkungsäquivalent zum getesteten Antibiotikum Cefuroxim. (Matthys 2000) Kritisch wäre dabei aber die Indikation des Cefuroxim zu bewerten, welches bei der akuten meist viral verursachten Bronchitis gar keinen therapeutischen Sinn macht. Die Wirkungsäquivalenz wäre daher eher auf die wahrscheinlich fehlende Antibiotikawirkung als auf die vermeintlich äquivalente Myrtol- Wirkung zurückzuführen.

Meister et al. fanden 1999 in einer anderen Studie, dass sich in der mit Myrtol standardisiert- langzeitbehandelten (6 Monate) Patientengruppe mit einer chronischen Bronchitis die Intensität und Häufigkeit der Exazerbationen statistisch signifikant senken ließ. Zudem nahm der Antibiotikabedarf ab und es verbesserte sich die Lebensqualität. (Meister 1999)

Von Federspil et al. wurden 1997 Untersuchungen über die Wirkung von Myrtol standardisiert bei akuter Sinusitis mit Placebo verglichen, wobei sich unter Myrtol-Therapie die Symptome Kopfschmerz, Gesichtsschmerz beim Bücken und Druckschmerz über den Nervenaustrittspunkten signifikant verbesserte. (Federspil 1997)

Die Wirksamkeit einer Therapie mit Myrtol standardisiert bei chronischer Sinusitis wurde unter anderem von Laszig 1987 analysiert. Hierbei fand sich eine statistisch signifikante Verbesserung des subjektiven Merkmals „Symptomfreiheit“ und des Röntgenbefundes der Nasennebenhöhlen zu Gunsten von Myrtol standardisiert im Vergleich zur Placebogruppe. (Laszig 1987)

Zusammenfassend ergeben sich für Myrtol standardisiert folgende Eigenschaften.

Myrtol standardisiert wirkt:

- sekretolytisch
- mukolytisch
- sekretomotorisch
- antioxidativ
- antiinflammatorisch
- antimikrobiell
- bronchospasmolytisch

(Wittig 2002)

Über die zelluläre Wirkung von Myrtol standardisiert auf isolierte Monozyten und deren Zytokinproduktion liegen bisher noch keine Daten vor.

## 2 Aufgabenstellung

Knapp die Hälfte aller COPD- Patienten über 65 Jahre leiden an mindestens 3 weiteren chronischen Erkrankungen und 1/5 haben mehr als 5 weitere Erkrankungen. Pathophysiologisch bilden der meist jahrzehntelange Zigarettenabusus, die Hyperlipidämie, das Übergewicht und die Hypertonie die Grundlage der bei diesen Patienten beobachtbaren systemischen Inflammation. Die CRP- Erhöhung ist in diesem Zusammenhang der auffälligste Hinweis, der zudem als Risikofaktor für eine erhöhte Exazerbationsrate beschrieben ist. Vor allem aktivierte granulozytäre und monozytäre Zellen unterhalten das bei der COPD beschriebene chronische Entzündungssyndrom, so dass sich die Suche nach einer verträglichen, antientzündlich wirkenden Substanz, die zudem eine positive Wirkung auf die Bronchien entfaltet, als logische therapeutische Konsequenz ergibt.

Für die ätherischen Öle Eukalyptusöl, Orangenöl und Myrtol N gibt es bereits einige Daten bezüglich ihrer antiinflammatorischen Wirkung. Ziel dieser Studie war es daher, diese ätherischen Öle in Bezug auf ihre antiinflammatorische Wirkung an aus dem Systemkreislauf isolierten Entzündungszellen zu untersuchen. Diese Studie wird als Vorläuferstudie im Sinne eines „proof of concept“ betrachtet, an die sich im positiven Fall eine in vivo- Untersuchung anschließen könnte. Zudem soll im positiven Fall der Wirkmechanismus eines solchen antiinflammatorischen Effektes untersucht werden.

- Hypothesen:
1. Myrtol N, Eukalyptusöl und Orangenöl reduzieren die TNF- $\alpha$ -, Interleukin-6- und Interleukin 1- $\beta$ - Produktion in LPS- stimulierten Monozyten
  2. Die beobachteten Effekte sind abhängig von der im Testansatz gewählten Konzentration
  3. Die genannten ätherischen Öle sind zellulär gut verträglich und nicht toxisch

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Studiendesign und Patientenauswahl

Die vorliegende Untersuchung wurde als offene, single- center Studie durchgeführt. Das untersuchte Kollektiv umfasste 26 Patienten, die zwischen April und August 2007 in der Robert- Koch- Klinik Leipzig, dem Thoraxzentrum des Städtischen Klinikums St. Georg, behandelt und bei Erfüllen der Einschlusskriterien in die Studie aufgenommen wurden. Der primäre Endpunkt der Untersuchung bestand in einer Reduktion der TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ - und IL-6- Werte in isolierten Monozyten.

Einschlusskriterien:

- COPD Grad II-IV nach GOLD- Definition (GOLD 2006)
- Alter zwischen 45 und 90 Jahren
- Einwilligung der Patienten zur Blutentnahme
- Nikotinabusus  $\geq$  10 Packungsjahren bzw. Vorhandensein anderer Risikofaktoren, z.B. Silikose oder  $\alpha$ -1-Antitrypsinmangel

Ausschlusskriterien:

- pulmonale Malignome oder extrapulmonale Malignome mit pulmonalem Befall
- Chemotherapie, Strahlentherapie, Lungenresektionschirurgie
- andere schwerwiegende extrapulmonale Erkrankungen mit klinischer Instabilität, klinische Entscheidung durch Studienarzt
- andere Erkrankungen, die eine immunsuppressive Therapie erforderten oder die wesentlich das Testergebnis hätten beeinflussen können, z.B. Dialysepflichtigkeit, dekompensierte Herzinsuffizienz, akuter Myokardinfarkt
- Unvermögen Studieninhalt und Aufklärungsbogen zu erfassen
- Weigerung zur Studienteilnahme

In die Studiengruppe wurden insgesamt 19 Männern und 7 Frauen im Alter von 47- 88 Jahren eingeschlossen. Unter den männlichen Patienten befanden sich 5 Raucher, 13 ehemalige Raucher und 1 Nichtraucher, ein Patient mit COPD, die er im Rahmen einer Silikose entwickelte.



Unter den weiblichen Studienteilnehmern waren 4 Raucherinnen und 3 ehemalige Raucherinnen.

Die Genehmigung zur Durchführung der Studie liegt der Ethikkommission der Sächsischen Landesärztekammer unter dem Bearbeitungskennzeichen EK-BR-27/05-2 vor.

### ***3.2 Isolierung humaner Monozyten aus peripherem Blut***

<u>Reagenzien:</u>	NycoPrep™1.068	Axis Shield, Oslo
	Hanks´ Salt Solution	Biochrom AG, Berlin
	RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
	+ Penicillin- Streptomycin	GIBCO, Invitrogen
	+ L-Glutamine 200 mM	Biochrom AG, Berlin
	+ Amphotericin (5 mg/ml.)	Bristol-Myers Squibb, München
	=RPMI-komplett	
	Dextran (T500)	Roth, Karlsruhe
	EDTA	Merck, Darmstadt
	Natriumchlorid p.a. (NaCl)	Merck, Darmstadt
	Fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO, Invitrogen
	Aqua dest. (Aqua B. Braun)	Braun, Melsungen

#### Geräte und Verbrauchsmaterialien:

Pipetten (Lab Mate)	Abimed, Langenfeld
Pipetten- Tips (epT.I.P.S.)	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge (T54)	MLW, Medizintechnik Leipzig
Transferpipetten	Sarstedt

Die Isolation der Monozyten erfolgte aus venösem Blut von COPD- Patienten. Dafür wurden jedem Patient 27ml (3 EDTA- beschichtete Röhrchen) peripheres Blut entnommen und mit 2,7ml 6% (w/v) Dextran 500 (gelöst in 0,9% (w/v) NaCl) gemischt.

Dextran bewirkt über die so genannte Geldrollenbildung der Erythrozyten ein schnelleres Absinken dieser, so dass nach 40- minütiger Sedimentation bei Raumtemperatur das leukozytenreiche Plasma vorsichtig abpipettiert werden konnte. Jeweils 6ml des Plasmas wurden in zwei sterilen Zentrifugenröhrchen über 3ml NycoPrep™1.068 vorsichtig übereinander geschichtet und 15 Minuten bei 2300rpm zentrifugiert. Es entstanden 3 Phasen, wobei Plasma die obere Schicht bildete, das nach vorsichtigem Abpipettieren 20 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, vom Pellet getrennt und zur späteren Verwendung aufbewahrt wurde. Die untere Phase wurde verworfen. Die schmale weiße Interphase bildeten Monozyten und Lymphozyten. Um die Monozyten zu separieren, wurde die Interphase entnommen, in zwei neue Zentrifugenröhrchen überführt, mit 6ml Lösung A aufgefüllt und 7 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Lösung A bestand aus einer Suspension mit 0,9% (w/v) NaCl, 0,13% (w/v) EDTA und 1% (w/v) FKS. Die erhaltenen Zellpellets wurden in einem weiteren Waschschrift in jeweils 3ml Lösung A resuspendiert und erneut 7 Minuten bei 1900rpm zentrifugiert. Um die Monozyten von anhaftenden Thrombozyten zu trennen, wurde das Pellet mit je 1ml Hanks' Salt Solution suspendiert und in zwei neuen sterilen Zentrifugenröhrchen über 3ml des vorher gewonnenen Plasmas geschichtet. Nach 15- minütiger Zentrifugation bei 500rpm und erneuten Waschens in je 3ml Hanks' Salt Solution für 10 Minuten bei 1400rpm in frischen Röhrchen, wurden die entstandenen Pellets mit 1ml RPMI + FKS zusammengeführt.

Die Schwierigkeit bei der Isolation von Monozyten aus peripherem Blut bestand in der Abtrennung der Lymphozyten, da die Dichte beider Zelltypen ähnlich ist. Monozyten besitzen zwar im Vergleich zu Lymphozyten eine durchschnittlich niedrigere Dichte, allerdings sind die Unterschiede so gering, dass basierend nur auf Dichtegradienten allein eine zufrieden stellende Trennung mit hoher Reproduzierbarkeit nicht möglich ist. Die Trennung kann durch entsprechende Anpassung der Osmolalität des Mediums verbessert werden, da mit steigender Osmolalität des Mediums die Zellen Wasser abgeben und damit schrumpfen, wodurch ihre Dichte steigt. Diesbezüglich reagieren Lymphozyten sensibler als Monozyten, wodurch der Dichteunterschied zwischen den beiden Zellarten wächst und sich die Zelltrennung erleichtert.

Das in den Versuchen verwendete NycoPrep™ ist eine leicht hyperosmotische Lösung und nutzt diesen Effekt aus, wodurch eine „saubere“ Monozytenisolation möglich wird, was sich durch die mikroskopische Kontrolle bestätigen ließ (s.3.4).

### 3.3 Zellzählung und Einstellung der Zellkonzentration

Reagenzien: aus Schritt 3.2 gewonnene Zellsuspension

RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
+ Penicillin- Streptomycin	GIBCO, Invitrogen
+ L-Glutamine 200 mM	Biochrom AG, Berlin
+ Amphotericin (5 mg/ml.)	Bristol-Myers Squibb, München
=RPMI-komplett	
Fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO, Invitrogen
Trypanblau 0,4%	Sigma, Taufkirchen

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

Pipetten (Lab Mate)	Abimed, Langenfeld
Pipetten- Tips (epT.I.P.S.)	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauerzählkammer	Assistent, Sondheim
Mikroskop (Laboval 4)	Carl Zeiss Jena

Zur Zellzählung wurden 70 µl der Zellsuspension 1:1 mit Trypanblau vermischt und in die Zählkammer überführt. In dieser wurden die lebenden (nicht blau- gefärbten) Zellen aus vier Quadranten gezählt und der Mittelwert gebildet. Die relative Zellzahl pro ml ergab sich aus diesem Mittelwert multipliziert mit dem Faktor 20.000.

Die Zellzahl wurde durch Zugabe von RPMI + FKS auf 200.000 Zellen/ml eingestellt. In diesem Arbeitsschritt konnte außerdem die Zellvitalität der Monozyten überprüft werden, da Trypanblau nur von Zellen mit geschädigter Zellwand aufgenommen wird. Ein Vitalitätsgrad von  $\geq 80\%$  wurde für die weiteren in vitro- Untersuchungen akzeptiert. Ansonsten wurden die Zellen verworfen.

### 3.4 Präparatherstellung zur Reinheitsbestimmung

Reagenzien: aus Schritt 3.3 gewonnene Zellsuspension

Färbeset (Hemacolor <sup>®</sup> )	Merck, Darmstadt
Aqua dest. (Aqua B. Braun)	Braun, Melsungen

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

Pipetten (Lab Mate)	Abimed, Langenfeld
Pipetten- Tips (epT.I.P.S.)	Eppendorf AG, Hamburg
Objektträger	Starfrost
Trichter mit Haltevorrichtung	Hettich, Tuttlingen
Filterpapier	Hettich, Tuttlingen
Zentrifuge (Universal)	Hettich, Tuttlingen
Mikroskop (Jenamed 2 fluorescence)	Carl Zeiss Jena

Zur Reinheitsbestimmung der gewonnenen Zellen wurde ein Präparat mittels Hemacolor<sup>®</sup>- Schnellfärbung hergestellt, welches lichtmikroskopisch beurteilt wurde.

Hierfür wurden 100 µl der Zellsuspension über einen Trichter auf den Objektträger aufgebracht und 5 Minuten bei 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Objektträger ohne Trichter bis zum Erreichen einer Geschwindigkeit von 2000rpm trocken- zentrifugiert. Anschließend erfolgte die Färbung der getrockneten Zellen entsprechend dem Protokoll des Hemacolor<sup>®</sup>-Färbesets. (Merck 2004) Dabei wurde zur Darstellung der gewonnenen Zellen die Wechselwirkung von Eosin G und einem Azur B- DNA- Komplex genutzt.

Im angefertigten Präparat wurden die gewonnenen Zellen mittels Lichtmikroskop bezüglich ihre Reinheit überprüft.

### 3.5 *Stimulation und Kultivierung der Monozyten*

Reagenzien: aus Schritt 3.3 gewonnene Zellsuspension

RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin
+ Penicillin- Streptomycin	GIBCO, Invitrogen
+ L-Glutamine 200 mM	Biochrom AG, Berlin
+ Amphotericin (5 mg/ml.)	Bristol-Myers Squibb, München
=RPMI-komplett	
Fetales Kälberserum (FKS)	GIBCO, Invitrogen
LPS 1mg	Sigma, Steinheim
Myrtol N	G. Pohl- Boskamp, Hohenlockstedt
1,8-Cineol	G. Pohl- Boskamp, Hohenlockstedt
Orangenöl	G. Pohl- Boskamp, Hohenlockstedt
Eukalyptusöl	G. Pohl- Boskamp, Hohenlockstedt

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

48-Well-Platte (Cellstar)	Greiner bio-one
Pipetten (Lab Mate)	Abimed, Langenfeld
Pipetten- Tips (epT.I.P.S.)	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, Inc.
Brutschrank	Binder

Zur Bestimmung der Einflüsse oben genannter Öle auf die Zytokinproduktion der Monozyten wurden diese mit der bereits eingestellten Konzentration von 200.000 Zellen/ml in eine 48-Well-Platte überführt. Dabei wurden je Vertiefung 500µl der Monozytensuspension (entspricht 100.000 Zellen/ Well) verwendet. Als unstimulierte Kontrollprobe wurden 500µl RPMI + FKS hinzupipettiert

Die Exposition gegenüber Lipopolysacchariden (LPS) wurde in der beschriebenen Zellkultur als Maximalstimulation verwendet. Es wirkt als ein starkes Antigen und provoziert somit eine Immunantwort. Dazu wurde LPS in RPMI verdünnt, wovon je 100µl (0,1mg/ml) in die entsprechenden Vertiefungen der Platte hinzu gegeben wurden. Die jeweiligen Proben wurden mit 400µl RPMI + FKS auf 1ml aufgefüllt.

Zur Beurteilung der Zytokinreduktion wurden die Testansätze in unterschiedlichen Konzentrationen mit den verwendeten Ölen (Myrtol N, Eukalyptus-, bzw. Orangenöl) versetzt. In dieser Versuchsreihe wurde von einer therapeutischen Konzentration der Öle von  $10^{-5}$ M ausgegangen, was  $1,5 \cdot 10^{-4}$ % entspricht. Je nach vorhandener Zellmenge wurden Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}$  % bis  $1,5 \cdot 10^{-6}$  % mit RPMI + FKS hergestellt und getestet.

Die Kulturplatten wurden nach folgendem Schema bestückt:

Well	1 (Kon- trolle)	2 (LPS)	3 (Öl 1,5 $\cdot 10^{-3}$ %)	4 (Öl 1,5 $\cdot 10^{-4}$ %)	5 (Öl 1,5 $\cdot 10^{-5}$ %)	6 (Öl 1,5 $\cdot 10^{-6}$ %)
<u>Zusammensetzung:</u>						
Zellsuspension	500µl	500µl	500µl	500µl	500µl	500µl
RPMI + FKS	500µl	400µl				
LPS	-	100µl	100µl	100µl	100µl	100µl
Öl entsprechender Konzentration	-	-	400µl	400µl	400µl	400µl

Alle Tests wurden als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Kulturplatte wurden bei 37°C (pCO<sub>2</sub> 5%) 20 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### ***3.6 Gewinnung der Überstände und Vitalitätsprüfung mittels Trypanblau***

Reagenzien: aus Schritt 3.5 gewonnenes Probenmaterial

Trypanblau 0,4%	Sigma, Taufkirchen
PBS- Puffer, w/o Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Berlin

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

Pipetten (Lab Mate)	Abimed, Langenfeld
Pipetten-Tips (epT.I.P.S.)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße 1,5ml	Greiner bio-one
Zentrifuge (Mikro 22R)	Hettich, Tuttlingen
Mikroskop (Eclipse TS100)	Nikon
Gefrierschrank	Siemens

Nach zwanzigstündiger Inkubation wurden die Überstände (je 1ml) vorsichtig aus den Vertiefungen in Reaktionsgefäße abpipettiert. Diese wurden 10 Minuten bei 4°C und 2000rpm zentrifugiert. Anschließend wurden je 0,9ml des Überstandes- in dem später die Zytokine quantifiziert wurden- in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

Die Vitalität der am Boden der Vertiefungen anhaftenden Monozyten konnte durch Zugabe von 200µl PBS und 10µl Trypanblau unter dem Mikroskop geprüft werden.

Die Vitalität lag bei den durchgeführten Versuchen stets über 80%. Testansätze mit einer geringeren Vitalität wurden verworfen.

### 3.7 Zytokinbestimmung

#### 3.7.1 Allgemeines

Die Zytokinbestimmung erfolgte jeweils aus den gewonnenen Überständen (siehe 3.6.) und unter Verwendung von kommerziell erworbenen ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)- Kits.

Der ELISA dient dem quantitativen Nachweis löslicher Antigene und Antikörper. In diesem Fall wurde ein Sandwich- ELISA verwendet, mit dem die Antigenkonzentration der Lösung bestimmt wurde. (Oethinger 1997)

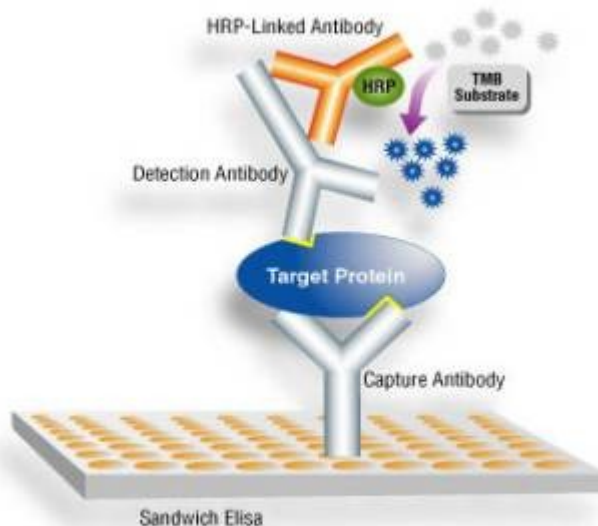


Abbildung 10 Sandwich- ELISA

Die Wirkungsweise des Sandwich- ELISA beruht auf einer gleichzeitigen Bindung mehrerer Antikörper an unterschiedliche Epitope eines bestimmten Zielmoleküls (= Target Protein, s. Abbildung 10), in diesem Fall TNF- $\alpha$ , IL-6 oder IL-1 $\beta$ . Dabei heftete der erste spezifische Antikörper (= Capture Antibody) an dem Boden der Mikrotiterplatte an, auf welche die Proben mit unbekannter, sowie die Standards mit bekannter Antigenkonzentration pipettiert wurden (Groß 2006). Ungebundene Antigene wurden durch einen Waschschrift entfernt.



Danach wurde der zweite Antikörper (Detection Antibody) hinzu gegeben, welcher ebenfalls eine Spezifität für das gesuchte Antigen aufwies und durch seine Enzymmarkierung (hier mit Biotin) als Indikatorantikörper fungierte. Durch einen zweiten Waschschrift wurden ungebundene Antikörper entfernt. Im folgenden Schritt wurde mit Meerrettich- Peroxidase (HRP) konjugiertes Streptavidin (=HRP- linked Antibody) zugegeben, welches an die Biotin- konjugierte Seite des Antigens band. Ungebundenes Streptavidin- HRP wurde durch einen weiteren Waschschrift entfernt, wonach TMB- Substrat auf die Mikrotiterplatte pipetiert wurde. Dieses induzierte im gebildeten Komplex eine Farbreaktion, die sich durch die 1:1 Bindung von Antigen und Antikörper- proportional zur enthaltenen Antigenmenge verhielt. Bei einer Wellenlänge von 450 nm wurde die Absorption spektralphotometrisch bestimmt und die Probenkonzentration mit der parallel mitlaufenden Standardkurve abgeglichen.

### 3.7.2 TNF- $\alpha$ , Interleukin-6 und Interleukin- 1 $\beta$

Reagenzien: aus Schritt 3.5 gewonnenes Probenmaterial

Human TNF- $\alpha$ ELISA kit	Immuno Tools, Friesoythe
Human IL-6 ELISA kit	Immuno Tools, Friesoythe
Interleukin-1 $\beta$ ELISA	IBL, Hamburg
Aqua dest. (Aqua B. Braun)	Braun, Melsungen

Geräte und Verbrauchsmaterialien:

Pipetten (Lab Mate)	Abimed, Langenfeld
Mehrkanalpipette (Discovery)	Abimed, Langenfeld
Pipetten-Tips (epT.I.P.S.)	Eppendorf AG, Hamburg
Absorptionsmessgerät (FLUOstar Optima)	BMG Labtech, Offenburg

Die Durchführung der TNF- $\alpha$ -, IL-6- und IL-1 $\beta$ -Bestimmung erfolgte anhand der Protokolle des Herstellers. Die Substanzmengen, Inkubationszeiten und Waschschrift wurden allerdings an eigene experimentelle Erfordernisse individuell adaptiert. Das Messprinzip war jedoch in allen Fällen identisch (s. Abbildung 10).

### 3.8 Statistik

Für die statistische Analyse wurden als Software die Programme Excel von Microsoft Office für Windows XP und SigmaStat von Jandel Scientific/ SPSS INC angewandt. Als Lagemaß diente der Mittelwert und als Streuungsmaß die Standardabweichung.

In den Ergebniskurven wurden immer der Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben. Der Kolmogorow-Smirnow-Test wurde verwendet, um die erhobenen Daten und Messwerte auf Normalverteilung zu überprüfen. Zum Vergleich zweier normalverteilter Merkmale wurde für alle parametrischen Daten der Student's t-Test und die Varianzanalyse verwendet. Sofern die Messdaten nicht normalverteilt waren, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Unterschiede und zweiseitige Fehlerwahrscheinlichkeiten wurde mit  $p \leq 0,05$ , d.h. mit einer 5% Irrtumswahrscheinlichkeit angenommen. Ab diesem Niveau bestand ein signifikanter Unterschied, ab  $p < 0,01$  wurde dieser als stark signifikant und ab  $p \leq 0,001$  als sehr signifikant angesehen und gedeutet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Patientencharakteristika

Parameter	Männlich	weiblich
<b>Teilnehmerzahl</b>	<b>19</b>	<b>7</b>
<b>Alter (Jahren)</b>		
Mittelwert	<b>69</b>	<b>67</b>
Minimum	47	58
Maximum	88	79
<b>Rauchgewohnheiten</b>		
<b>Raucher</b>	<b>5</b>	<b>3</b>
Packungsjahre		
Mittelwert	30	36,6
Minimum	10	20
Maximum	50	50
<b>ehemalige Raucher</b>	<b>13</b>	<b>4</b>
Packungsjahre		
Mittelwert	21,3	10
Minimum	10	10
Maximum	40	10
<b>Nichtraucher</b>	<b>1(Silikose)</b>	<b>0</b>

Tabelle 9 Basisdaten der Studienteilnehmer

### 4.2 Medikamentenanamnese der Patienten

Alle Patienten wurden zum Zeitpunkt der Probengewinnung mit einem langwirksamen  $\beta_2$ -Mimetikum (92,3% Formoterol, 7,7% Salmeterol) behandelt. Bei 100% der Studienteilnehmer kam als Dauer- oder Bedarfstherapie ein kurzwirksames  $\beta_2$ -Mimetikum zum Einsatz.

84,6% bzw. 92,3% der Patienten wurde zusätzlich mit Tiotropiumbromid bzw. Theophyllin bronchodilatativ behandelt

Eine topische Kortikosteroidtherapie (Budesonid oder Fluticason ) erfolgte bei 96% der Studienteilnehmer, während eine orale/ intravenöse Kortikosteroidtherapie in knapp 70% der Fälle erfolgte, da die Patienten in der Rober- Koch- Klinik wegen einer akuten COPD- Exazerbation behandelt werden mussten, was die systemische Kortikosteroidtherapie einschloss.

<b>Medikament</b>	<b>% der Teilnehmer</b>	<b>durchschnittliche Tagesdosis</b>
<b>Steroid</b>		
Inhalativ	<b>96,15</b>	
Budesonid	92	598,26 µg
Fluticason	8	1000 µg
Oral	<b>69,23</b>	
Prednisolon		13,06 mg
<b>β<sub>2</sub>- Mimetikum</b>		
Kurzwirksam	<b>100</b>	
Fenoterol bzw. Salbutamol		bei Bedarf 0,2 mg
Langwirksam	<b>100</b>	
Formoterol	92,30	17,375 µg
Salmeterol	7,70	100 µg
<b>Tiotropiumbromid</b>	<b>84,60</b>	18 µg
<b>Theophyllin</b>	<b>92,30</b>	575 mg

Tabelle 10      Medikamentöse Therapie der Studienteilnehmer

### 4.3 Lungenfunktion der Patienten

Die relative Einsekundenkapazität ( $FEV_1/VC$ ) der Studienteilnehmer betrug stets weniger als 70%. Dieser erniedrigte Tiffenau- Index garantierte, dass COPD- Patienten mindestens mit einem Schweregrad II eingeschlossen wurden. Zusätzlich wurden  $FEV_1$ -Werte gemessen, die zwischen den Maxima- Minima 15,9% und 79,9% des Sollwertes schwankten und nach denen sich folgende COPD- Schweregrade ergaben:

- Schweregrad II ( $FEV_1$  50-80%): 6 Patienten (23%)
- Schweregrad III ( $FEV_1$  30-50%): 13 Patienten (50%)
- Schweregrad IV ( $FEV_1 \leq 30\%$ ): 7 Patienten (27%)

Parameter	Mittelwert	SD	Minimum	Maximum	Median
$FEV_1$ (l)	1,1	0,56	0,36	2,73	1,04
VC (l)	2,01	0,85	0,42	3,91	2,035
<b><math>FEV_1/VC</math> (%)</b>	<b>55,9</b>	<b>13,72</b>	<b>39,08</b>	<b>69,85</b>	<b>51,93</b>
<b><math>FEV_1</math> (%Sollwert)</b>	<b>42,08</b>	<b>17,85</b>	<b>15,9</b>	<b>79,9</b>	<b>41,3</b>
VC (%Sollwert)	56,61	19,89	15,8	88,5	62
RV (l)	3,56	0,87	2,18	5,28	3,455
RV (%Sollwert)	150,5	38,45	80,4	229,7	146,05

Tabelle 11 Lungenfunktionsparameter der Studienteilnehmer

#### 4.4 Serumchemie der Patienten

Im Differentialblutbild zeigte sich eine leichte durchschnittliche Erhöhung der relativen Monozytenzahl (8,29%). Zudem war die durchschnittliche CRP- Wert- Erhöhung von 36mg/l auffällig und weist auf einen akuten und/oder chronischen Entzündungsprozess hin, der als COPD- bedingt interpretiert wurde.

Die Blutgasanalyse bei den untersuchten Patienten ergab einen durchschnittlich erniedrigten Sauerstoffpartialdruck von <70mmHg in Ruhe. Bei 5 der 26 Studienteilnehmer bestand außerdem eine Hyperkapnie ( $p\text{CO}_2 >45\text{mmHg}$  = respiratorische Globalinsuffizienz oder ventilatorische Insuffizienz).

Weitere Details s. Tabelle 12.

	Mittelwert	Minimum	Maximum	Normwert
<b>Differentialblutbild</b>				
Lymphozyten relativ (%)	14,94	3,8	31,5	25-40
Lymphozyten absolut (Gpt/l)	1,44	0,57	2,97	0,8-4,1
Monozyten relativ (%)	8,29	3,8	21,1	2,0-8,0
Mononukleäre Zellen absolut (Gpt/l)	0,79	0,33	1,98	0,0-1,0
Gesamtneutrophile relativ(%)	73,61	55,1	91,4	50-74
<b>Blutgasanalyse</b>				
pH	7,45	7,22	7,58	7,35-7,45
$p\text{CO}_2(\text{mmHg})$	39,75	27,3	74	35-45
$p\text{O}_2(\text{mmHg})$	60,22	43,4	77,25	70-100
<b>Entzündungsparameter</b>				
CRP(mg/l)	35,91	4,7	164,9	<5

Tabelle 12 Laborparameter der Studienteilnehmer

#### 4.5 Zytotoxizität von Orangenöl, Eukalyptusöl und Myrtol N

Entsprechend den in vivo zu erwartenden Maximalkonzentrationen wurden für in vitro Zellassays vor allem Öl- Konzentrationen von  $10^{-5}$  Mol verwendet, was einer Lösungsmenge von  $1,5 \cdot 10^{-4}$  % entspricht (s. Tabelle 13). Je nach vorhandener Zellmenge wurden die Zellen allerdings auch mit maximalen Konzentrationen bis  $1,5 \cdot 10^{-3}$  % und  $1,5 \cdot 10^{-6}$  % exponiert.

Verdünnungsfaktor (%)	Konzentration (Mol)
0,0015 = $1,5 \cdot 10^{-3}$	0,0001 = $1 \cdot 10^{-4}$
0,00015 = $1,5 \cdot 10^{-4}$	0,00001 = $1 \cdot 10^{-5}$
0,000015 = $1,5 \cdot 10^{-5}$	0,000001 = $1 \cdot 10^{-6}$
0,0000015 = $1,5 \cdot 10^{-6}$	0,0000001 = $1 \cdot 10^{-7}$

Tabelle 13 Umrechnungstabelle

Dabei lag die Vitalität der Monozyten- gemessen anhand der Vitalitätsprüfung mit Trypanblaufärbung- nach zwanzigstündiger Inkubation mit Orangenöl, Eukalyptusöl bzw. Myrtol N bei allen Konzentrationen stets bei >80%.

#### 4.6 Antiinflammatorische Wirkung von Orangenöl

##### 4.6.1 Interleukin-6

	Kontrolle	LPS	Orange $1,5 \cdot 10^{-3}$ %	Reduk. (%)	LPS	Orange $1,5 \cdot 10^{-4}$ %	Reduk. (%)
<b>N</b>	11	7	7		11	11	
<b>Mittelwert</b>	3768,51	18864,67	19015,74	<b>0,8</b>	19295,04	17855,99	<b>-7,46</b>
<b>Standard- fehler</b>	±1436,06	±2008,58	±2337,89		±1303,05	±1724,886	
<b>Median</b>	1749,92	18437,2	18518,3	0,44	18470	17561,75	-4,9
<b>Minimum</b>	279,78	11911,75	10299,4		11911,75	7368,9	
<b>Maximum</b>	11892,7	29096,7	29543,1		29096,7	31132,2	

Tabelle 14 Reduktion der zellulären IL-6- Freisetzung durch Orangenöl

Messreihen mit Orangenöl zeigten bei einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  eine durchschnittliche Reduktion der IL-6-Freisetzung um 7,5% (nicht signifikant,  $p=0,513$ ).

Bei einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  war keine Reduktion nachweisbar. Die IL-6-Ausschüttung aus Monozyten blieb nahezu konstant.

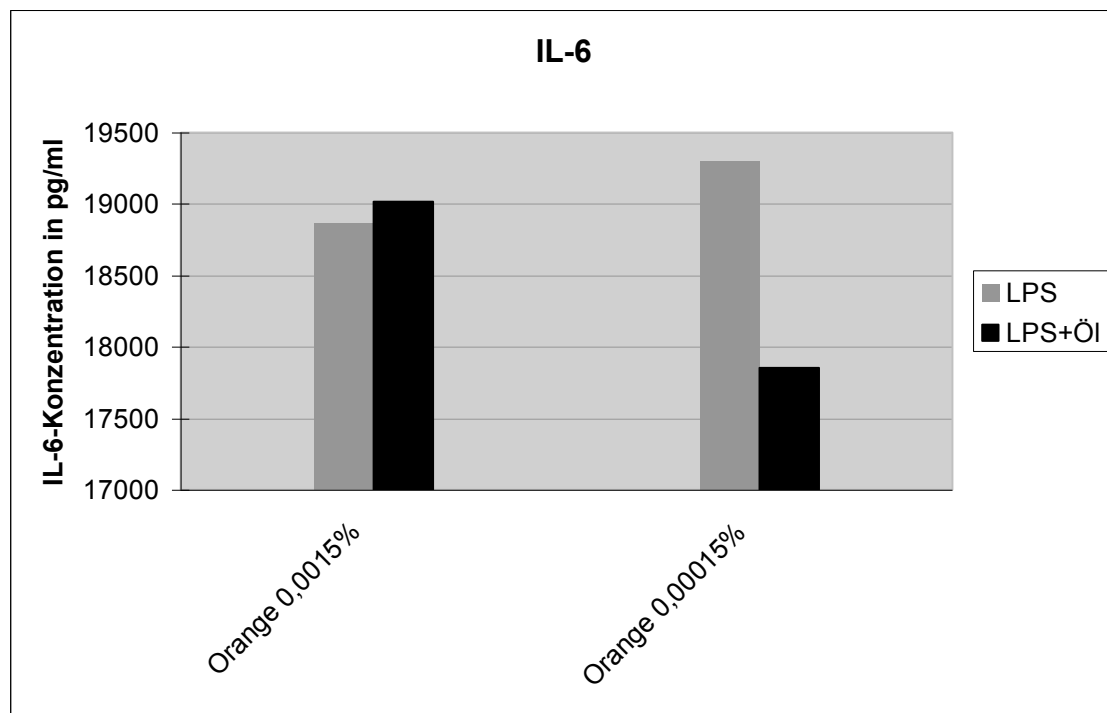


Abbildung 11 IL-6-Konzentrationen (pg/ml) ohne und mit Orangenöl ( $1,5 \cdot 10^{-3}$ ,  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$ )



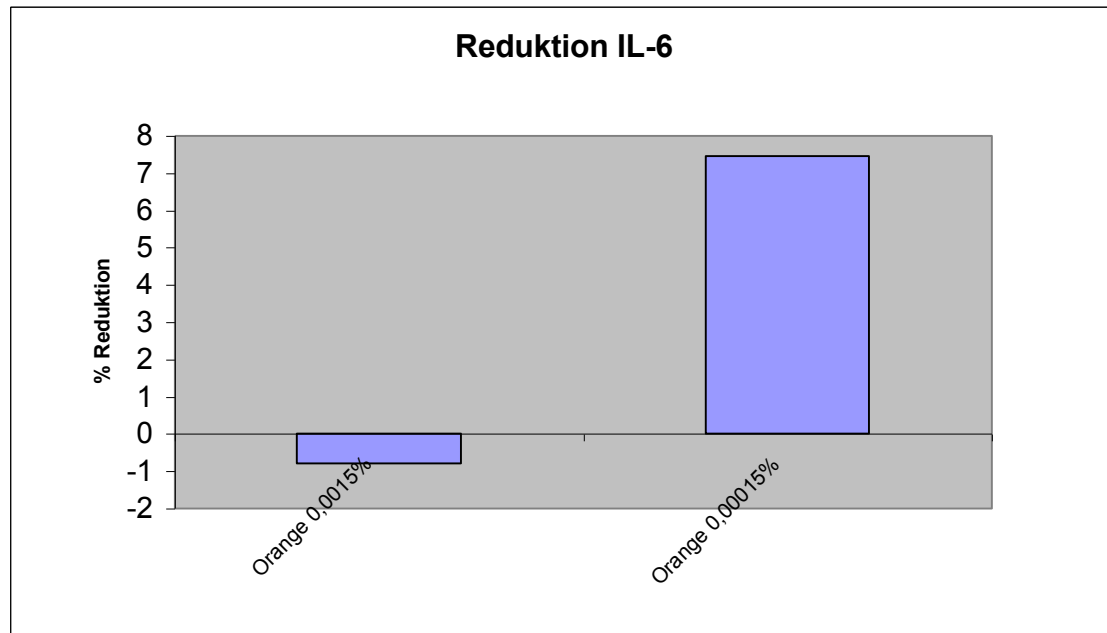


Abbildung 12 IL-6- Reduktion (%) durch Orangenöl  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$

#### 4.6.2 Interleukin-1 $\beta$

	Kontrolle	LPS	Orange $1,5 \cdot 10^{-3}\%$	Reduk. (%)	LPS	Orange $1,5 \cdot 10^{-4}\%$	Reduk. (%)
<b>N</b>	11	9	9		11	11	
<b>Mittelwert</b>	242,79	1336,41	1322,25	-1,1	1425,26	1181,41	-17,1
<b>Standard- fehler</b>	$\pm 114,16$	$\pm 229,52$	$\pm 277,25$		$\pm 208,07$	$\pm 222,82$	
<b>Median</b>	50,78	1183,98	1230,64	3,9	1287,16	1220,2	-5,2
<b>Minimum</b>	26,64	412,69	379,14		412,69	77,58	
<b>Maximum</b>	788,49	2543,49	3049		2543,49	2328,85	

Tabelle 15 Reduktion der zellulären IL-1 $\beta$  Freisetzung durch Orangenöl

Die Interleukin-1 $\beta$ - Freisetzung aus Monozyten blieb auch bei höchsten Orangenölkonzentrationen ( $1,5 \cdot 10^{-3}\%$ ) unbeeinflusst (Reduktion von durchschnittlich 1336 pg/ml auf 1322 pg/ml).

Eine Ölkonzentration von  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  reduzierte die Interleukin-1 $\beta$ - Freisetzung um 17,1% (von 1425 pg/ml auf 1181 pg/ml, nicht signifikant,  $p=0,433$ ).

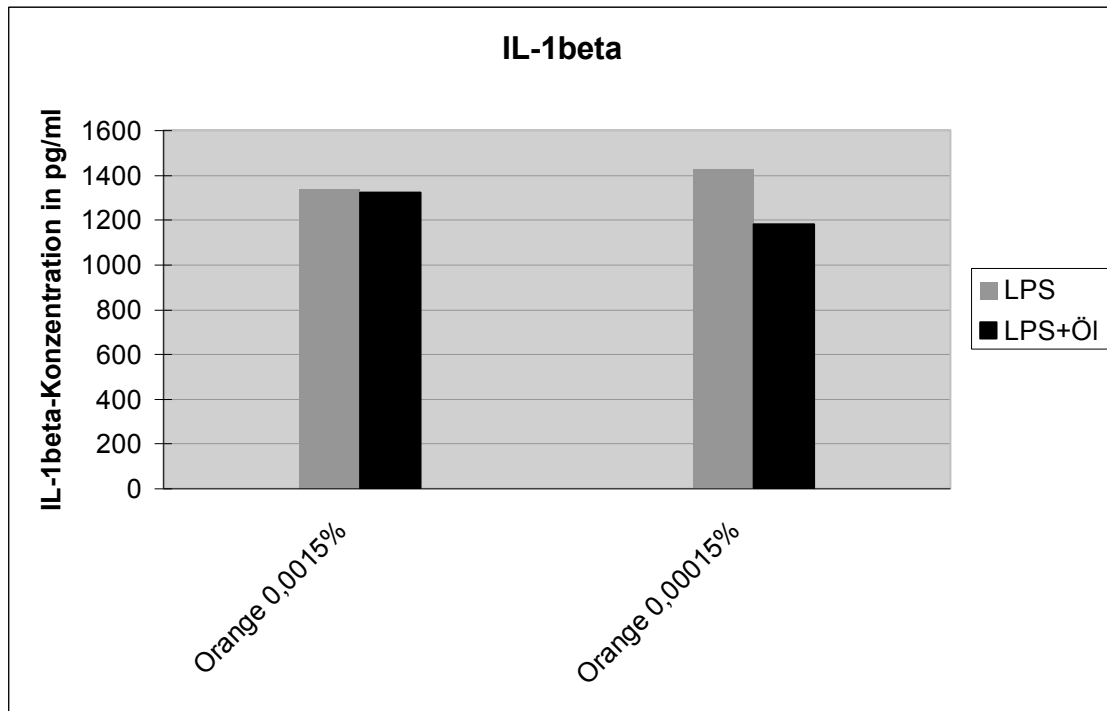


Abbildung 13 IL-1 $\beta$ -Konzentrationen (pg/ml) ohne und mit Orangenöl ( $1,5 \cdot 10^{-3}\%$ ,  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$ )

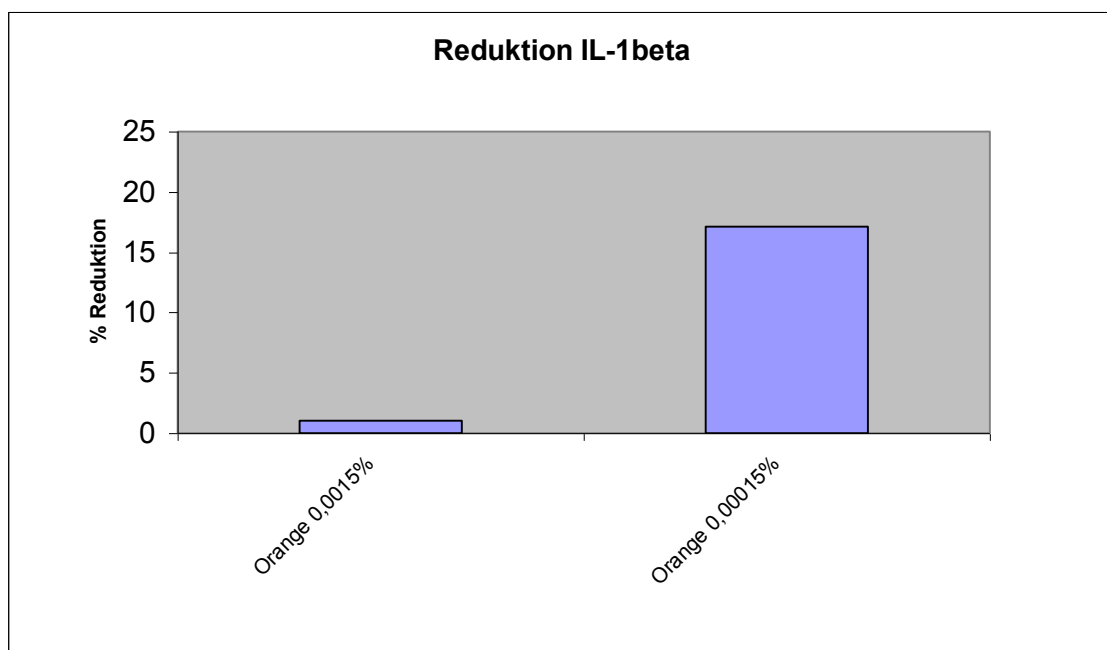


Abbildung 14 IL-1 $\beta$ - Reduktion (%) durch Orangenöl  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$

### 4.6.3 Tumornekrosefaktor $\alpha$

	n	Mittelwert	Standard- fehler	Median	Minimum	Maximum
<b>Kontrolle</b>	9	1313,2	$\pm 629,77$	694,89	253,89	6172,14
<b>LPS</b>	7	5052,16	$\pm 1070$	4042,52	1766,83	8392,17
<b>Orange <math>1,5 \cdot 10^{-3}\%</math></b>	7	5061,26	$\pm 1023,1$	5059,8	1751,25	8396,45
<b>Reduktion (%)</b>		<b>0,18</b>		25,16		
<b>LPS</b>	9	5432,26	$\pm 856,73$	6438,03	1766,83	8392,17
<b>Orange <math>1,5 \cdot 10^{-4}\%</math></b>	9	5713,94	$\pm 994,9$	5419,16	1929,22	10332,3
<b>Reduktion (%)</b>		<b>5,19</b>		-15,83		
<b>LPS</b>	6	4691,23	$\pm 1191,83$	3452,11	1766,83	8392,17
<b>Orange <math>1,5 \cdot 10^{-5}\%</math></b>	6	5500,11	$\pm 1265,31$	4258,2	2819,99	9661
<b>Reduktion (%)</b>		<b>17,24</b>		23,35		
<b>LPS</b>	4	4497,1	$\pm 1124$	3452,11	2789,92	8294,25
<b>Orange <math>1,5 \cdot 10^{-6}\%</math></b>	4	4717,66	$\pm 1037,1$	4136,74	2523,41	8073,76
<b>Reduktion (%)</b>		<b>4,9</b>		19,83		

Tabelle 16 Reduktion der zellulären TNF- $\alpha$ - Freisetzung durch Orangenöl

Auch die zelluläre TNF- $\alpha$ - Freisetzung ließ sich durch Orangenöl nicht beeinflussen. Bei Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$ ,  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-6}\%$  blieb die LPS-induzierte Ausschüttung nahezu konstant. Im Testansatz mit einer Ölkonzentration von  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  kam es sogar zu einem Anstieg der TNF- $\alpha$ - Freisetzung um 17,24% im Vergleich zum Ansatz ohne Zugabe von Orangenöl, was möglicherweise sogar auf einen proinflammatorischen Effekt hinweisen könnte.

## 4.7 Antiinflammatorische Wirkung von Myrtol N

### 4.7.1 Interleukin-6

	n	Mittelwert	Standard- fehler	Median	Minimum	Maximum
<b>Kontrolle</b>	12	5746,88	±2804,71	1718,08	71,94	28537,1
<b>LPS</b>	9	19681,43	±3071,03	21093,3	7072,7	33662,8
<b>Myrtol 1,5*10<sup>-3</sup>%</b>	9	18743,73	±2944,7	20978,6	6795,05	33128,7
<b>Reduktion (%)</b>		<b>-4,76</b>		-0,54		
<b>LPS</b>	12	17443,21	±2577	13430,88	7072,7	33662,8
<b>Myrtol 1,5*10<sup>-4</sup>%</b>	12	16952,92	±2520,79	15160	5921,25	32894,4
<b>Reduktion (%)</b>		<b>-2,81</b>		12,87		
<b>LPS</b>	6	19801,67	±3535,75	22427,48	7072,7	32894,4
<b>Myrtol 1,5*10<sup>-5</sup>%</b>	6	18411,43	±3153,31	22282,55	5895,5	25154,9
<b>Reduktion (%)</b>		<b>-7,02</b>		-0,65		

Tabelle 17 Reduktion der zellulären IL-6- Freisetzung durch Myrtol N

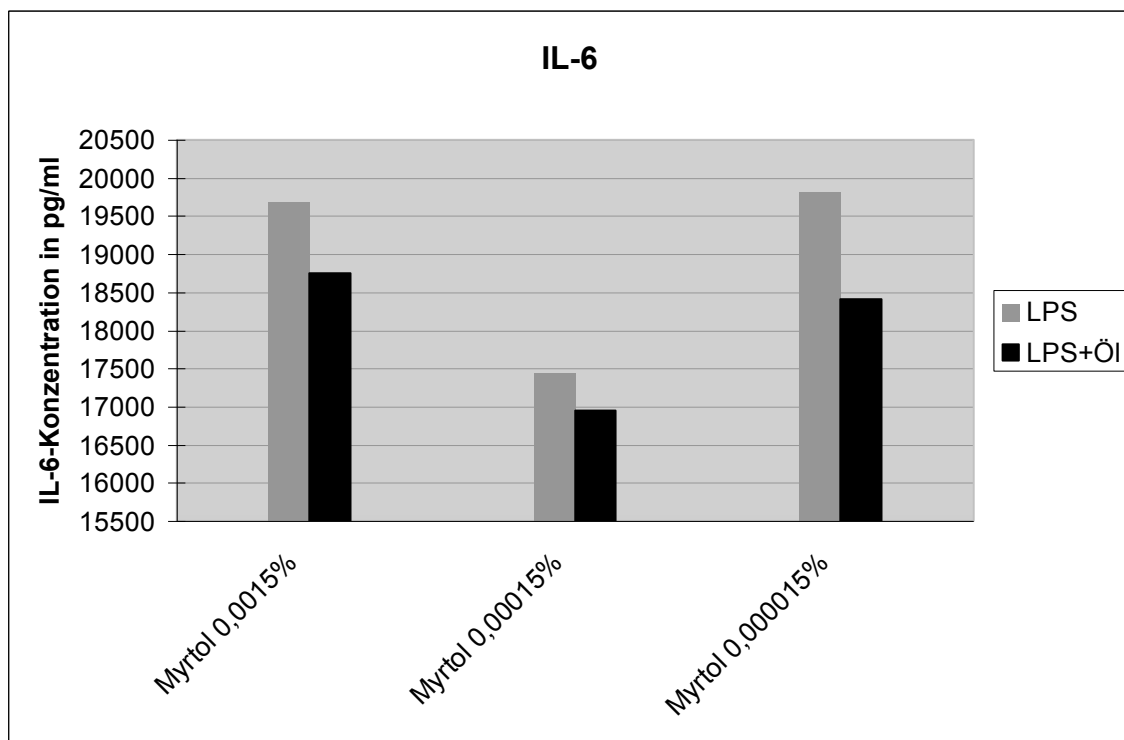


Abbildung 15 IL-6-Konzentrationen (pg/ml) ohne und mit Myrtol N (1,5\*10<sup>-3</sup> - 1,5\*10<sup>-5</sup>%)

In Versuchsreihen mit Myrtol N ergab sich keine statistisch signifikante Senkung der IL-6- Freisetzung. Es wurde eine Zytokinreduktion von 4,76%, 2,81% und 7,02% durch Zugabe von Myrtol N in den Konzentrationen 0,0015%, 0,00015% und 0,000015% erzielt. Im t-Test ergaben sich p-Werte von 0,828, 0,893 und 0,775.

#### 4.7.2 Interleukin -1 $\beta$

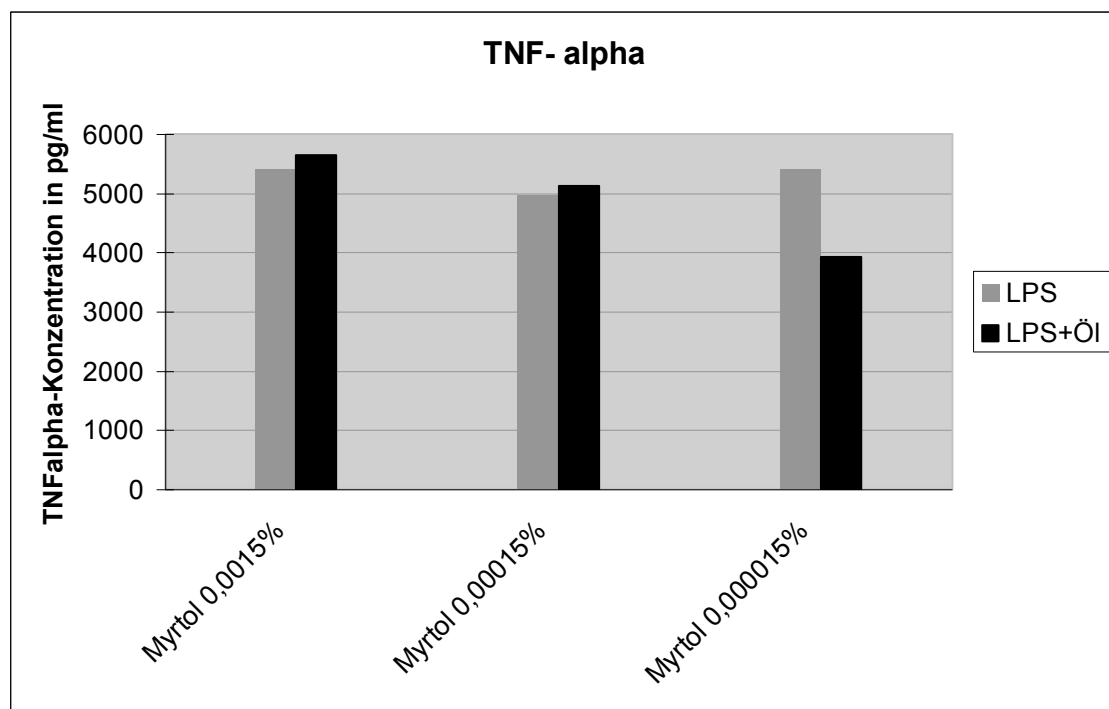
	n	Mittelwert	Standard- fehler	Median	Minimum	Maximum
<b>Kontrolle</b>	11	555,65	322,51	292,17	9,54	2334,3
<b>LPS</b>	9	1451,07	252,27	1610,3	449,05	2828,8
<b>Myrtol 1,5*10<sup>-3</sup>%</b>	9	1398,02	277,68	1296,92	393,37	2944,51
<b>Reduktion (%)</b>		<b>-3,66</b>		<b>-19,46</b>		
<b>LPS</b>	11	1313,48	224,01	1176,73	449,05	2828,8
<b>Myrtol 1,5*10<sup>-4</sup>%</b>	11	1275,23	220,03	1294,27	372,62	2521,58
<b>Reduktion (%)</b>		<b>-2,91</b>		<b>9,99</b>		
<b>LPS</b>	6	1851,36	227,26	1716,7	1176,73	2828,8
<b>Myrtol 1,5*10<sup>-5</sup>%</b>	6	1975,95	230,54	1889,07	1334,74	2944,51
<b>Reduktion (%)</b>		<b>6,73</b>		<b>10,04</b>		

Tabelle 18 Reduktion der zellulären IL-1 $\beta$ - Freisetzung durch Myrtol N

Auch bezüglich der IL-1 $\beta$ - Werte konnte Myrtol N keinen reduzierenden Effekt erzielen. Bei Konzentrationen von 1,5\*10<sup>-3</sup>% bis 1,5\*10<sup>-5</sup>% blieb die Zytokinfreisetzung nahezu konstant.

4.7.3 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ 

	n	Mittelwert	Standard- fehler	Median	Minimum	Maximum
Kontrolle	13	1459,93	$\pm 461,67$	758,03	120,44	4749,13
LPS	10	5408	$\pm 1310,5$	3694,7	969,76	15387,73
Myrtol $1,5 \cdot 10^{-3}\%$	10	5650,15	$\pm 1633,14$	4256,36	618,3	18797,78
Reduktion (%)		<b>4,48</b>		15,2		
LPS	13	4957,66	$\pm 1047,05$	3562,78	969,76	15387,73
Myrtol $1,5 \cdot 10^{-4}\%$	13	5121,71	$\pm 1230,12$	4120,73	377,23	16932,54
Reduktion (%)		<b>3,31</b>		15,66		
LPS	10	5408	$\pm 1310,5$	3694,7	969,76	15387,73
Myrtol $1,5 \cdot 10^{-5}\%$	10	3925,24	$\pm 763,59$	3264,18	505,4	8651,4
Reduktion (%)		<b>-27,42</b>		-11,65		

Tabelle 19 Reduktion der zellulären TNF- $\alpha$ - Freisetzung durch Myrtol NAbbildung 16 TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (pg/ml) ohne und mit Myrtol N ( $1,5 \cdot 10^{-3}$  -  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$ )

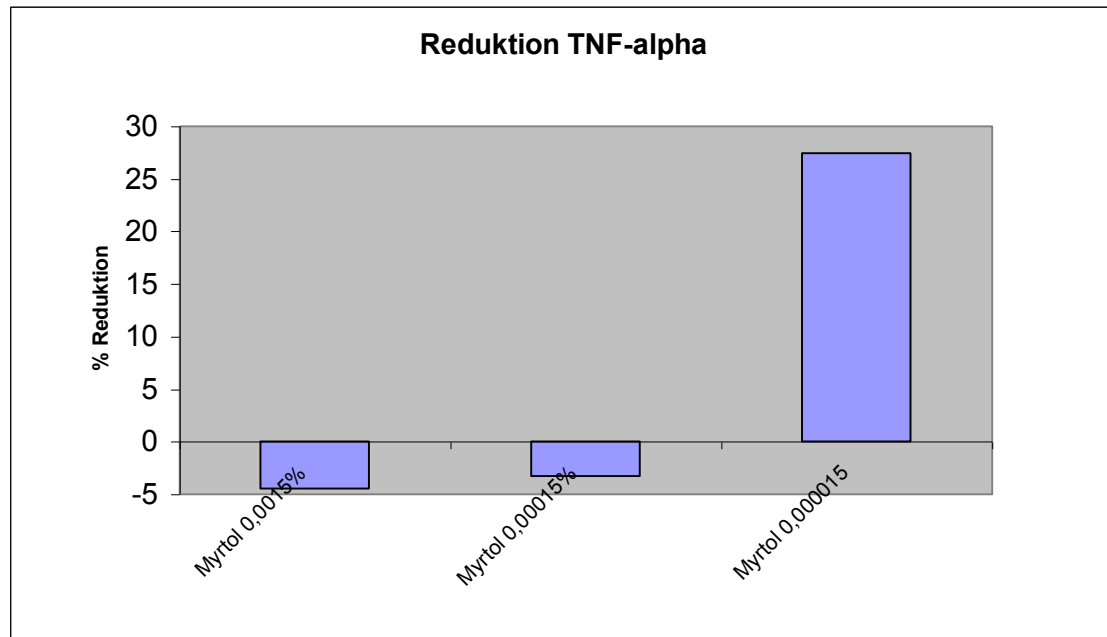


Abbildung 17 TNF- $\alpha$ - Reduktion (%) durch Myrtol  $1,5 \cdot 10^{-3}$  -  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$

Bei Myrtol- Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  blieb die TNF- $\alpha$ - Ausschüttung im Vergleich zum Ansatz ohne Öl annähernd konstant. Es erfolgte ein leichter Anstieg von 4,48% bzw. 3,31%.

Myrtol N in  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$ iger Konzentration senkte die extrazelluläre TNF- $\alpha$ - Menge in den ex vivo kultivierten Monozyten von COPD- Patienten um 27,5%. Die Zytokinfreisetzung verringerte sich von 5408 pg/ml auf 3925,24 pg/ml. Aufgrund kleiner Fallzahlen (n=10) errechnete sich keine statistische Signifikanz im t-Test (p=0,341).

	n	Mittelwert	p	Standard- fehler	Median	Minimum	Maximum
<b>Kontrolle</b>	13	1459,93		461,67	758,03	120,44	4749,13
<b>LPS -Kontrolle</b>	9	3969,89		1042,12	2932,81	145,94	10638,59
<b>Myrtol <math>10^{-5}\%</math> - Kontrolle</b>	9	2344,85		891,03	2110,42	-2171,96	6647,22
<b>Inhibition LPS-Effekt (%)</b>		<b>-40,93</b>	<b>0,253</b>				

Tabelle 20 Inhibition des LPS- Effekts bei TNF- $\alpha$  durch Myrtol N

Unter Vernachlässigung der TNF- $\alpha$ - Basisfreisetzung (Kontrollwert) ergab sich eine Inhibition des LPS- Effekts für Myrtol N in  $1,5 \cdot 10^{-5}$ %iger Konzentration von über 40%. Eine statistische Signifikanz wurde bei einer Fallzahl von  $n=9$  nicht erreicht ( $p=0,253$ ). Unter der Voraussetzung einer Ergebniskonstanz wäre rein rechnerisch erst bei einer Verdreifachung der Teilnehmerzahl ( $n=27$ ) das Signifikanzniveau mit  $p=0,037$  erreicht worden.

## 4.8 Antiinflammatorische Wirkung von Eukalyptusöl

### 4.8.1 Interleukin-6

	n	Mittelwert	Standard- fehler	Median	Minimum	Maximum
<b>Kontrolle</b>	8	2219,29	$\pm 922,97$	1149,43	89,66	7606,2
<b>LPS</b>	4	15779,61	$\pm 1598,65$	16384,75	11911,75	18437,2
<b>Eukal. <math>1,5 \cdot 10^{-3}</math>%</b>	4	17025	$\pm 2743,98$	17438,1	10946,7	22277,1
<b>Reduktion (%)</b>		<b>7,89</b>		6,43		
<b>LPS</b>	8	16284,04	$\pm 1960$	18303,4	5431,15	22798,4
<b>Eukal. <math>1,5 \cdot 10^{-4}</math>%</b>	8	16678,82	$\pm 2245,99$	18945,95	5249,4	23153,7
<b>Reduktion (%)</b>		<b>2,42</b>		3,51		
<b>LPS</b>	3	20574,23	$\pm 1319,22$	20691,3	18233	22798,4
<b>Eukal. <math>1,5 \cdot 10^{-5}</math>%</b>	3	19934,93	$\pm 1152,7$	20342,1	17766,2	21696,5
<b>Reduktion (%)</b>		<b>-3,11</b>		-1,69		

Tabelle 21 Reduktion der zellulären IL-6- Freisetzung durch Eukalyptusöl

Eukalyptusöl hatte keinen Effekt auf die Interleukin-6- Freisetzung aus Monozyten. Bei Konzentrationen von 0,0015% und 0,00015% kam es zu einem leichten Anstieg der Ausschüttung um 7,89% und 2,42%. Bei einer Ölkonzentration von 0,000015% wurde eine leichte Reduktion der IL-6- Freisetzung (-3,11%) festgestellt.



### 4.8.2 Interleukin-1 $\beta$

	Kontrolle	LPS	Eukal. 1,5*10 <sup>-3</sup> %	Reduk. (%)	LPS	Eukal. 1,5*10 <sup>-4</sup> %	Reduk. (%)
<b>N</b>	10	8	8		10	10	
<b>Mittelwert</b>	223,88	1186,58	1134,63	<b>-4,38</b>	1231,4	1148,17	<b>-6,76</b>
<b>Standard- fehler</b>	±109,48	±197,92	±186,99		±213,12	±217,69	
<b>Median</b>	137,64	1169,48	1079,8	-7,67	1169,48	983,62	-15,89
<b>Minimum</b>	10,98	449,05	474,64		449,05	387,17	
<b>Maximum</b>	719,61	2118,48	1881,8		2363,02	2363,02	

Tabelle 22 Reduktion der zellulären IL-1 $\beta$ - Freisetzung durch Eukalyptusöl

Die zelluläre IL-1 $\beta$ - Freisetzung wurde von Eukalyptusöl nicht signifikant reduziert. Ölkonzentrationen von 1,5\*10<sup>-3</sup>% und 1,5\*10<sup>-4</sup>% erreichten Reduktionen von -4,38% und -6,76% (p=0,851 und 0,788).

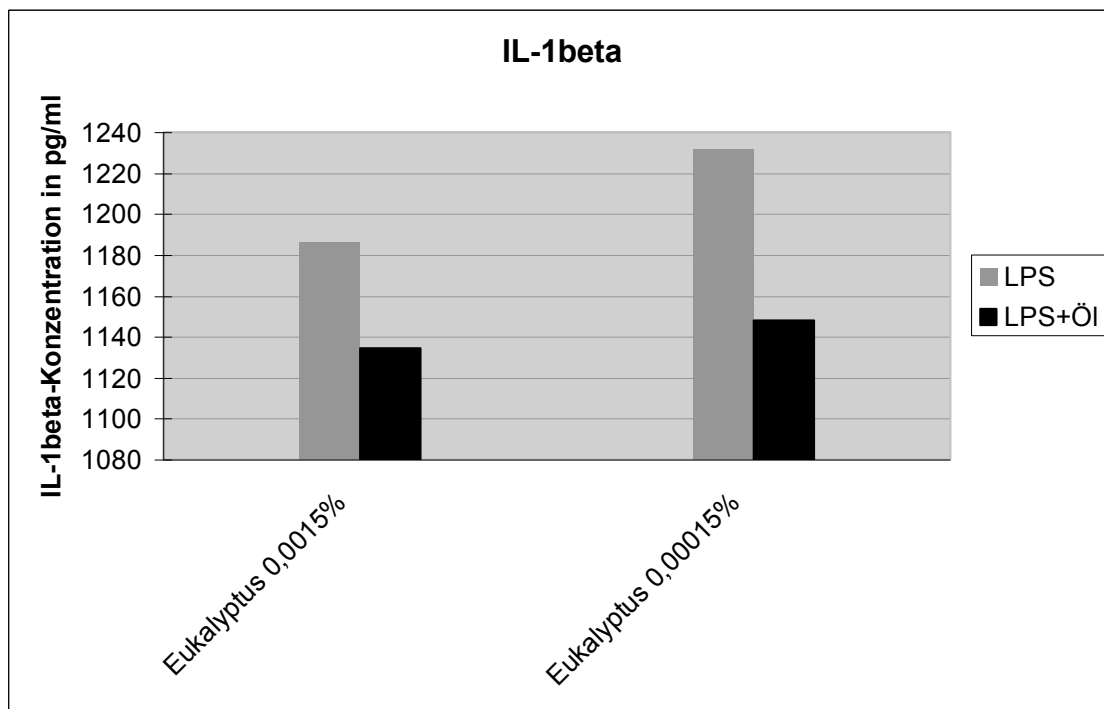


Abbildung 18 IL-1 $\beta$ -Konzentrationen (pg/ml) ohne und mit Eukalyptusöl (1,5\*10<sup>-3</sup>%, 1,5\*10<sup>-4</sup>%)

### 4.8.3 Tumornekrosefaktor- $\alpha$

	n	Mittelwert	Standard- fehler	Median	Minimum	Maximum
<b>Kontrolle</b>	10	408,04	$\pm 127,91$	253,89	97,63	1013,75
<b>LPS</b>	8	4997,91	$\pm 620,37$	4465,06	2861,7	8392,17
<b>Eukal. <math>1,5 \cdot 10^{-3}\%</math></b>	8	5949,26	$\pm 781,59$	5308,77	3449,87	10169,84
<b>Reduktion (%)</b>		<b>19,04</b>		18,9		
<b>LPS</b>	9	5009,17	$\pm 576,76$	4498,3	2861,7	8392,17
<b>Eukal. <math>1,5 \cdot 10^{-4}\%</math></b>	9	5913,96	$\pm 680,59$	5050,5	3586,06	9011,7
<b>Reduktion (%)</b>		<b>18,06</b>		12,28		
<b>LPS</b>	8	5073,03	$\pm 649,96$	4465,06	2861,7	8392,17
<b>Eukal. <math>1,5 \cdot 10^{-5}\%</math></b>	8	6432,94	$\pm 862,97$	5049,7	4394,09	10005,56
<b>Reduktion (%)</b>		<b>21,81</b>		13,09		

Tabelle 23 Reduktion der TNF- $\alpha$ - Freisetzung durch Eukalyptusöl

Eukalyptusöl steigerte sogar die TNF- $\alpha$ - Freisetzung. Bei allen getesteten Konzentrationen ( $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  bis  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$ ) wurde eine Erhöhung der Zytokinfreisetzung zwischen 18-22% bewirkt, die jedoch das statische Signifikanzniveau verfehlte ( $p=0,357, 0,326, 0,229$ ).

#### 4.9 Antiinflammatorische Wirkung von Orangenöl, Myrtol N und Eukalyptusöl im Vergleich

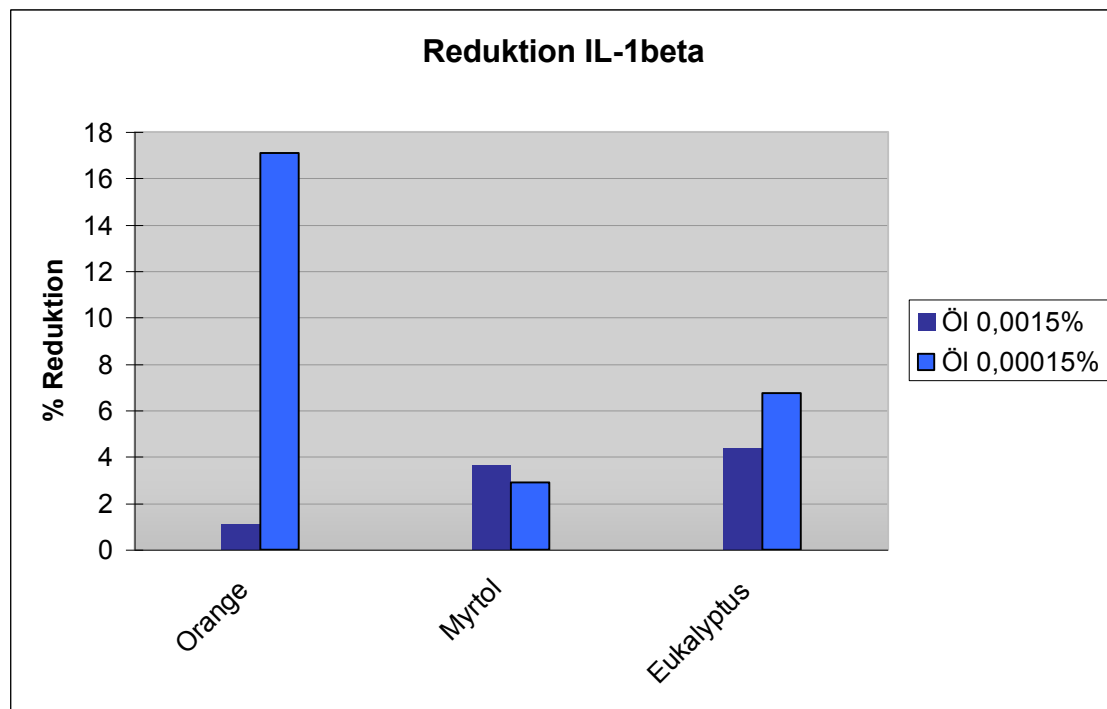


Abbildung 19 Wirkung der ätherischen Öle in den Konzentrationen  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  auf die IL-1 $\beta$ - Freisetzung

Alle getesteten Öle erbrachten hinsichtlich der Interleukin- 1 $\beta$ - Reduktion positive, jedoch keine signifikanten Ergebnisse. Dabei konnte durch Orangenöl in einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  die stärkste Reduktion (17,1%) erzielt werden. Der Effekt war dabei verglichen mit Myrtol bzw. Eukalyptusöl in gleicher Konzentration 6-fach bzw. 2,5-fach stärker.

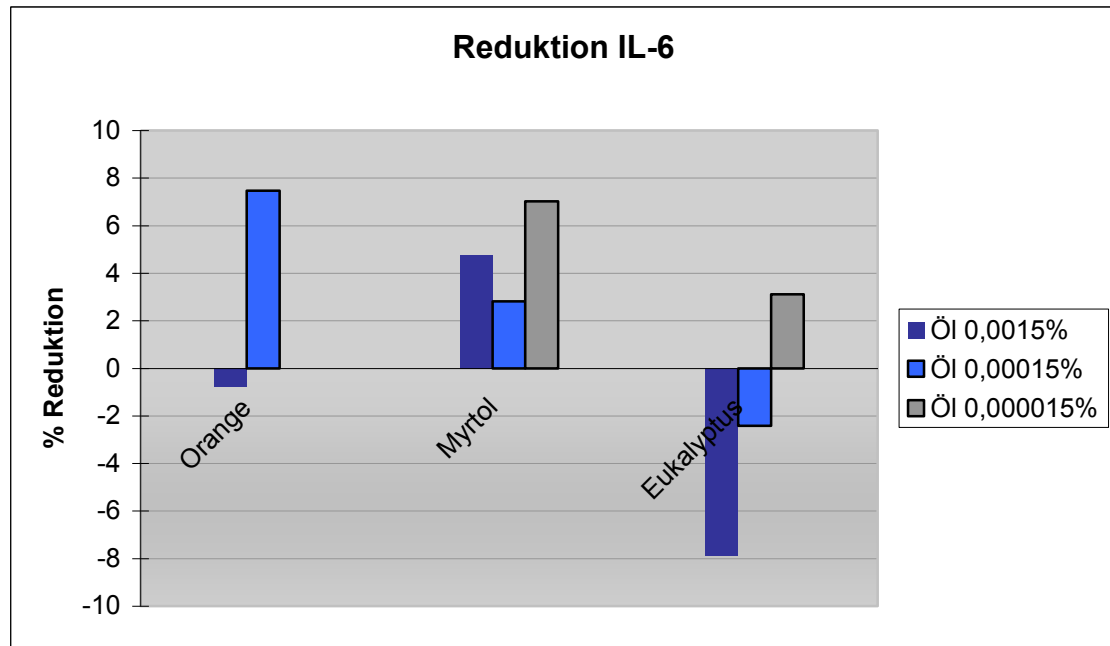


Abbildung 20 Wirkung der ätherischen Öle in den Konzentrationen  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$ ,  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  auf die IL-6- Freisetzung

Keines der getesteten Öle erreichte eine signifikante Hemmung der IL-6- Ausschüttung. Die Zytokinfreisetzung wurde am deutlichsten durch Orangenöl in einer Konzentration von 0,00015% gesenkt (7,46%). Aber auch Myrtol N besaß in allen getesteten Konzentrationen einen geringgradig reduzierenden Effekt. Unter Eukalyptusöl kam es dagegen zu einer leichten Zunahme der IL-6- Ausschüttung von 7,89% bzw. 2,42% bei Konzentrationen von 0,0015% respektive 0,00015%.

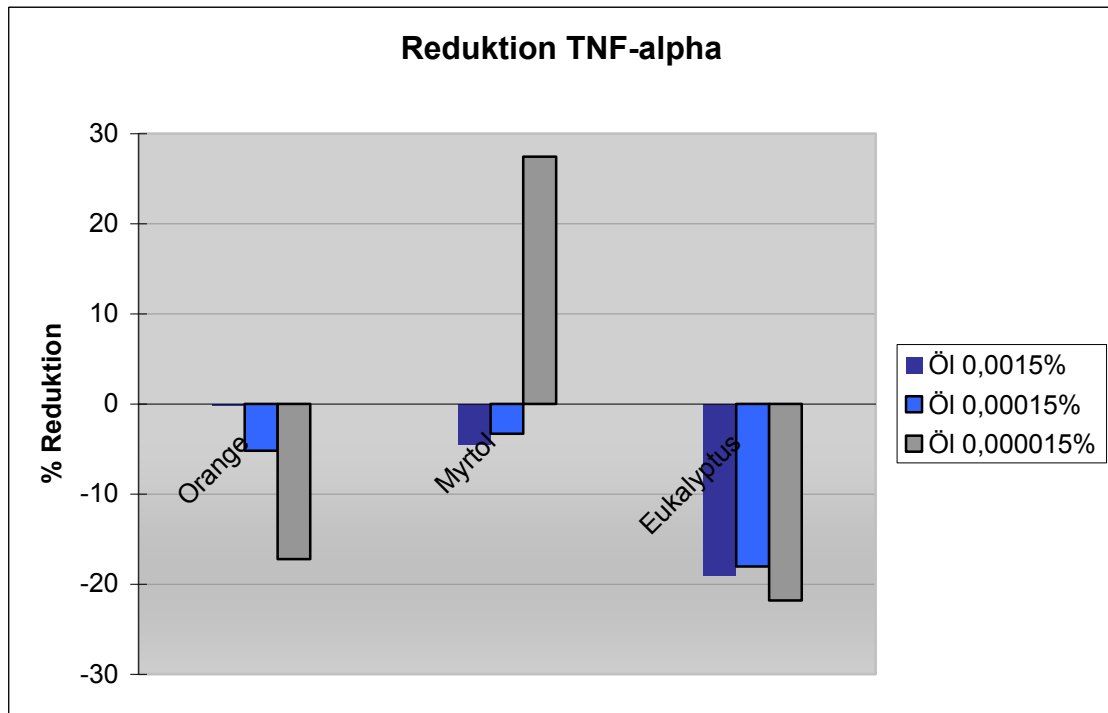


Abbildung 21 Wirkung der ätherischen Öle in den Konzentrationen  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$ ,  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  auf die TNF- $\alpha$ - Freisetzung

Nur Myrtol N war in der Lage die zelluläre TNF- $\alpha$ - Ausschüttung ab einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  zu senken (27,5%), wobei das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde. Eukalyptusöl scheint dagegen einen proinflammatorischen Effekt zu besitzen, da es in allen getesteten Konzentrationen TNF- $\alpha$  erhöht (19,04%, 18,06%, 21,81%).

## 5 Diskussion

Auf Grund einer im Rahmen der COPD zunehmend in den Vordergrund tretenden Rolle der systemischen Inflammation und mangelnder Therapiemöglichkeiten wurden in dieser Arbeit erstmals in vitro stimulierte Monozyten aus venösem Blut von Patienten hinsichtlich ihrer Zytokinreaktion auf die ätherische Öle Myrtol N, Orangenöl und Eukalyptusöl untersucht. Eine statistisch signifikante Hemmung der zellulären IL-1 $\beta$ -, IL-6- und TNF- $\alpha$ - Freisetzung wurde dabei von keinem der untersuchten Öle erreicht. IL-1 $\beta$  wurde durch alle Öle in den getesteten Konzentrationen tendenziell- jedoch nicht signifikant- reduziert. Eine leichte IL-6- Reduktion konnte durch Orangenöl und Myrtol N erreicht werden. Dagegen wurde TNF- $\alpha$  ausschließlich durch Myrtol N in einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  gesenkt, Orangen- und Eukalyptusöl führten dagegen zu einem Zytokinanstieg.

### Interleukin-1 $\beta$

Das proinflammatorische Zytokin IL-1 $\beta$  gilt als endogenes Pyrogen und ist an der Synthese der Akutphaseproteine durch Hepatozyten beteiligt. Außerdem bewirkt es die Freisetzung neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark und stimuliert die Ausschüttung weiterer Zytokine. Eine immunologische Funktion besteht in der Steigerung der IL-2- Freisetzung aus T- Zellen und Aktivierung von B- Lymphozyten. Erhöhte IL-1 $\beta$ - Werte werden bei einer Reihe entzündlicher Erkrankungen, beispielsweise dem Morbus Crohn und der rheumatoiden Arthritis, gefunden. Auch im Sputum von COPD- Patienten, insbesondere während der Exazerbation wurden erhöhte Konzentrationen nachgewiesen. (Chung 2001) Es wurde bereits eine IL-1 $\beta$ - senkende Wirkung für 1,8-Cineol in vitro nachgewiesen (Jürgens 1998a) . In der vorliegenden Arbeit wurde ein solcher Effekt für Eukalyptusöl, Orangenöl und Myrtol N an isolierten Monozyten nicht bestätigt. Jürgens et al. fanden im therapeutisch wirksamen Bereich von Cineol ( $10^{-5}$  Mol) eine zu über 80%ige Hemmung der IL-1 $\beta$ - Produktion ( $p=0,0009$ ) aus an gesunden Probanden gewonnenen, in vitro kultivierten Monozyten. Die antiinflammatorische Wirkung war dabei qualitativ mit Budesonid vergleichbar, während quantitativ eine vergleichbare Hemmung erst durch 100-fach höhere Konzentrationen von Cineol nachgewiesen wurde. In unserer Arbeit konnte eine maximale Hemmung der IL-1 $\beta$ - Produktion durch Orangenöl in einer Konzentration

von  $10^{-5}$  Mol erzielt werden (-17,1%,  $p=0,433$ ). Das Signifikanzniveau wurde zur Negativkontrolle allerdings nicht erreicht. Auch Myrtol N beeinflusste die Zytokinreduktion kaum (bei  $10^{-4}$  Mol bzw.  $10^{-5}$  Mol Verminderung um 3,66% bzw. 2,91%, siehe Abschnitt Ergebnisse). Ähnliche Resultate ergaben die Untersuchungen mit Eukalyptusöl (bei gleicher Konzentration IL-1 $\beta$ - Reduktionen von 4,38% und 6,76%).

Unser Ergebnis erstaunt zunächst, da der Versuchsaufbau dem von Jürgens et al. gleicht. Zwecks exakter Abstimmung wurde der Versuchsaufbau und das verwendete Zellisoliationsprotokoll sogar mehrfach detailliert mit Prof. Jürgens (Universitätsklinik Bonn) telefonisch abgestimmt. Der wesentliche Unterschied bestand in der Quelle der verwendeten mononukleären Zellen, da wir Zellen aus dem Blut von COPD-Patienten isolierten und Jürgens et al. Zellen von Gesunden verwendeten. Bei unseren COPD-Patienten lagen bereits in den Kontrollen ohne LPS- Stimulation erhöhten IL-1 $\beta$ - Werte vor ( $242,79 \pm 114,16$  pg/ml vs.  $5,367 \pm 406$  pg/ml bei Jürgens et al.). (Jürgens 1998a) In einer weiteren Untersuchung der gleichen Arbeitsgruppe um Jürgens et al. wurde bei einer Cineol- Konzentration von  $10^{-6}$  Mol eine IL-1 $\beta$ - Reduktion von 74% nachgewiesen. Diese Untersuchung erfolgte ebenfalls an isolierten Monozyten gesunder Probanden. (Jürgens 1998b)

Die Cineol-bedingte Reduktion der ex- vivo gemessenen AS-Metaboliten korrelierte mit einer Lungenfunktionsverbesserung bei Asthmapatienten ( $FEV_1$ : +23,7%,  $p= 0,0076$ , Atemwegswiderstand: 26,1%,  $p=0,005$ ), die 3 Tage mit 1,8-Cineol therapiert wurden. Die Produktion von LTB $_4$  (-40,3%,  $p=0,005$ ) und PGE $_2$  (-31,3%,  $p=0,1$ ) aus Monozyten ex- vivo wurde signifikant gehemmt. Dieses sehr positive Ergebnis ist in hohem Maße außergewöhnlich, da es vom Ausmaß dem einer mehrwöchigen inhalativen Kortikosteroidtherapie entspricht. Damit wäre die klinische Effektivität von Cineol beim Asthma dem topischer Kortikosteroide ebenbürtig (Barnes 1998) bzw. in Hinblick auf den Wirkungsbeginn weit überlegen. Allerdings wurde diese Untersuchung als offene Studie ohne Placebo- Kontrolle und Verblindung durchgeführt. Selbst bei gesunden Probanden wurde eine Hemmung der zellulären ex- vivo- Freisetzung von IL-1 $\beta$  von 144,6 pg/ml auf 80,3 pg/ml ( $p=0,0339$ ) nach oraler Therapie mit 1,8-Cineol über 3 Tage erzielt. (Jürgens 1998c)

2004 untersuchte die gleiche Arbeitsgruppe die Reduktion der Zytokinproduktion in kultivierten Lymphozyten und Monozyten von gesunden Probanden durch 1,8-Cineol ( $10^{-5}$  Mol) und fand für Monozyten eine signifikante Senkung von TNF- $\alpha$  (99%), IL-1 $\beta$  (84%), IL-6 (76%) und IL-8 (65%),  $p < 0,001$ . (Jürgens 2004) Somit bestätigte die Arbeitsgruppe ihre eigenen Ergebnisse. Eine für diese hier vorgelegte Arbeit durchgeführte Literaturrecherche (Pubmed) erbrachte leider, dass die Arbeiten mit diesen Ergebnissen von keiner anderen Arbeitsgruppe wiederholt und bestätigt wurden, so dass eine externe Bestätigung aussteht. Die Besonderheit dieser Doktorarbeit besteht also auch darin, die aus Bonn publizierten Ergebnisse, zumindest bezogen auf den gewählten in vitro/ex vivo Versuchsansatz, der identisch zu dem von Jürgens et al. gewählt wurde, an einer allerdings differenten Patienten- und Probandenauswahl, zu überprüfen. Interessanterweise ergaben sich dabei erwähnenswerte Ergebnisunterschiede, die einen, wie wir meinen, realistischeren Blick auf die antiinflammatorische Effektivität von ätherischen Ölen erlauben.

Auch unsere zu Jürgens et al zusätzlich durchgeführten Versuche mit verschiedenen Konzentrationen von Orangenöl, Eukalyptusöl und Myrtol N konnten diese Ergebnisse nicht bestätigen. Eine tendenzielle Senkung von IL-1 $\beta$  durch Orangenöl lässt eine antiinflammatorische Wirkung des Öls vermuten, konnte diese Mangels statistischer Sicherung allerdings nicht sichern

### Interleukin-6

IL-6 wirkt als Pyrogen und gilt als Hauptstimulator der Akutphaseproteine, v.a. von CRP, insbesondere bei einer inflammatorischen Stimulation mit LPS. IL-6 bewirkt die Proliferation und Reifung von T- und B- Lymphozyten und hemmt die Freisetzung von TNF- $\alpha$ . Bereits bei chronischem Zigarettenabusus liegt eine IL-6- Erhöhung verglichen mit Nichtrauchern in der BAL vor ( $5,3 \pm 3,2$  pg/ml vs.  $1,9 \pm 1,0$  pg/ml,  $p = 0,0003$ ). (Kuschner 1996) Bei COPD- Patienten mit einer erhöhten Exazerbationsrate ( $>3$ /Jahr) liegen die IL-6 –Sputumkonzentrationen gegenüber Patienten mit geringerer jährlicher Exazerbationsraten signifikant höher. (Wedzicha 2000)

Für die Hemmung von IL-6 durch ätherische Öle liegen deutlich weniger Studien vor. Jürgens et al. verglichen die spontane und PMA- bzw. LPS- induzierte Zytokinsekretion (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8) aus isolierten Lymphozyten und Monozyten



gesunder Probanden sowie die Effekte von 1,8-Cineol auf die Freisetzung in vitro. Dabei fanden sie bei den Monozyten gegenüber den Lymphozyten eine- sowohl spontan als auch LPS- induziert- deutlich höhere Sekretion von IL-6 und IL-8. Das Zytokinprofil stimulierter Monozyten (IL-8 > IL-6 > IL-1 $\beta$  > TNF- $\alpha$ ) unterschied sich dabei deutlich von dem PMA-stimulierter Lymphozyten (TNF- $\alpha$  > IL-1 $\beta$  > IL-4 > IL-5). 1,8-Cineol bewirkte in einer Konzentration von 10<sup>-5</sup> Mol eine Reduktion von IL-6 um 76%, p=0,001 (von 1667±119 auf 402±40 pg/20.000 Monozyten). Niedrigere Ölkonzentrationen (10<sup>-6</sup> bzw. 10<sup>-7</sup> Mol) hatten keinen Effekt auf die IL-6- Freisetzung (0%, p>0,999 bzw. -2%, p=0,72). (Jürgens 2004)

Inhalative Glukokortikoide bewirkten bei COPD- Patienten eine IL-6- Senkung im Serum. Diese korrelierte mit der gleichzeitigen CRP- Senkung, und wird über die Funktion des IL-6 als Akutphaseproteine erklärt. Inhalatives Glukokortikoid (Fluticason 500 $\mu$ g 2x täglich) reduzierte nach 2- wöchiger Anwendung die CRP- Freisetzung um 50% (95% CI, 9-73%) sowie die IL-6- Freisetzung signifikant um 26% (95% CI, 3,2-43,6%). (Paul Man 2005)

In der vorliegenden Arbeit wurde ein geringgradig reduzierender Effekt durch Myrtol N in den Konzentrationen 10<sup>-4</sup> -10<sup>-6</sup> Mol von 4,76%, 2,81% und 7,02% nachgewiesen, wobei keine statistische Signifikanz erreicht wurde. Die stärkste Hemmung (-7,5%) erfolgte durch Orangenöl (10<sup>-5</sup> Mol). Eukalyptusöl führte dagegen zu einer leichten Zunahme der IL-6- Freisetzung. Eine eindeutige Reduktion wurde durch keines der Öle nachgewiesen, wobei kleine Fallzahlen das Erreichen eines Signifikanzniveaus erschwerten. Die von uns gewählte Fallzahl orientierte sich aber an der von Jürgens et al. Auch in Bezug auf die IL-6 –Messungen konnten wir die Ergebnisse aus Bonn nicht bestätigen.

#### Tumornekrosefaktor- $\alpha$

Das proinflammatorische Zytokin TNF- $\alpha$  besitzt eine zentrale Rolle in allen Entzündungsvorgängen. Die Sekretion, vor allem aus Monozyten und Makrophagen, wird durch IL-1, GM-CSF und IFN- $\gamma$  stimuliert. Es steigert die Rekrutierung mononukleärer Zellen durch die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und aktiviert NF- $\kappa$ B, einen Transkriptionsfaktor, der die Sekretion von IL-8 verstärkt. Im Rahmen der COPD fördert TNF- $\alpha$  durch verstärkte Freisetzung von MMP-9

Remodellingvorgänge und die Emphysementstehung. Zigarettenrauch und viele andere externe Noxen und Proteine (Bakterien, Viren etc.) verstärken die TNF- $\alpha$ -Freisetzung bei COPD- Patienten. Auch systemische Effekte der COPD, beispielsweise die pulmonale Kachexie, die mit einer schlechteren Prognose (erhöhte Mortalität) einhergehen, sind mit erhöhten Serum-TNF- $\alpha$ - Spiegeln assoziiert. (Beier 2005)

Im Hinblick auf Sekretolytika und Mukolytika ist eine systemische Hemmung von TNF- $\alpha$  sowie IL-1 1990 an isolierten humanen Monozyten nach LPS- Stimulation durch Ambroxol nachgewiesen worden. Die signifikante Senkung der Zytokinfreisetzung erfolgte bereits bei einer Konzentration von 10 $\mu$ Mol. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Hemmung der Bindung zwischen DNA und NF- $\kappa$ B durch Amboxol. (Bianchi 1990)

Auch 1,8-Cineol hemmt in vitro die TNF- $\alpha$ - Sekretion kultivierter Monozyten (Inkubationszeit 20 Stunden). Die LPS- stimulierten Zellen (10 $\mu$ g/ml) setzten bei einer Ölkonzentration von 10<sup>-7</sup> bzw. 10<sup>-6</sup> g/ml 76,7% bzw. 98,8% weniger TNF- $\alpha$  frei (p=0,0007 bzw. p=0,0001). Die durch IL-1 $\beta$  (1 $\mu$ g/ml) induzierte Zytokinfreisetzung wurde durch Cineol ebenfalls konzentrationsabhängig um 64,2% bzw. 97,8% reduziert (p=0,0108 bzw. p=0,0012). (Jürgens 1998b) In Ionomycin/ PMA-stimulierten Lymphozyten wurde die TNF- $\alpha$ - Freisetzung bei 10<sup>-6</sup> bzw. 10<sup>-5</sup> Mol signifikant um 16% bzw. 92% reduziert (p=0,037 bzw. p=0,0001). In LPS- stimulierten Monozyten wurde eine Reduktion von 77% bzw. 99% erreicht (p=0,0007 bzw. p=0,0001). Dabei wurde eine stärkere Wirkung des Öls auf kultivierte Monozyten als auf Lymphozyten gemessen. (Jürgens 2004)

Auch wir fanden bei den Zellen unserer COPD-Patienten einen TNF- $\alpha$ - senkenden Effekt, allerdings nur für Myrtol N in einer Konzentration von 10<sup>-6</sup> Mol (27,5%, p=0,341). Wegen der hohen Streubreite der Messwerte ergab sich jedoch bei uns kein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zum Ausgangswert. Durch Verdreifachung der Teilnehmerzahl auf n=27 hätte eine statistische Signifikanz erreicht werden können (p=0,037). Myrtol N in höheren Konzentrationen (10<sup>-4</sup> Mol, 10<sup>-5</sup> Mol) hatte keinen Einfluss auf die Zytokinproduktion isolierter Monozyten. In Untersuchungen mit Eukalyptusöl kam es sogar zu einem Anstieg der TNF- $\alpha$ -

Freisetzung in allen getesteten Konzentrationen um 18-22%. Auch Orangenöl hatte keine TNF- $\alpha$ - hemmende Wirkung.

Zur Absicherung des vergleichbaren Untersuchungsaufbaus, der experimentellen Untersuchungsfolge und der Ergebnisgüte wurden durch uns folgende Maßnahmen ergriffen bzw. durchgeführt:

- Mehrfache telefonische Rücksprache zu methodischen Detailfragen mit Prof. Jürgens (Universitätsklinik Bonn)
- Assayinterne Kontrollen und weitere Kontrollen, z.B. mikroskopische Kontrollen der Reinheit und Vitalität isolierter Zellen
- Doppelte Untersuchungen jedes Untersuchungsansatzes
- Genaue klinische Charakterisierung der untersuchten COPD-Patienten (entsprechend Leitlinie der Dt. Atemwegsliga und der Dt. Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin, Global Initiative for COPD (Vogelmeier 2007))

Im Folgenden werden weitere methodische Details diskutiert:

#### Allgemeine Fehler bei der Zytokinbestimmung

Die Zytokinbestimmung erfolgte aus den gewonnenen Überständen nach 20-stündiger Inkubation mit Hilfe kommerziell erworbener ELISA- Kits. Bei der Durchführung können verschiedene Fehler auftreten. Durch falsches Anmischen von Lösungen (Puffer, HRP- konjugiertes Streptavidin, Biotin- markierter Antikörper) und Standards können die Zellen geschädigt und Ergebnisse verfälscht werden. Zu starkes Erwärmen des Probenmaterials beim Auftauen oder mehrmaliges Auftauen und Wiedereinfrieren der Proben können ebenfalls zu einer Zerstörung der Zellen führen. Nichteinhalten der Inkubationszeiten, -temperaturen, und weiteren Bedingungen (z.B. Lichtverhältnisse, ausreichende Waschschrte), sowie fehlerhafte Bestückung der Mikrotiterplatten können falsche Ergebnisse produzieren. Die am Boden anhaftenden Antikörper können durch Waschschrte entfernt werden. Durch sorgfältiges Arbeiten beim Mischen und Auftragen der Lösungen unter Kontrolle des langjährig erfahrenen und geschulten Laborpersonals im Forschungslabor der Robert-Koch-Klinik, sowie durch Doppelbestimmungen, internen Assaykontrollen und durch die Standardisierung der

einzelnen experimentellen Schritte wurden in der vorliegenden Arbeit technische Fehler, die die Differenz zu den hier häufig zitierten Arbeiten (Jürgens et al) erklären könnten, praktisch ausgeschlossen.

#### Konzentrationsabhängigkeit

In den Versuchen wurden Ölkonzentrationen zwischen  $10^{-4}$  Mol und  $10^{-7}$  Mol getestet. Diese Konzentrationen entsprechen den Untersuchungen mit 1,8-Cineol an isolierten Monozyten gesunder Probanden von Jürgens et al., die Konzentrationen zwischen  $10^{-10}$  und  $10^{-4}$  Mol auf eine Hemmung des Arachidonsäuremetabolismus und der IL-1 $\beta$ -Produktion testeten und einen optimalen therapeutischen Plasmaspiegel von 0,15-1,5 $\mu$ g/ml (=  $10^{-6}$ -  $10^{-5}$  Mol) des Hauptinhaltsstoffes von Eukalyptusöl feststellten. (Jürgens 1998b)

Eine durch uns evt. fehlerhaft verwendete geringere Öl-Konzentration wurde durch intensives Mischen der Öl- RPMI- Suspension durch ein Vortex- Gerät mit anschließend unverzüglicher Verwendung, den genannten Wiederholungsmessungen und vielfache Kontrollen des Laborpersonals ausgeschlossen.

In den oben genannten Arbeiten von Jürgens et al. wurde stets eine starke Konzentrationsabhängigkeit der Zytokinfreisetzung festgestellt. Eine solche Abhängigkeit wurde in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen.

#### Zytotoxizität von Myrtol N, Orangenöl und Eukalyptusöl

Die mittels Trypanblau ermittelte Zytotoxizität lag in allen getesteten Konzentrationen ( $1,5 \cdot 10^{-3}$  bis  $1,5 \cdot 10^{-6}$ %) bei unter 20%. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Graßmann überein. Dabei wurden im Ansatz mit 0,5% und 0,25 % Eukalyptusöl, Myrtol N und Orangenöl im Vollblut weniger als 10% der Zellen geschädigt. Bei Untersuchungen mit aus Schweineblut isolierten Leukozyten starben ab einer Konzentration von 0,1% alle Zellen ab. Eine etwas höhere Zelltoxizität bei niedrigeren Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit wäre durch die 20-stündige Inkubation zu erklären. Bei Graßmann erfolgte im Ansatz mit Vollblut bzw. mit isolierten Leukozyten eine 30-bzw. 60-minütige Inkubation. (Graßmann 2000)

Auch die von Jürgens et al. durchgeführten in vitro Untersuchungen mit 1,8-Cineol an isolierten Monozyten bestätigen die gering zytotoxische Wirkung ätherischer Öle. Die

lichtmikroskopisch mittels Trypanblau bestimmte Vitalität der Monozyten lag nach Inkubation über 20 Stunden mit 1,8-Cineol in oben genannten Konzentrationen bei >95 bzw. >98%. (Jürgens 1998a)

Bei der Bestimmung der Toxizität der Öle bzw. Vitalität der Zellen können unterschiedliche Fehler auftreten. Es können bereits bei der Isolation der Monozyten durch die zahlreiche Zentrifugationsschritte Zellen zu Grunde gehen. Eine erhöhte Zellschädigung bei der Isolation in Vorversuchen (z.T. bis 50%) wurde durch Optimierung des pH-Wertes (Pufferung) aller verwendeten Lösungen auf <20% gesenkt. Nur ab einer Zellvitalität von >80% wurden die Monozyten verwendet. Nach 20-stündiger Inkubation im Kulturmedium RPMI + FKS + LPS und den zugesetzten Ölen in entsprechenden Konzentrationen erfolgte eine erneute Vitalitätsprüfung. Dabei wurde eine Zytotoxizität der Öle in allen getesteten Konzentrationen von <20% festgestellt. Die zu Jürgens et al. differente Vitalität der Monozyten nach Inkubation (>95 bzw. >98% bei Jürgens et al. vs. >80% bei uns) könnte eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse sein.

#### Resümee:

Eine antiinflammatorische Wirkung von Myrtol N, Orangenöl und Eukalyptusöl in vitro konnte durch diese Studie am Beispiel von Monozyten nicht nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen mit größerem Patientenkollektiv im Hinblick auf einen neuen Ansatz der antientzündlichen Therapie im Rahmen der COPD durch ätherische Öle erscheinen lediglich für Myrtol N bezüglich der TNF- $\alpha$ - Reduktion sinnvoll.

## 6 Zusammenfassung

### Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. med.

**Titel:** Hemmung der monozytären Zytokinproduktion (IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ ) durch die ätherische Öle Myrtol N, Orangenöl und Eukalyptusöl in vitro

**Eingereicht von:** Bettina Carolin Penzel, geb. Dölling  
Geboren am 08.07.1983 in Oelsnitz/ Vogtland

**Angefertigt an:** Robert- Koch- Klinik Leipzig  
Thoraxzentrum des Klinikums St. Georg

**Betreut von:** Prof. Dr. med. A. Gillissen

**Fertiggestellt im:** September 2009

**Einleitung:** Bei der COPD handelt es sich um eine nicht mehr vollständig reversible, typischerweise progrediente und meist durch jahrzehntelangen Zigarettenabusus verursachte Atemwegsobstruktion, die mit einer abnormalen Entzündungsreaktion der Atemwege und der Lunge assoziiert ist. Zunehmend wird die COPD als eine von der Lunge ausgehende systemische Erkrankung verstanden, die insbesondere in den schweren Erkrankungsstadien z.T. schwerwiegende extrapulmonale Affektionen nach sich zieht und mit einer abnormen systemischen Entzündungsreaktion verbunden ist. Knapp die Hälfte aller COPD- Patienten über 65 Jahre leiden an mindestens 3 weiteren chronischen Erkrankungen und 1/5 haben mehr als 5 weitere Erkrankungen (z.B. Muskelatrophie, pulmonale Kachexie, kardiovaskuläre Erkrankungen, Osteoporose). Monozyten und Alveolarmakrophagen wird eine Schlüsselrolle im Entzündungsgeschehen und der zellulären und humoralen Immunantwort zugeschrieben. Sie sezernieren eine Vielzahl verschiedener biologisch aktiver, immunmodulatorischer Substanzen, z.B. Zytokine (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ ),

Enzyme (Kollagenase, Elastase), Komplementfaktoren, Gerinnungsfaktoren und Plasmaproteine ( $\alpha_2$ - Makroglobulin,  $\alpha_1$ - Antiprotease), so dass sich die Suche nach einer verträglichen, antientzündlich wirkenden Substanz als logische therapeutische Konsequenz ergibt. Systemische Kortikosteroide haben nur einen Stellenwert in der Notfallmedizin, da bei längerer Anwendung die unerwünschten Wirkungen überwiegen bzw. sich der Therapieerfolg nicht von einem Placebopräparat unterscheidet. Als alternative Therapie wurden in letzter Zeit ätherische Öle bezüglich ihrer antientzündlichen Wirkung evaluiert. In der hier vorgelegten Arbeit wurde der Effekt der ätherischen Öle Myrtol N, Eukalyptusöl und Orangenöl auf die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$ ) von Monozyten getestet.

**Methodik:** Diese Untersuchung wurde als Vorläuferstudie im Sinne eines „proof of concept“ betrachtet und als offene, single- center Studie durchgeführt. Der primäre Endpunkt bestand in einer Reduktion der TNF- $\alpha$ -, IL-1 $\beta$ - und IL-6- Werte in Monozyten. Die Isolation der Monozyten erfolgte aus venösem Blut von COPD-Patienten (n=26) mittels Dichtegradient- Zentrifugation über NycoPrep. Anschließend wurden die Zellen mit LPS (10 $\mu$ g/ml) in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen von Myrtol N, Eukalyptus-, bzw. Orangenöl über 20 Stunden in vitro inkubiert. Aus den Kulturüberständen erfolgte die Zytokinbestimmung mittels ELISA.

**Ergebnisse:** Es wurden von Myrtol N, Eukalyptus- und Orangenöl Konzentrationen zwischen  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-6}\%$  eingesetzt. Die Zellvitalität wurde lichtmikroskopisch durch Trypanblau- Exklusion bestimmt und lag bei allen Konzentrationen bei  $>80\%$ . Orangenöl: Messreihen mit Orangenöl zeigten bei einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  eine durchschnittliche Reduktion der IL-6- Freisetzung um 7,5% (nicht signifikant gegenüber Ausgangswert,  $p=0,513$ ). Die zelluläre IL-6-, IL-1 $\beta$ - und TNF- $\alpha$ - Ausschüttung blieb auch bei höchsten Orangenölkonzentrationen ( $1,5 \cdot 10^{-3}\%$ ) unbeeinflusst (durchschnittliche IL-1 $\beta$ - Reduktion von 1336 pg/ml auf 1322 pg/ml). Bei  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  reduzierte sich die IL-1 $\beta$ - Freisetzung um 17,1% (von 1425 pg/ml auf 1181 pg/ml,  $p=0,433$ ). Im Testansatz mit einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  kam es im Vergleich zum Ansatz ohne Zugabe von Orangenöl sogar zu einem Anstieg der TNF- $\alpha$ - Freisetzung um 17,24%. Myrtol N: Myrtol N beeinflusste die monozytäre IL-6- Freisetzung nicht: Zytokinreduktionen von 4,76%, 2,81% und 7,02% in den Konzentrationen 0,0015%, 0,00015% und 0,000015% ( $p= 0,828, 0,893$  und  $0,775$ ). Auch bezüglich der IL-1 $\beta$ - Werte konnte Myrtol N keinen reduzierenden Effekt

erzielen. Bei Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  bis  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  ergab sich eine Reduktion um 3,66%, 2,91% bzw. Steigerung um 6,73%. Bei einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  wurde die extrazellulär sezernierte TNF- $\alpha$ - Menge um 27,5% gesenkt ( $p=0,341$ ), was einer Reduktion der Zytokinfreisetzung von 5408 pg/ml auf 3925,24 pg/ml entsprach. Die zelluläre TNF- $\alpha$ - Ausschüttung bei Myrtol- Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  blieb im Vergleich zum Ansatz ohne Öl annähernd konstant. Es erfolgte ein leichter Anstieg von 4,48% bzw. 3,31%. Eukalyptusöl: Eukalyptusöl hatte keinen Effekt auf die monozytäre IL-6- Freisetzung. Bei Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  zeigte sich ein kleiner Anstieg der Ausschüttung um 7,89% und 2,42% und bei  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  eine leichte Reduktion um -3,11%. IL-1 $\beta$  reduzierte sich bei Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  nur leicht um -4,38% respektive -6,76% ( $p=0,851$  und  $0,788$ ), während die Monozyten zur TNF- $\alpha$ - Freisetzung bei Konzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  bis  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  zwischen 18% und 22% tendenziell stimuliert wurden ( $p=0,357$ ,  $0,326$ ,  $0,229$ ).

**Schlussfolgerung:** Eine signifikante Reduktion der Zytokinfreisetzung konnte durch keines der getesteten Öle erreicht werden. Während alle Öle in der Lage waren die extrazelluläre IL-1 $\beta$ - Konzentration leicht zu senken (am stärksten durch Orangenöl  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  um 17,1%), wurde TNF- $\alpha$  ausschließlich durch Myrtol in einer Konzentration von  $1,5 \cdot 10^{-5}\%$  reduziert. Myrtolkonzentrationen von  $1,5 \cdot 10^{-3}\%$  und  $1,5 \cdot 10^{-4}\%$  sowie Eukalyptus- und Orangenöl bewirkten dagegen eine erhöhte TNF- $\alpha$ -Freisetzung. IL-6 konnte tendenziell durch Orangenöl und Myrtol N reduziert werden, wohingegen Eukalyptusöl zu einer verstärkten Zytokinfreisetzung führte. Ein eindeutiger antiinflammatorischer Effekt der Öle konnte in dem hier auf Monozyten basierenden Zellmodell durch die Arbeit nicht verifiziert werden.



## 7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung der COPD- Definition.....	2
Abbildung 2	Elektronenmikroskopisches Bild des physiologischen Sekretstroms über die Zilien (Morgenroth 2007).....	5
Abbildung 3	Breitflächiger Zilienverlust am Bronchialepithel bei chronischer Bronchitis (Morgenroth 1987).....	6
Abbildung 4	Schematische Darstellung der Rolle von alveolären Makrophagen im Rahmen der COPD aus (Barnes 2003).....	8
Abbildung 5	Sekretion, Antigenpräsentation und Stimulation der Monozyten nach (Dohle 2004)....	17
Abbildung 6	Zell- und Zytokininteraktion der Inflammation im Rahmen der COPD (Chung 2001) .	20
Abbildung 7	Einfluss verschiedener Faktoren auf die Lebensqualität und die Psyche bei COPD .....	25
Abbildung 8	1,8- Cineol (Pohl Boskamp 2005).....	43
Abbildung 9	(+)-Limonen (Pohl Boskamp 2005).....	45
Abbildung 10	Sandwich- ELISA .....	57
Abbildung 11	IL-6-Konzentrationen (pg/ml) ohne und mit Orangenöl ( $1,5 \cdot 10^{-3}$ , $1,5 \cdot 10^{-4}$ %).....	65
Abbildung 12	IL-6- Reduktion (%) durch Orangenöl $1,5 \cdot 10^{-3}$ % und $1,5 \cdot 10^{-4}$ %.....	66
Abbildung 13	IL-1 $\beta$ -Konzentrationen (pg/ml) ohne und mit Orangenöl ( $1,5 \cdot 10^{-3}$ %, $1,5 \cdot 10^{-4}$ %) .....	67
Abbildung 14	IL-1 $\beta$ - Reduktion (%) durch Orangenöl $1,5 \cdot 10^{-3}$ % und $1,5 \cdot 10^{-4}$ %.....	67
Abbildung 15	IL-6-Konzentrationen (pg/ml) ohne und mit Myrtol N ( $1,5 \cdot 10^{-3}$ - $1,5 \cdot 10^{-5}$ %) .....	69
Abbildung 16	TNF- $\alpha$ -Konzentrationen (pg/ml) ohne und mit Myrtol N ( $1,5 \cdot 10^{-3}$ - $1,5 \cdot 10^{-5}$ %) .....	71
Abbildung 17	TNF- $\alpha$ - Reduktion (%) durch Myrtol $1,5 \cdot 10^{-3}$ - $1,5 \cdot 10^{-5}$ %.....	72
Abbildung 18	IL-1 $\beta$ -Konzentrationen (pg/ml) ohne und mit Eukalyptusöl ( $1,5 \cdot 10^{-3}$ %, $1,5 \cdot 10^{-4}$ %) ...	74
Abbildung 19	Wirkung der ätherischen Öle in den Konzentrationen $1,5 \cdot 10^{-3}$ % und $1,5 \cdot 10^{-4}$ % auf die IL-1 $\beta$ - Freisetzung .....	76
Abbildung 20	Wirkung der ätherischen Öle in den Konzentrationen $1,5 \cdot 10^{-3}$ %, $1,5 \cdot 10^{-4}$ % und $1,5 \cdot 10^{-5}$ % auf die IL-6- Freisetzung .....	77
Abbildung 21	Wirkung der ätherischen Öle in den Konzentrationen $1,5 \cdot 10^{-3}$ %, $1,5 \cdot 10^{-4}$ % und $1,5 \cdot 10^{-5}$ % auf die TNF- $\alpha$ - Freisetzung .....	78

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Risikofaktoren und Verursacher für die Entstehung einer COPD (American Thoracic Society 2004).....	3
Tabelle 2	Differentialdiagnose Asthma und COPD (Vogelmeier 2007) .....	14
Tabelle 3	Schweregradeinteilung der COPD nach (GOLD 2006) (Vogelmeier 2007) .....	14
Tabelle 4	Leukozyten im normalen Blutbild (Erwachsener) .....	16
Tabelle 5	Die bei der COPD pathophysiologisch bedeutsamsten Zytokine (Chung 2001) .....	19
Tabelle 6	Berechnung des BODE- Index (Celli 2000).....	27
Tabelle 7	Stufenplan für die Langzeittherapie der COPD nach (Vogelmeier 2007) .....	34
Tabelle 8	Symptomatik und Schweregrade der akuten Exazerbation sowie schweregradorientierte Therapie (Vogelmeier 2007).....	35
Tabelle 9	Basisdaten der Studienteilnehmer .....	60
Tabelle 10	Medikamentöse Therapie der Studienteilnehmer .....	61
Tabelle 11	Lungenfunktionsparameter der Studienteilnehmer .....	62
Tabelle 12	Laborparameter der Studienteilnehmer .....	63
Tabelle 13	Umrechnungstabelle .....	64
Tabelle 14	Reduktion der zellulären IL-6- Freisetzung durch Orangenöl .....	64
Tabelle 15	Reduktion der zellulären IL-1 $\beta$ Freisetzung durch Orangenöl .....	66
Tabelle 16	Reduktion der zellulären TNF- $\alpha$ - Freisetzung durch Orangenöl .....	68
Tabelle 17	Reduktion der zellulären IL-6- Freisetzung durch Myrtol N .....	69
Tabelle 18	Reduktion der zellulären IL-1 $\beta$ - Freisetzung durch Myrtol N .....	70
Tabelle 19	Reduktion der zellulären TNF- $\alpha$ - Freisetzung durch Myrtol N .....	71
Tabelle 20	Inhibition des LPS- Effekts bei TNF- $\alpha$ durch Myrtol N .....	72
Tabelle 21	Reduktion der zellulären IL-6- Freisetzung durch Eukalyptusöl .....	73
Tabelle 22	Reduktion der zellulären IL-1 $\beta$ - Freisetzung durch Eukalyptusöl .....	74
Tabelle 23	Reduktion der TNF- $\alpha$ - Freisetzung durch Eukalyptusöl .....	75

## 9 Literatur

- Abramson, S. L., Malech, H.L., Galin, J.I. (1991). Neutrophils. The lung, scientific foundation. R. Press. New York, Crystal, R.G., West, J.B. : 553-563.
- Adcock, I. M., Brown, C.R., Kwon, O.J., Barnes, P.J. (1994). "Oxidative stress induces NF- $\kappa$ B DNA binding and inducible NOS mRNA in human epithelial cells." Biochem Biophys Res Commun **199**: 1518–1524.
- Agusti, A., Morla, M., Sauleda, J., et al. (2004). "NF-kappaB activation and iNOS upregulation in skeletal muscle of patients with COPD and low body weight." Thorax **59**: 483–487.
- Agusti, A. G., Noguera, A., Sauleda, J., Sala, E., Pons, J., Busquets, X. (2003). "Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **21**: 347-360.
- Agusti, A. G., Sauleda, J., Miralles, C., et al. (2002). "Skeletal muscle apoptosis and weight loss in chronic obstructive pulmonary disease. ." Am J Respir Crit Care Med **166**: 485–489.
- Aldonyte, R., Jansson, L., Piitulainen, E., Janciauskiene, S. (2003). "Circulating monocytes from healthy individuals and COPD patients." Respiratory Research **4**.
- American Thoracic Society, E. R. S. (2004). Standarts for the Diagnosis and Management of Patients with COPD.
- Andreassen, H., Vestbo, J. (2003). "Chronic obstructive pulmonary disease as a systemic disease: an epidemiological perspective." Eur Respir J **46**: 2s–4s.
- Barnes, P. (2000). "Chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **343**: 269–280.
- Barnes, P. J. (1998). "Efficacy of inhaled corticosteroids in asthma." J.Allergy Clin.Immunol **102**: 531-538.
- Barnes, P. J., Shapiro, S.D., Pauwels, R.A. (2003). "Chronic obstructive pulmonary disease: molecular and cellular mechanisms." Eur Respir J **22**: 672-688.
- Beier, J., Beeh, K.M. (2005). "Perspektiven der antiinflammatorischen Pharmakotherapie der COPD: Neutrophile Granulozyten im Fokus." Pneumologie **59**: 770-782.
- Bernard, S., LeBlanc, P., Whittom, F., et al. (1998). "Peripheral muscle weakness in patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **158**: 629–634.
- Berry, J. K., Baum, C. (2004). "Reversal of chronic obstructive pulmonary disease-associated weight loss: are there pharmacological treatment options?" Drugs **64**: 1041-1052.
- Beuscher, N., Kietzmann, M., Bien, E., Champeroux, P. (1998). "Interference of myrtol standardized with inflammatory and allergic mediators." Arzneim.-Forsch. / Drug Res **48, 10**: 985-989.
- Bianchi, M., Mantovani, A., Erroi, A. et.al (1990). "Ambroxol inhibits interleukin 1 and tumor necrosis factor production in human mononuclear cells." Agents Actions **31**: 275-279.
- Bridgeman, M. M., Marsden, M., MacNee, W., Flenley, D.C., Ryle, A.P. (1991). "Cysteine and glutathione concentrations in plasma and bronchoalveolare lavage fluid after treatment with N-acetylcystein." Thorax **46**: 39-42.

- Bridgeman, M. M., Marsden, M., Selby, C., Morrison, D., MacNee, W., (1994). "Effect of N-acetylcystein on the concentrations of thiols in plasma, bronchoalveolar lavage fluid and lung tissue." Thorax **49**: 670-675.
- Broekhuizen, R., Grimble, R.F., Howell, W.M., Shale, D.J., Creutzberg, E.C., Wouters, E.F., Schols, A.M. (2005). "Pulmonary cachexia, systemic inflammatory profile, and the interleukin 1beta-511 single nucleotide polymorphism." Am J Clin Nutr **82**: 1059-1064.
- Buhl, R. (1994). "Oxidantien und Antioxidantien in der Lunge im Fenster der bronchoalveolären Lavage." Atemw Lungenkrkh **20**: 127-130.
- Bundesärztekammer, A., Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arzneimittelkommission der Deutschen Ärzteschaft (AkdÄ), Deutsche Atemwegsliga, Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin (DEGAM), Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM), Deutsche Gesellschaft für Pneumologie (DGP), Deutsche Gesellschaft für Physikalische Medizin und Rehabilitation (DGRMR) (2006). "Nationale Versorgungsleitlinie COPD." Deutsches Ärzteblatt **103**: A1324-A1327.
- Burge, P. S., Calverley, M., Jones, P.W., Spencer, S., Anderson, J.A., Maslen, T.K. (2000). "Randomised, double blind, placebo controlled study of fluticasone propionate in patients with moderate to severe chronic obstructive pulmonary disease: the ISOLDE trial." BMJ **320**: 1297-1303.
- Burrows, B., Knudson, R.J., Cline, M.G., Lebowitz, M.D. (1977). "Quantitative relationship between cigarette smoking and ventilatory function." Am Rev Respir Dis **115**: 195-205.
- Calverley, P. M. A., Anderson, J.A., Celli, B., Ferguson, G.T., Jenkins, C., Jones, P.W., Yates, J.C., Vestbo, J., TORCH investigators (2007). "Salmeterol and Fluticasone Propionate and Survival in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." N Engl J Med **356**: 775- 789.
- Cantral, D. E., Sisson, J.H., Veys, T., et al. (1995). "Effects of cigarette smoke extract on bovine bronchial epithelial cell attachment and migration." Am J Physiol **268**: L723- L728.
- Capelli, A., Di Stefano A, Gnemmi I, Balbo P, Cerutti CG, Balbi B, Lusuardi M, Donner CF (1999). "Increased MCP-1 and MIP-1beta in bronchoalveolar lavage fluid of chronic bronchitis." Eur Respir J **14**: 160-165.
- Cegla, U. H. (1988). "Long-term therapy over 2 years with ambroxol (Mucosolvan) retard capsules in patients with chronic bronchitis. Results of a double-blind study of 180 patients." Prax Klin Pneumol **42**: 715-721.
- Celli, B., Cote, C., Marin, J., Montes de Oca, M., Casanova, C., Mendez, M.R. (2000). "The SCORE: a new COPD staging system combining 6MWD, MRD dyspnea, FEV1 and PaO2 as predictors of health care resources utilization (HCRU) " Am J Respir Crit Care Med **161**: 749.
- Chung, K. F. (2001). "Cytokines in chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **18**: 50-59.
- Cosio, M. G., Majo, J., Cosio, M. G. (2002). "Inflammation of the Airways and Lung Parenchyma in COPD \* : Role of T Cells." Chest **121**: 160-165.
- Cotgreave, I. A., Eklund, A., Larsson K., Moldeus P. (1987a). "No penetration of orally administrated N-acetylcystein into bronchoalveolar lavage fluid " Eur J Respir Dis **70**: 73-77.
- Cotgreave, I. A., Moldeus P. (1987b). "Lung protection by thiol- containing antioxidants." Bull Eur Physiopathol Respir **23**: 275-277.
- Curkendall, S. M., DeLuise, C., Jones, J.K., Lanes, S., Stang, M.R., Goehring, E. Jr, She, D. (2006). "Cardiovascular disease in patients with chronic obstructive pulmonary disease, Saskatchewan Canada cardiovascular disease in COPD patients." Ann Epidemiol **16**: 63-70.
- Dahl, M., Tybjærg-Hansen, A., Vestbo, J., Lange, P., Nordestgaard, B.G. (2002). "Elevated plasma fibrinogen associated with reduced pulmonary function and increased risk of chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **164**: 1008-1011.

- Dahl, M., Vestbo, J., Lange, P., Bojesen, S.E., Tybjaerg-Hansen, A., Nordestgaard, B.G. (2007). "C-reactive Protein As a Predictor of Prognosis in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Am J Respir Crit Care Med **175**: 250–255.
- Danesh, J., Whincup, P., Walker, M., et al. (2000). "Low grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analyses." BMJ **321**: 199–204.
- Davies, L., Angus, R.M., Calverley, P.M. (1999). "Oral corticosteroids in patients admitted to hospital with exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: a prospective randomised controlled trial." Lancet **354**: 456-460.
- De Godoy, I., Donahoe, M., Calhoun, W.J., Mancino, J., Rogers, R.M. (1996). "Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight- losing COPD patients." Am J Respir Crit Care Med **153**: 633-637.
- Decramer, N., Rutten-van Molken, M., Dekhuijzen, P.N. et al (2005). "Effects of N-acetylcysteine on outcomes in chronic obstructive pulmonary disease (Bronchitis Randomized on NAC Cost-Utility Study, BRONCUS): a randomized placebo-controlled trial." Lancet **365**: 1552-1560.
- Dekhuijzen, P. (2004). "Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease." Eur Respir J **23**: 629-636.
- Deutsche-Atemwegsliga (1994). "Durchführung von Lungenfunktionsprüfungen in der Praxis." Pneumologie **48**: 292-295.
- Di Stefano, A., Capelli, A., Lusuardi, M. et al. (1998). "Severity of airflow limitation is associated with severity of airway inflammation in smokers." Am J Respir Crit Care Med **158**: 1277-1285.
- Di Stefano, A., Caramori, G., Oates, T., Capelli, A., Lusuardi, M., Gnemmi, I., Ioli, F., Chung, K.F., Donner, C.F., Barnes, P.J. et al. (2002). "Increased expression of nuclear factor-kappa B in bronchial biopsies from smokers and patients with COPD." Eur Respir J **20**: 556–563.
- Dietel, M., Dudenhausen, J.W., Suttorp, N. (2002). Harrisons Innere Medizin. Berlin, ABW Wissenschaftsverlag.
- Dohle, F. (2004). Dissertation- Die Hemmung der Apoptose von Monozyten durch die Phagozytose von Thrombozyten. Universitätsklinikum. Münster, Westfälische Wilhelms-Universität Münster.
- Dorow, P. (1989). "Welchen Einfluß hat Cineol auf die mukoziliare Clearance?" Sonderdruck Therapiewoche **39**: 2652-2654.
- Eid, A. A., Ionescu, A.A., Nixon, L.S., Lewis-Jenkins, V., Matthews, S.B., Griffiths, T.L., Shale, D.J. (2001). "Inflammatory response and body composition in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **164**: 1414-1418.
- Ernst, P., Gonzalez, A.V., Brassard, P., Suissa, S. (2007). "Inhaled Corticosteroid Use in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and the Risk of Hospitalization for Pneumonia " AJRCCM **176**: 162-166.
- Fabbri, L. M., Rabe, K.F. (2007). "From COPD to chronic systemic inflammatory syndrom?" Lancet **370**: 797-799.
- Falbe, J., Regitz, M. (1995). Römpp Chemie Lexikon. Stuttgart- New York, Georg Thieme Verlag.
- Federspil, P., Wulkow, R., Zimmermann, Th. (1997). "Effects of standardized Myrtol in therapy of acute sinusitis- results of a double- blind, randomized multicenter study compared with placebo." Laryngo-Rhino-Otol **76**: 23-27.
- Fletcher, C., Peto, R (1977). "The natural history of chronic airflow obstruction." Br Med J **1**: 1645-1648.

- Furth, R. v., Cohn, Z.A., Hirsch, J.G., Humphry, J.H., Spector, W.G., Langevoort, H.L. (1972). "The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes and their precursor cells." Bull. WHO **46**: 845-852.
- Gan, W. Q., Man, S.F.P., Senthilselvan, A., Sin, D.D. (2004). "Association between chronic obstructive pulmonary disease and systemic inflammation: a systematic review and a meta- analyse." Thorax **59**: 574-580.
- Gessner, O. (1974). Gift- und Arzneipflanzen von Mitteleuropa. Heidelberg, Carl Winter Universitätsverlag.
- Gillissen, A. (2003). Die chronisch- obstruktive Lungenerkrankung. Bremen, UNI-MED.
- Gillissen, A. (2007). "Patient adherence in asthma." J Physiol Pharmacol.
- Gillissen, A. (1996). "New perspectives of antioxidant therapy with thiols: n-acetylcysteine." Pneumologie **50**: 834-837.
- Gillissen, A. (2000). Die chronisch- obstruktive Lungenerkrankung. Bremen, Uni- Med.
- Gillissen, A., Bartling, A., Schoen, S.,Schultze-Werninghaus, G. (1997). "Antioxidant function of ambroxol in mononuclear and polymorphonuclear cells in vitro." Lung **175**: 235-242.
- Gillissen, A., Jaworska, M., Wickenburg, D., Marks-Konczalik, J., Schmitz, I., Schultze-Werninghaus, G. (1995). Oxidantienmetabolismus und anti-oxidative Schutzmechanismen in staubbelasteten humanen Lungenzellen. Projekt für Umwelt und Gesundheit (PUG). F. Horsch, Friebel, P., Seidel, A., Wiebel, A. Karlsruhe, Germany. **4**: 219-241.
- Gillissen, A., Roum, J.H., Hoyt, R.F., Crystal, R.G. (1993). "Augmentation of respiratory epithelial lining fluid antioxidant screen by aerosolization of recombinant human Cu<sup>++</sup>/Zn<sup>++</sup> superoxide dismutase." Chest **104**: 811-815.
- GOLD (2006). "Global initiative for chronic obstructive lung disease."
- Gottlieb, D. J., Stone, P.J., Sparrow, D. et al. (1996). "Urinary desmosine excretion in smokers with and without rapid decline of lung function: the Normative Aging Study." Am J Respir Crit Care Med **154**: 1290–1295.
- Grabner, R. (1987). "Influence of cationic amphiphilic drugs on the phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase A2." Biochem Pharmacol **36**: 1063- 1067.
- Grandjean, E. M., Berthet, P., Ruffmann, R. et al (2000). "Efficacy of oral long-term N-acetylcysteine in chronic bronchopulmonary disease: A metaanalysis of published double blind, placebo-controlled clinical trials." Clin Therapeutics **22**: 209-221.
- Graßmann, J. (2000). Antioxidative Eigenschaften etherischer Öle, Herber Utz Verlag· Wissenschaft.
- Grimm, H. (1987). "Antiobstruktive Wirksamkeit von Cineol bei Atemwegserkrankungen." Therapiewoche **37**: 4306- 4311.
- Gross, N. J. (2001). "Extrapulmonary effects of chronic obstructive pulmonary disease." Curr Opin Pulm Med **7**: 84-92.
- Groß, U. (2006). Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Stuttgart.
- Guttridge, D. C., Mayo, M.W., Madrid, L.V., et al. (2000). "NF-κB-Induced loss of myoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia." Science **289**: 2363–2366.
- Habich, G. (1994). "Chronisch obstruktive Atemwegserkrankung- Cineol als Medikation sinnvoll und bewährt." Therapiewoche **44**: 356-365.

- Halpin, D. (2002). COPD. Philadelphia, USA, Elsevier Science.
- Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." N Engl J Med **352**: 1685–1695.
- Hasday, J. D., McKrea, K.A., Meltzer, S.S., Bleeker, E.R. (1994). "Dysregulation of airway cytokine expression in chronic obstructive pulmonary disease and asthma." Am J Respir Crit Care Med **150**: 54-58.
- Heffner, J. E., Repine, J.E. (1991). Antioxidants in the lung. The lung, scientific foundation. R. Press. New York, Crystal, R.G., West, J.B.: 1811-1820
- Hildebrandt, H. (1998). Psyhyrembel, Klinisches Wörterbuch. Berlin, New York, Walter de Gruyter-Verlag.
- Hoffbrand, A. V., Pettit, J.E., Moss, P.A.H., Hoelzer, D. (2003). Grundkurs Hämatologie. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Hogg, J. C., Chu, F., Utokaparch, S., Woods, R., Elliott, W.M., Buzatu, L., Cherniack, R.M., Rogers, R.M., Sciruba, F.C., Coxson, H.O., et al. (2004). "The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **350**: 2645–2653.
- Hole, D. J., Watt, G.C., Davey-Smith, G., et al. (1996). "Impaired lung function and mortality risk in men and women: findings from the Renfrew and Paisley prospective population study." BMJ **313**: 711–715.
- Hubbard, R. C., Brantly, M.L., Crystal, R.G. (1991). Proteases. The lung. Scientific foundations. R. G. Crystal, West, J.B. New York, Raven Press. **1**: 1763-1773.
- Hurst, J. R., Wilkinson, T.M., Perera, W.R., Donaldson, G.C., Wedzicha, J.A. (2005). "Relationships among bacteria, upper airway, lower airway, and systemic inflammation in COPD." Chest **127**: 1219–1226.
- Incalzi, R. A., Caradonna, P., Ranieri, P., Basso, S., Fuso, L., PAgano, F., Ciappi, G., Pistelli, R. (2000). "Correlates of osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease." Respir Med **94**: 1079-1084.
- Ito, K., Lim, S., Caramori, G., Chung, K.F., Barnes, P.J., Adcock, I.M. (2001). "Cigarette smoking reduces histone deacetylase 2 expression, enhances cytokine expression and inhibits glucocorticoid actions in alveolar macrophages." FASEB J **15**: 1100–1102.
- Jeferson, F. d. A. e. a. (2007). "Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)-Limonene in Mice." Biol Pharm. Bull **30**: 1217-1220.
- Jeffery, P. K. (1991). "Morphology of the airway wall in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease." Am Rev Respir Dis **143**: 1152-1158.
- Jürgens, U. R., Dethlefsen, U., Steinkamp, G., Gillissen, A., Repges, R., Vetter, H. (2003). "Anti-inflammatory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) in bronchial asthma: a double-blind placebo-controlled trial." Respir Med **97**: 250-256.
- Jürgens, U. R., Engelen, T., Racké, K., Stöber, M., Gillissen, A., Vetter, H. (2004). "Inhibitory activity of 1,8-cineol (eucalyptol) on cytokine production in cultured human lymphocytes and monocytes." Pulmonary Pharmacology & Therapeutics **17**: 281-287.
- Jürgens, U. R., Stöber, M., Schmidt- Schilling, L., Kleuver, T., Vetter, H. (1998c). "Antiinflammatory Effects of Eucalyptol (1,8-Cineole) in Bronchial Asthma: Inhibition of Arachidonic Acid Metabolism in Human Blood Monocytes ex Vivo." European Journal of Medical Research **3**: 407-412.

- Jürgens, U. R., Stöber, M., Vetter, H (1998b). "Inhibition of Cytokine Production and Arachidonic Acid Metabolism by Eucalyptol (1,8-Cineole) in Human Blood Monocytes in Vitro." European Journal of Medical Research **3**: 508-510.
- Jürgens, U. R., Stöber, M., Vetter, H. (1998a). "Steroidartige Hemmung des monozytären Arachidonsäuremetabolismus und der IL-1beta- Produktion durch 1.8- Cineol." Atemw Lungenkr **24**: 3-11.
- Keatings, V. M., Cave, S.J., Henry, M.J., Morgan, K., O'Connor, C.M., FitzGerald, M.X., Kalsheker, N. (2000). "A Polymorphism in the Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene Promoter Region May Predispose to a Poor Prognosis in COPD." CHEST **118**: 971-975.
- Keinan, E., Alt, A., Amir, G., Bentur, G., Bibid, H., Shoseyov, D. (2005). Bioorg. Med. Chem. **13**: 557-562.
- Kleinveld, H. A., Demacker, P.N.M., Stalenhoef, A.F.H. (1992). "Failure of N- acetylcysteine to reduce low- density lipoprotein oxidizability in healthy subjects." Eur J Clin Pharmacol **43**: 639-642.
- Köhnlein, T., Welte, T. (2003). Alpha-1 Antitrypsin-Mangel. Bremen-London-Boston.
- Konietzko, N. (1983). "Mukolytika- Sekretolytika- Sekretomotorika." Atemw Lungenkr **9**: 151-156.
- Kuhlmann, W. D. (2006). Immunsystem- Grundlage von Integrität und Erkrankung. Radioonkologie. Heidelberg.
- Kuschner, W. G., D'Alessandro, A., Wong, H., Blanc, P.D. (1996). "Dose- dependent cigarette- smoking- related inflammatory responses in healthy adults." Eur Respir J **9**.
- Landbo, C., Prescott, E., Lange, P., Vestbo, J., Almdal, T.P. (1999). "Prognostic value of nutritional status in chronic obstructive pulmonary disease " Am J Respir Crit Care Med **160**: 1856-1861.
- Langen, R. C., Schols, A.M., Kelders, M.C., et al. (2002). "Inflammatory cytokines inhibit myogenic differentiation through the activation of nuclear factor kappa B." FASEB J.
- Laszig, R. (1987). "Gelomyrtol forte bei Patienten mit chronischer Sinusitis " Myrtol standardisiert Dokumentation.
- Leung, A. Y., Foster, S. (1996). Encyclopedia of common natural ingredients. New York, John Wiley and sons, Inc.
- Lim, S., Roche, N., Oliver, B.G., Mattos, W., Barnes, P.J., Fan, C.K. (2000). "Balance of matrix metalloprotease-9 and tissue inhibitor of metalloprotease-1 from alveolar macrophages in cigarette smokers. regulation by interleukin-10." Am J Respir Crit Care Med **162**: 1355-1360.
- Lis- Balchin, M. (1997). "Essential Oils and "aromatherapy": their modern role in healing." J.Roy.Soc.Health **117**: 324-329.
- Lukas, R., Schärling, B., Schultze-Werninghaus, G., Gillissen, A. (2005). "Antioxidantien-Therapie mit N-Acetylcystein und Vitamin C bei Patienten mit chronischer Bronchitis." Dtsch Med Wschr **130**: 563-567.
- MacIntyre, N. R. (2006). "Corticosteroid Therapy and Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Respir Care **51(3)**: 289-296.
- MacNee, W. (2001). "Oxidative stress and lung inflammation in airways disease." Eur J Pharmacol **429**: 195-207.
- MacNee, W. (2005). Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. Proc Am Thorac Soc.
- Mador, M. J., Bozkanat, E. (2001). "Skeletal muscle dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease." Respir Res **2**: 216-224.



- Mahlo, D.-H. (2002). "Mit Cineol die Lungenfunktionsparameter verbessern." Sonderdruck, Therapiewoch **40**: 3157-3162.
- Malerba, M., Ponticiello, A., Radaeli, A., et al. (2004). "Effect of twelve months therapy with oral ambroxol in preventing exacerbations in patients with COPD. Double- blind, randomized, multicenter, placebo- controlled study (the AMETHIST trial)." Pulm Pharmacol Ther **17**: 27-34.
- Marquis, K., Debigare, R., Lacasse, Y., et al. (2002). "Midthigh muscle cross-sectional area is a better predictor of mortality than body mass index in patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **166**: 809–813.
- Matthys, H., Mey de, C., Carls, C., Rys, A., Geib, A., Wittig, Th. (2000). "Efficacy and Tolerability of Myrtol Standardized in Acute Bronchitis." Arzneimittel- Forschung/Drug Research **50 (II)**, **8**: 700-711.
- Meagher, L. C., Cousin, J.M., Seckl, J.R., Haslett, C. (1996). "Opposing effects of glucocorticoids on the rate of apoptosis in neutrophilic and eosinophilic granulocytes." J Immunol **156**: 4422-4428.
- Meister, R., Wittig, Th., Beuscher, N., Mey de, C. (1999). "Efficacy and Tolerability of Myrtol Standardized in Long- term Treatment of Chronic Bronchitis." Arzneimittel- Forschung/Drug Research **49(I)**, **4**: 351-358.
- Merck (2004). Hemacolor® für die Mikroskopie- Färbeset für hämatologisches und klinisches Material. Darmstadt.
- Meyer, A., Buhl, R., Kampf, S., et al (1995). "Intravenous N- acetylcysteine and lung glutathione of patients with pulmonary fibrosis and normals." Am J Respir Crit Care Med **152**: 1055-1060.
- Meyer, A., Buhl, R., Magnussen, H. (1993). "Orale antioxidative Therapie mit N- Acetylcystein bei Patienten mit Lungenfibrose." Atemw Lungenkr **19**: 242-245.
- Mezzetti, M., Colombo, L., Marini, M.G., et al. (1990). "A pharmacocinetic study on pulmonary tropism of ambroxol in patients under thoracic surgery " Surg Intensive Care **13**: 179-185.
- Moldeus, P., Cotgreave, I.A., Berggren, M. (1986). "Lung- protection by a thiol- containing antioxidant: N- acetylcysteine " Respiration **50**: 31-42.
- Morgenroth, K. (1987). Bochum.
- Morgenroth, K. (2007). Sekretion im Bronchialsystem. Bochum.
- Morrison, D., Rahman, I., Lannan, S., MacNee, W. (1999). "Epithelial permeability, inflammation, and oxidant stress in the air spaces of smokers." Am J Respir Crit Care Med **159**: 473–479.
- Morrow, J. D., Frei, B., Longmire, A.W., Gaziano, J.M., Lynch, S.M., Shyr, Y., Strauss, W.E., Oates, J.A., Roberts, L.J. (1995). "Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers: smoking as a cause of oxidative damage." N Engl J Med **332**: 1198–1203.
- Murray, C., Lopez, AD (1997). "Alternative projections of mortality and disability by cause 1990–2020: Global Burden of Disease Study." Lancet **349**: 1498–1504.
- Nakamura, H., Yoshimura, K., McElvaney, N.G., Crystal, R.G. (1992). "Neutrophil elastase in respiratory epithelial lining fluid of individuals with cystic fibrosis induces interleukin-8 gene expression in a human bronchial epithelial cell line." J Clin Invest **89**: 1478–1484.
- Niewoehner, D. E., Erbland, M.L., Deupree, R.H. et al (1999). "Effect of systemic glucocorticoids on exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." N Engl J Med **340**: 1941-1947.
- Nowak, D., Antczak, A., Krol, M., Bialasiewicz, P., Pietras, T. (1994). "Antioxidant properties of ambroxol." Free Radic Biol Med **16**: 517-522.

- Nowak, D., Antczak, A., Krol, M., Pietras, T., Shariati, B., Bialasiewicz, P., Jeczowski, K., Kula, P. (1996). "Increased content of hydrogen peroxide in the expired breath of cigarette smokers." Eur Respir J **9**: 652–657.
- Nowak, D., Dietrich, E. S., Oberender, P., Überla, K., Reitberger, U., Schlegel, C., Albers, F., Ruckdäschel, S., Welsch, R. (2004). "Krankheitskosten von COPD in Deutschland." Pneumologie **58**: 837–844.
- Oethinger, M. (1997). Mikrobiologie und Immunologie: Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog. Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
- Olivieri, D., Zavattini, G., Tomasini, G. et al. (1987). "Ambroxol for the prevention of chronic bronchitis exacerbations: long term multicenter trial." Respiration **51**: 42-51.
- Owen, C. A. (2005). "Proteinases and Oxidants as Targets in the Treatment of Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Proc Am Thorac Soc **2**: 373–385.
- Paul Man, S. F., Sin, D.D. (2005). "Effects of corticosteroides on systemic inflammation in chronic obstructive pulmonary disease." Proc Am Thorac Soc **2**: 78-82.
- Pauwels, R. A., Lofdahl, C.-G., Laitinen, L.A., et al (1999). "Long-term treatment with inhaled budesonide in persons with mild chronic obstructive pulmonary disease who continue smoking." New Engl J Med **340**: 1948–1953.
- Pela, R., Calcagni, A.M., Subiaco, S., Isidori, P., Tubaldi, A., Sanguinetti, C.M. (1999). "N-acetylcysteine reduces the exacerbation rate in patients with moderate to severe COPD." Respiration **66**: 495-500.
- Perera, W. R., Hurst, J.R., Wilkinson T.M.A., Sapsford, R.J., Müllerova, H., Donaldson G.C., Wedzicha, J.A. (2007). "Inflammatory changes, recovery and recurrence at COPD exacerbation." Eur Respir J **29**: 527-534.
- Peter, C., Anderson, J.A., Celli, B., Ferguson, G.T., Jenkins, C., Jones, P.W., Yates, J.C., Vestbo, J. (2007). "Salmeterol and Fluticasone Propionate and Survival in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." The New England Journal of Medicine **356**: 775-789.
- Pinto-Plata, V. M., Müllerova, H., Toso, J.F., Feudjo-Tepie, M., Soriano, J.B., Vessey, R.S., Celli, B.R. (2006). "C-reactive protein in patients with COPD, control smokers and non-smokers." Thorax **61**: 23–28.
- Plant, P. K., Owen, J.L., Elliott, M.W. (2000). "Early use of non.invasive ventilation (NIV) for acute Exacerbations of COPD on general respiratory wards: a multicenter randomized controlled trial." Lancet **355**: 1931-1935.
- Pohl and Boskamp (2005). Investigator's Brochure Myrtil N Capsules, Pohl Boskamp.
- Poole, P. J., Black, P.N. (2001). "Oral mucolytic drugs for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." BMJ **322**: 1-6.
- Pratico, D., Basili, S., Vieri, M., Cordova, C., Violi, F., FitzGerald, G.A. (1998). "Chronic obstructive pulmonary disease is associated with an increase in urinary levels of isoprostane F<sub>2</sub>-III, an index of oxidant stress." Am J Respir Crit Care Med **158**: 1709–1714.
- Prescott, E. (2000). "Tobacco-related disease: the role of gender." Tobacco-related disease: the role of gender **47**: 115-131.
- Prescott, E., Almdal, T., Mikkelsen, K.L., Tofteng, C.L., Vestbo, J., Lange, P. (2002). "Prognostic value of weight change in chronic obstructive pulmonary disease: results from the Copenhagen City Heart Study." Eur Respir J **20**: 539–544.

- Prescott, L. F., Donovan, J.W., Jarvie, D.R. et al. (1989). "The disposition and kinetics of intravenous N-acetylcysteine in patients with paracetamol overdose." Eur J Clin Pharmacol **37**: 501-506.
- Rabinovich, R. A., Figueras, M., Ardite, E., Carbo, N., Troosters, T., Filella, X., Barbera, J.A., Fernandez-Checa, J.C., Argiles, J.M., Roca, J. (2003). "Increased tumour necrosis factor-alpha plasma levels during moderate-intensity exercise in COPD patients." Eur Respir J **21**: 789-794.
- Rahman, I., Skwarska, E., MacNee, W. (1997). "Attenuation of oxidant/antioxidant imbalance during treatment of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease." Thorax **52**: 565-568.
- Retamales, I., Elliott, W.M., Meshi, B., et al. (2001). "Amplification of inflammation in emphysema and its association with latent adenoviral infection." Am J Respir Crit Care Med **164**: 469-473.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis: an inflammatory disease." N Engl J Med **340**: 115-126.
- Rubio, M. L., Sanchez- Cifuentes, M.V., Ortega, M., et al (2000). "N- acetylcysteine prevents cigarette smoke induced small airway alterations in rats." Eur Respir J **15**: 505-511.
- Russell, R., Thorley A, Culpitt SV, et al. (2002). "Alveolar macrophage-mediated elastolysis: roles of matrix metalloproteinases, cysteine, and serine proteases." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **283**: L867-L873.
- Rusznak, C., Devalia, J.L., Sapsford, R.J., Davies, R.J. (1996). "Ozone-induced mediator release from human bronchial epithelial cells in vitro and the influence of nedocromil sodium." Eur Respir J **9**: 2298-2305.
- Saetta, M. (1999). "Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **160**: 17-20.
- Saetta, M., Di Stefano, A., Maestrelli, P., Ferraresso, A., Drigo, R., Potena, A., Ciaccia, A., Fabbri, L.M. (1993). "Activated T-lymphocytes and macrophages in bronchial mucosa of subjects with chronic bronchitis." Am Rev Respir Dis **147**: 301-306.
- Saetta, M., Di Stefano, A., Turato, G., et al (1998). "CD8+ T-lymphocytes in the peripheral airways of smokers with chronic pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **157**: 822-826.
- Saetta, M., Finkelstein, R., Cosio, M.G. (1994). "Morphological and cellular basis for airflow limitation in smokers." Eur Respir J **7**: 1505-1515.
- Schäfer, D. (1981). "Schäfer: Pharmakologische Untersuchungen zur broncholytischen und sekretolytisch- expektorierender Wirksamkeit einer Salbe auf Basis von Menthol, Campher und ätherischen Ölen." Arzneim.-Forsch. **31**: 82-86.
- Schilcher, H. (1984). "Wirkungen und Nebenwirkungen ätherischer Öle." Zschr. Phytother. **5**: 837-839.
- Schmidt, W. (1990). Angewandte Lungenfunktionsprüfung. Eine Einführung für Praxis und Klinik. München, Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle.
- Schneider, A., Borst, M. M. , Gerlach, F. M. , Szecsenyi, J. (2005). "Verdacht auf COPD – Entwicklung eines Algorithmus zur Stufendiagnostik in der Hausarztpraxis." Z. ärztl. Fortbild. Qual. Gesundh.wes. **99**: 217-225.
- Schneider, G. (1990). Arzneidrogen. Mannhein- Wien- Zürich, Wissenschaftsverlag.
- Schols, A. M., Slangen, J., Volovics, L., Wouters, E.F (1998). "Weight loss is a reversible factor in the prognosis of chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **157**: 1791-1797.
- Schols, A. M., Soeters, P.B., Dingemans, A.M., Mostert, R., Frantzen, P.J., Wouters, E.F. (1993). "Prevalence and characteristics of nutritional depletion in patients with stable COPD eligible for pulmonary rehabilitation." Am Rev Respir Dis **147**: 1151-1156.

- Schreck, R., Albermann, K., Baeuerle, P.A. (1992). "Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eucaryotic cells (a review)." Free Radic Res Commun **17**: 221-237.
- Sibille, Y., Reynolds, H.Y. (1990). "Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury." Am Rev Respir Dis **141**: 471-501.
- Sin, D. D., Man, P. (2003a). "Why Are Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease at Increased Risk of Cardiovascular Diseases? The Potential Role of Systemic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease." Circulation **107**: 1514-1519.
- Sin, D. D., Man, S.F.P. (2006). "Skeletal muscle weakness, reduced exercise tolerance, and COPD: is systemic inflammation the missing link? ." Thorax **61**: 1-3.
- Sin, D. D., McAlister, F.A., Man, S.F.P., Anthonisen, N.R. (2003b). "Contemporary management of chronic obstructive pulmonary disease: scientific review." JAMA **290(17)**: 2301-2312.
- Sommerhoff, C. P., Nadel, J.A., Basbaum, C.B., Caughey, G.H. (1990). "Neutrophil elastase and cathepsin G stimulate secretion from cultured bovine airway gland serous cells. ." J Clin Invest **85**: 682-689.
- Souza, M. C., Siani, A.C., Ramos, M.F., Menezes-de-Lima, O.J. (2003). Pharmazie **58**: 582-586.
- Sparrow, D., Glynn, R.F., Cohen, M., Weiss, S.T. (1984). "The relationship of the peripheral leukocyte count and cigarette smoking to pulmonary function among adult men." Chest **86**: 383-386.
- Stey, C., Steuer, J., Bachmann, S. et al. (2000). "The effect of oral N-ace-tylcysteine in chronic bronchitis □ a quantitative systematic review." Eur Respir J **16**: 253-262.
- Takabatake, N., Nakamura, H., Abe, S., Inoue, S., Hino, T., Saito, H., Yuki, H., Kato, S., Tomoike, H. (2000). "The relationship between chronic hypoxemia and activation of the tumor necrosis factor-alpha system in patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Crit Care Med **161**: 1179-1184.
- Takizawa, H., Tanaka, M., Takami, K., Ohtoshi, T., Ito, K., Satoh, M., Okada, Y., Yamasawa, F., Nakahara, K., Umeda, A. (2001). "Increased expression of transforming growth factor-beta 1 in small airway epithelium from tobacco smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD)." Am J Respir Crit Care Med **163**: 1476-1483.
- The-Lung-Health-Study-Research-Group (2000). "Effect of inhaled triamcinolone on the decline in pulmonary function in chronic obstructive pulmonary disease." New Engl J Med **343**: 1902-1909.
- Thepen, T., Kraal, G., Holt, P.G. (1994). Role of alveolar macrophages in regulation of lung inflammation. Cells and cytokines in lung inflammation. B. M. Boland, Cullinan, J., Rogers, T. New York, The New York Academy of Science: 200-206.
- Thompson, W. H., Nielson, C.P., Carvalho, P. et al. (1996). "Controlled trial of oral prednisolone in outpatients with acute COPD exacerbation." Am J Respir Crit Care Med **154**: 407-412.
- Traves, S. L., Culpitt, S., Russell, R.E.K., Barnes P.J., Donnelly L.E. (2002). "Elevated levels of the chemokines GRO-alpha and MCP-1 in sputum samples of COPD patients." Thorax **57**: 590-595.
- Traves, S. L., Culpitt, S.V., Russell, R.E., Barnes, P.J., Donnelly, L.E. (2002). "Increased levels of the chemokines GROalpha and MCP-1 in sputum samples from patients with COPD." Thorax **57**: 590-595.
- Ulmer, W. T., Reichel, D., Nolte, D., Islam, M.S. (1991). Die Lungenfunktion: Physiologie, Pathophysiologie und Methodik. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Van Ede, L., Yzermans C.J., Brouwer, H.J. (1999). "Prevalence of depression in patients with chronic obstructive pulmonary disease: a systematic review." Thorax **54**: 688-692.

- Van Eeden, S. F., Hogg, J.C. (2000). "The response of human bone marrow to chronic cigarette smoking." Eur Respir J **15**: 915-921.
- Vernooy, J. H., Kucukaycan, M., Jacobs, J.A., Chavannes, N.H., Buurman, W.A., Dentener, M.A., Wouters, E.F. (2002). "Local and systemic inflammation in patients with chronic obstructive pulmonary disease: soluble tumor necrosis factor receptors are increased in sputum." Am J Respir Crit Care Med **166**: 1218-1224.
- Vestbo, J., Sorensen, T., Lange, P., Brix, A., Torre, P., Viskum, K. (1999). "Long-term effect of inhaled budesonide in mild and moderate chronic obstructive pulmonary disease: A randomised controlled trial." Lancet **353**: 1819-1823.
- Vetter, U. R. J. H. (1998). "Terpene in der Asthmatherapie: Neue klinische und experimentelle Ergebnisse zur antiinflammatorischen und bronchodilatatorischen Wirkung von 1,8- Cineol." Eur J Med Res **3 (9)**: 407-412.
- Vogelmeier, C., R. Buhl, C. P. Criée, A. Gillissen, P. Kardos, D. Köhler, H. Magnussen, H. Morr, D. Nowak, D. Pfeiffer-Kascha, W. Petro, K. Rabe, K. Schultz, H. Sitter, H. Teschler, T. Welte, R. Wettengel, H. Worth (2007). "Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem (COPD)." Pneumologie **61**: e1 - e40.
- Wagena, E. J., Van Amelsvoort, L.G.P.M., Kant, I., Wouters, E.F.M. (2005). "Chronic bronchitis, cigarette smoking and the subsequent onset of depression and anxiety: results from a prospective population-based cohort study." Psychosomatic Medicine **67**: 656-660.
- Wagner, H., Wierer, M., Bauer, R. (1986). "In- vitro- Hemmung der Prostaglandin-Biosynthese durch ätherische Öle und phenolische Verbindungen." Planta Medica **3**: 184-187.
- Wang, H., Liu, X., Umino, T., Sköld, C.M., Zhu, Y., Kohyama, T., Spurzem, J., Romberger, D.J., Rennard, S.I. (2001). "Cigarette Smoke Inhibits Human Bronchial Epithelial Cell Repair Processes." Am. J. Respir. Cell Mol. Biol **25**: 772-779.
- Wedzicha, J. A., Seemungal, T.A., MacCallum, P.K., et al. (2000). "Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease are accompanied by elevation of plasma fibrinogen and serum IL-6 levels." Thromb Haemost **84**: 210-215.
- WHO (1961). WHO report of an expert committee: Definition and diagnosis of pulmonary disease with special reference to chronic bronchitis and emphysema. WHO Techn Rep Ser
- Wichtl, M. (1997). Teedrogen und Phytopharmaka. Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Wilson, D. O., Rogers, R.M., Wright, E.C., Anthonisen, N.B. (1989). "Body weight in chronic obstructive pulmonary disease. The National Institute of Health Intermittent Positive Pressure Breathing Trial." Am Rev Respir Dis **139**: 1435-1438.
- Wilson, R. (1992). "The pathogenesis and management of bronchial infections: the vicious circle of respiratory decline." Rev Contemp Pharmacother **3**: 103-112.
- Wittes, J., Wu, M.C. (2006). "Natural history of alpha-1 antitrypsin deficiency." Dtsch Arztebl **103(26)**: 1828-32
- Wittig, T. (2002). Myrtol standardisiert – Eine klinische Dokumentation. Hamburg, Ergebnisse Verlag.
- Zimmermann, T., Seiberling, M., Thomann, P., Karabelnik, D. (1995). "Untersuchungen zur relativen Bioverfügbarkeit und zur Pharmakokinetik von Myrtol standardisiert." Arzneimittel-Forschung/Drug Research **45 (II), 11**: 1198-1201.

## 10 Erklärung

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkten Bezug genommen wurde, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Datum

Unterschrift

## 11 Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Adrian Gillissen für die Vergabe des interessanten Themas, die Möglichkeit diese Arbeit an der Robert Koch- Klinik Leipzig durchzuführen und die stetige engagierte Betreuung.

Frau Dr.rer.nat. Gabriela Vacca gilt ein großer Dank für die Geduld und Ausdauer beim gemeinsamen Erarbeiten einer geeigneten Methode, sowie die zahlreich durchgeführten Messungen. Außerdem möchte ich mich herzlich bei Frau Dipl.math. Ramona Dück für die guten Anregungen bedanken. Ein herzlicher Dank gilt auch den MTA's Frau Zimmer, Frau Radke und Frau Wenzel für die Einarbeitung im Labor und die immer angenehme Atmosphäre.

Mein ganz besonderer Dank gilt Ulrike Rantzsch für die gemeinsame und dadurch sehr schöne Zeit im Labor und die große Motivation während der Entstehung dieser Arbeit. Die am Anfang des Studiums gefundene Freundschaft und das ständige Wachsen dieser auch über das Studium hinaus sind mir enorm wichtig.

Der größte Dank gilt meinen Eltern, ohne deren fortwährende Unterstützung und Liebe das Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wären.

Meinem Mann Martin Penzel danke ich von ganzem Herzen für seine Liebe, die unendliche Geduld mit mir und der Arbeit, die ständige Motivation zum "Dranbleiben", aber auch die nötige Ablenkung zu gegebener Zeit.

## 12 Lebenslauf

<b>Persönliche Daten</b>	
Name	Carolin Dölling
Geburtsdatum	08.07.1983
Geburtsort	Oelsnitz/ Vogtland
Nationalität	deutsch
<b>Schulbildung</b>	
08/1995- 06/2002	Julius- Mosen- Gymnasium Oelsnitz/ Vogtland, Abschluß Abitur, Note 1,1
<b>Medizinische Ausbildung</b>	
10/2002- 11/2008	Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
08/2004	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 2,6
11/2008	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Staatsexamen), Note 2,0
<b>Famulaturen</b>	
02-03/2005	Pathologie, Universität Leipzig
07/2005	Praxis für Innere Medizin, Leipzig
08/2005	Praxis für Allgemeinmedizin, Leipzig
03-04/2006	Kardiologie, Herzzentrum Leipzig
08-09/2006	Pulmologie, Robert-Koch-Klinik Leipzig
<b>Praktisches Jahr</b>	
08-12/2007	1.Tertial: Gynäkologie- Sanitätsbetrieb Bozen, Italien und Städtisches Klinikum St. Georg, Leipzig
12/2007- 04/2008	2.Tertial: Chirurgie- Universitätsklinik Dresden
04-07/2008	3.Tertial: Innere Medizin- Universitätsklinik Leipzig und Herzzentrum Leipzig
<b>Berufstätigkeit</b>	
ab 03/2009	Ärztin in Weiterbildung Innere Medizin, Paracelsus Klinik Adorf/ Vogtland