

Aus der Medizinischen Klinik III
der Universität zu Lübeck
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Jan Rupp

Immunmodulatorische Effekte von Moxifloxacin in humanem Lungengewebe

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Universität zu Lübeck
- aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Meike Schwendt
aus Lübeck

Lübeck 2018

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff
2. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Bader

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.10.2018

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 COPD – eine Krankheit mit zunehmender klinischer Bedeutung, hoher Morbidität und Mortalität.....	1
1.1.1 Definition und Bedeutung der COPD.....	1
1.1.2 Pathogenese der COPD – Inflammation und Exazerbation	3
1.1.3 Nontypeable Haemophilus influenzae (NTHi) und die angeborene Immunantwort.....	7
1.1.4 Antibiotische Therapie als Grundkonzept mit kausalem Ansatz zur Reduktion der Exazerbation.....	9
1.2 Fragestellung.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Lungengewebe.....	15
2.1.1 Stimulation mit Moxifloxacin und Ceftriaxon in humanem Lungengewebe.....	16
2.2 NTHi.....	19
2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	20
2.4 LDH-Zytotoxizitätstest.....	21
2.5 HOPE® (Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect)-Fixierung.....	21
2.6 Haematoxylin-Eosin (HE)-Färbung	23
2.7 TLR-2 Rezeptornachweis mittels Immunhistochemie in humanem Lungengewebe.....	23
2.8 IL-8 In-situ-Hybridisierung (ISH) in humanem Lungengewebe.....	25
2.9 Statistische Analysen.....	26
3 Ergebnisse	28
3.1 Patientendaten.....	28
3.2 Zytotoxizität in humanem Lungengewebe nach NTHi-Infektion und Kostimulation mit MFX oder CEF.....	29
3.3 IL- 8 Konzentrationen in humanem Lungengewebe nach in vitro Stimulation mit NTHi für 24h.....	31
3.4 Antiinflammatorische Effekt von Antiinfektiva in humanem Lungengewebe.....	33
3.5 TLR2 Expression im humanen Lungengewebe nach in vitro Infektion mit NTHi und antibiotischer Therapie.....	37

4 Diskussion	38
4.1 Antiinflammatorische Effekte von MXF	38
4.2 Proinflammatorischer Effekt von CEF.....	41
4.3 Immunmodulatorischer Wirkmechanismus von MFX	42
4.4 Klinische Konsequenzen: Antibiotische Therapie und Immunmodulation in der Therapie von COPD-Exazerbationen.....	45
5 Zusammenfassung.....	50
6 Literatur	51
7 Danksagung	70
8 Lebenslauf	71

Abkürzungsverzeichnis

cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CEF	Ceftriaxon
cfu	colony forming unit
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
ELISA	Enzyme-linked Immunsorbent Assay
ERK	extracellular-signal Regulated Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
FEV1	forciertes expiratorisches Volumen in der ersten Sekunde
FVC	forcierte Vitalkapazität
Hope	Hepes Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect
Ikka/b	I kappa kinase
IL-8	Interleukin 8
IRAK	interleukin-1 receptor-associated kinase-1
ISH	<i>In-situ</i> -Hybridisierung
IκBα	regulator protein NFκB
JNK	c-Jun N-terminal kinases
LOS	Lipooligosaccharid
LPS	Lipopolysaccharid
McF	McFarland
MFX	Moxifloxacin
MyD88	myeloid differentiation primary response protein
NFκB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NTHi	Nontypeable Haemophilus influenzae
OMP P6	outer membranprotein P6
p38	p38-Kinase
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PPR	Pathogen Recognition receptor
RAF	rapidly accelerated fibrosarcoma
TIRAP	toll-like receptor adaptors
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF-α	Tumornekrosefaktor α

1 Einleitung

1.1 COPD – eine Krankheit mit zunehmender klinischer Bedeutung, hoher Morbidität und Mortalität

1.1.1 Definition und Bedeutung der COPD

Nach derzeitigem Wissenstand ist die COPD (*Chronic obstructive pulmonary disease*) definiert als eine chronische Erkrankung, die mit einer Obstruktion der Atemwege und Reduktion der Lungenfunktion einhergeht. Zu Grunde liegt dieser Erkrankung eine Kombination aus entzündlichen Prozessen (obstruktiven Bronchiolitis) und Destruktion des Parenchyms (Emphysementstehung) (55). Die COPD entsteht meist auf dem Boden einer chronischen Bronchitis, die mindestens drei Monate in zwei aufeinander folgenden Jahren mit Husten und Auswurf einhergeht und im weiteren Verlauf in eine chronisch-obstruktive Form übergehen kann, bei der die Obstruktion auch bei optimaler antiobstruktiver Therapie nicht vollständig reversibel ist (160).

Mittlerweile ist diese Erkrankung weltweit eine der führenden Ursachen für ansteigende Morbidität und Mortalität (13, 84). Sie liegt dabei an vierter Stelle der Todesursachen in den Industrienationen, nach Herzinfarkt, Schlaganfall und Tumorerkrankungen (69, 53). Bei der COPD steht mittlerweile nicht nur die Erkrankung der Atemwege im Vordergrund. Immer häufiger wird von einer systemischen Erkrankung mit Befall der Skelettmuskulatur, chronischer Anämie und Osteoporose gesprochen. Auch kardiovaskuläre Komorbiditäten und die Karzinomentwicklung sind mit der COPD assoziiert (14, 1, 132).

Klinisch imponiert die COPD mit morgendlichem produktivem Husten, der zunächst über viele Jahre hinweg alleine bestehen kann. Als weiteres charakteristisches Symptom kommt im weiteren Verlauf die persistierende und progrediente Dyspnoe hinzu. Später ist das klinische Bild dominiert von Patienten mit überwiegender obstruktiver Bronchitis (=Blue Bloater) oder mit vorherrschender Emphysemsymptomatik (=Pink Puffer). Respiratorische Partial- und Globalinsuffizienz mit ausgeprägter Dyspnoe, chronischer Rechtsherzbelastung und reduzierter Lebensqualität bestimmen die Klinik der Patienten.

Die Diagnose der COPD kann primär klinisch gestellt werden. Husten und progrediente Dyspnoe sind dabei wegweisend. Die Obstruktion besonders der schmalen Atemwege resultiert in einer erhöhten Resistance und einer Erniedrigung der Einsekundenkapazität (FEV₁) in der spirometrischen Messung. Klinisch und während der Lungenfunktion fällt eine Verlängerung der Expiration auf. Als Goldstandard zur Diagnosefindung dient weiterhin die Spirometrie und nach der *Global Initiative of Lung Diseases* (GOLD) wird

anhand der Parameter eine Einteilung in vier Schweregrade im Hinblick auf das Ausmaß der Reduktion der Lungenfunktion ermöglicht.

Abbildung (1): Einteilung der COPD gemäß spirometrischer Messwerte nach GOLD 2017 (55)

Schweregrad	FEV ₁ % Soll	FEV ₁ / FVC
I mild	> 80	< 70
II moderat	<50 FEV ₁ <80	< 70
III schwer	<30 FEV ₁ <50	< 70
IV sehr schwer	< 30 (50)*	< 70

*bei chronischer respiratorischer Insuffizienz reicht auch ein FEV₁ < 50% zu Diagnose einer COPD IV (PaO₂ <60mmHg (8,0kPa) ± PaCO₂ >50mmHg (6,7 kPa))

Obwohl die spirometrische Messung eine gute Einschätzung über die Lungenfunktion liefert und für die Diagnosesicherung unverzichtbar ist, korrelieren die Symptomatik und der Allgemeinzustand der Patienten nicht unbedingt mit Abnahme der Einsekundenkapazität in der Lungenfunktion (55). Eine Schweregradeinteilung der COPD nur auf Grundlage der spirometrisch erhobenen Werte wird der klinischen Bedeutung und Prognose der Erkrankung nicht gerecht. Durch die sog. ABCD - Einteilung werden auch die aktuelle klinische Symptomatik, inklusive der Schwere der Dyspnoe, sowie die Anzahl und das Risiko für weitere Exazerbationen bewertet. Eine wichtige Rolle spielen dabei auch zusätzlich bestehende Komorbiditäten, die den Allgemeinzustand des Patienten schwer beeinträchtigen und die Prognose verschlechtern können, selbst wenn nur eine geringe Beeinträchtigung der Lungenfunktion besteht.

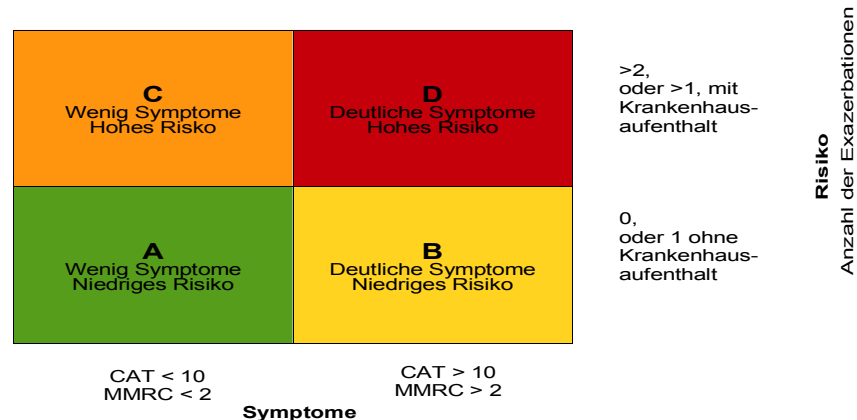


Abbildung (2): ABCD Einteilung der COPD nach GOLD 2017

Zur Bewertung der Symptome dienen standardisierte Fragebögen, wie z.B. der COPD

Assesment Test (CAT) und die Modified Medical Research Council Dyspnoeskala (MMRC), mit denen die Symptome und die Schwere der Atemnot möglichst objektiv erfasst werden können.

Patienten mit bereits durchgemachter Exazerbation haben ein höheres Risiko für weitere Exazerbationen. Hurst und Kollegen beobachteten, dass eine durchgemachte Exazerbation immer ein hohes Risiko für ein Rezidiv innerhalb von acht Wochen darstellt. Dabei bestand eine deutlich höhere Gefahr für eine weitere Reduktion der Lungenfunktion (65).

Das Risiko für Exazerbationen korreliert zwar mit der Schwere der Lungenfunktionseinschränkung (136), wobei aber auch hier die alleinige Bewertung der Lungenfunktion ein nur unzureichender prädiktiver Faktor ist (138). Ein Krankenhausaufenthalt aufgrund einer Exazerbation ist zusätzlich mit einem schlechteren Outcome und höherer Mortalität assoziiert (66).

Durch Beachtung der aktuellen Symptomatik und Abschätzung des Exazerbationsrisiko wird eine Einteilung der Patienten in Gruppen A-D vorgenommen, dabei kann die Komplexität der Erkrankung besser erfasst und eine individuelle Therapie für den einzelnen Patienten ermöglicht werden.

1.1.2 Pathogenese der COPD – Inflammation und Exazerbation

Die Pathogenese der COPD ist gekennzeichnet durch eine übersteigerte abnormale und chronische Entzündungsreaktion im Lungenparenchym mit resultierendem Gewebsuntergang und progressiver Beeinträchtigung der Lungenfunktion. Wichtige Komponenten sind dabei eine zunehmende Obstruktion besonders der kleinen Atemwege, chronische Bronchitis und Emphyseentwicklung.

Das Rauchen als inhalative Noxe ist einer der bedeutendsten Risikofaktoren für die Entwicklung einer COPD. Durch Reduktion des Nikotinkonsums kann ein Fortschreiten der Krankheit verhindert oder zumindest herausgezögert werden (48, 6, 54).

Da die Inflammation im Lungengewebe nach Beendigung des Nikotinkonsums persistiert und auch Nichtraucher eine COPD entwickeln können, liegt es nahe, dass auch weitere Faktoren als potentielle Triggerfaktoren in Betracht kommen (26, 146, 79, 169).

Als weitere Faktoren werden molekularbiologische Prozesse diskutiert, die mit veränderter Immunantwort und defekten DNA-Reparaturmechanismen einhergehen sowie der natürliche Alterungsprozess des Patienten (80, 18, 75). Studien konnten zeigen, dass der oxidative Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese der COPD spielt. Das Verhältnis

zwischen histonacetylierter und deacetylierter DNA kann so beeinflusst werden, dass es zur Translation bestimmter Gene mit vermehrter Expression von proinflammatorischen Faktoren kommt. Die Aktivität der Histondeacetylase ist dabei in Makrophagen von Rauchern erniedrigt (109, 32). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang auch das Konzept der Proteasen/Antiproteasen - Imbalance, welches durch oxidativen Stress verstärkt wird. Durch ein Überwiegen der Proteasen kommt es zu einem weiteren Abbau des Lungengewebes mit Reduktion der Lungenfunktion, wie bei einem Alpha-1-Antitrypsinmangel (25, 128).

Von weiterer pathophysiologischer Bedeutung sind die neuesten Erkenntnisse zum pulmonalen Mikrobiom. Durch den Nachweis von ribosomaler bakterieller RNA konnte erstmals gezeigt werden, dass die unteren Atemwege nicht steril sind, sondern auch gesunde Lungen mit Bakterien besiedelt sind. Hilty et al waren nicht nur die ersten, welche die signifikante Präsenz von Bakterien in den unteren Atemwegen nachweisen konnten, sondern sie zeigten auch in einer Untersuchung von bronchialalveolären Lavagen, dass bei COPD-Patienten, bei Asthmatikern und bei der gesunden Kontrollgruppe 16sRNA von Bakterien in vergleichbarer Quantität nachgewiesen werden konnten. Die Zusammensetzung der bakteriellen Flora variierte dabei in ihrer Qualität entsprechend der jeweiligen vorliegenden Grunderkrankung, wie z.B. der COPD (59). Die Existenz eines Mikrobioms in den unteren Atemwegen gesunder Lungen ist also wahrscheinlich und könnte durch Mikroaspirationen im Schlaf begründet sein. Durch ein intaktes Immunsystem kann eine solche Besiedlung in gesunden Lungen im Gleichgewicht gehalten werden (27, 83, 42). Mit Zunahme des Schweregrades der COPD, wurde eine Abnahme der Diversität beobachtet (42, 51, 143). In welchem Umfang diese Besiedlung in der Pathogenese der COPD involviert ist, ist weiterhin Gegenstand aktueller Studien. Dass sie aber mit erhöhter Inflammation und Veränderungen im Immunsystem des Lungengewebes einhergeht, ist durch zahlreiche Arbeiten belegt (110).

Sethi et al. beschrieben die Pathogenese der COPD 2008 erstmals als „vicious circle“, bei dem initiale Stimuli, d.h. inhalative Noxen, wie Zigarettenrauch oder vermehrte Infektionen im Kindesalter als Trigger wirken und durch Schädigung der Mukosabarriere zur Schwächung der angeborenen Immunität des Lungengewebes und zu einer mikrobiellen Besiedlung der unteren Atemwege führen. Hierdurch wird erneut eine Inflammationsreaktion induziert, die zusätzlich zu einer weiter reduzierten mukoziliären Clearance und anhaltenden Insuffizienz der lokalen Abwehrmechanismen führt (125, 122,

124). Aufgrund der aktuellen Erkenntnisse im Mikrobiomprojekt muss diese Hypothese allerdings modifiziert werden. Die geschwächte lokale Immunität führt nicht nur zur chronischen Besiedlung der Atemwege, sondern auch zur Veränderung der bakteriellen Zusammensetzung von ortsständiger Flora, bis hin zu potentiell pathogenen Keimen (83, 51).

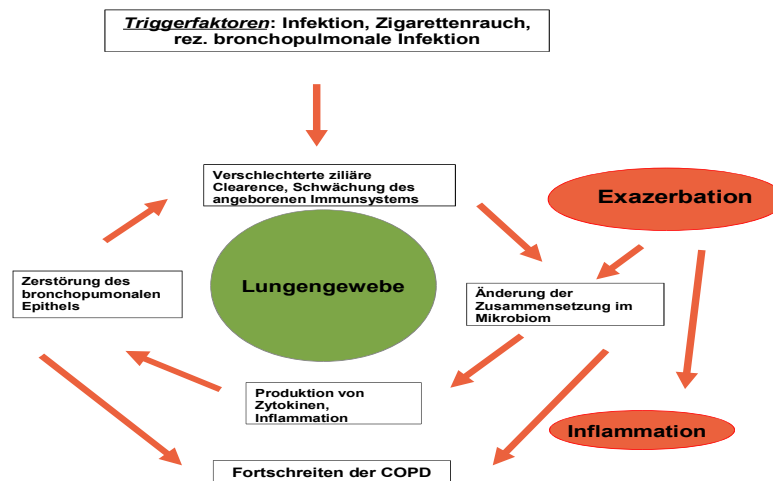


Abbildung (3): „Vicious circle“ modifiziert nach Sethi und Kollegen (83)

Aktuelle Analysen des Erregerspektrums decken sich mit früheren Sputumuntersuchungen bei denen als häufigster Erreger *nontypable Haemophilus influenzae (NTHi)*, *Streptococcus pneumoniae* und *Moraxella catarrhalis* nachgewiesen werden konnten (133, 114, 125). Diese mikrobielle Besiedlung ist mit einer permanenten unterschwelligem Inflammation im Bereich der Atemwege assoziiert, die zur weiteren Zerstörung des respiratorischen Gewebes, bevorzugt in den peripheren Atemwegen führt. Dies zeigte sich in bronchialen Biopsien, in denen eine erhöhte Anzahl von Zellen mit proinflammatorischen Eigenschaften nachgewiesen werden konnten. Neben Neutrophilen und Makrophagen als Vertreter des angeborenen Immunsystems, waren auch T- und B-Lymphozyten in den Biopsien des Lungengewebes erhöht, was für eine zusätzliche Beteiligung der adaptiven Immunität spricht (60). Andere Studien konnten neben den zellulären Bestandteilen auch erhöhte Konzentrationen von Leukotriene B₄, IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12 sowie TNF- α und anderen Entzündungsmediatoren als Zeichen der erhöhten Inflammation nachweisen (58, 67, 87, 86). Dabei ist Interleukin 8 als Parameter der unspezifischen Entzündungsantwort in respiratorischen Materialien bei akuten pulmonalen

Infektionen und bei Patienten mit COPD am besten charakterisiert und zeigt dort - im Gegensatz zu anderen Zytokinen/Chemokinen - eine hohe Stabilität (72, 168, 172).

Inwieweit die Kolonisation im Rahmen der Pathogenese der Exazerbation eine Rolle spielt, ist noch nicht abschließend geklärt. Sethi et al. zeigten schon 2006, dass eine chronische Kolonisation der Atemwege mit einer erhöhten Frequenz von Exazerbationen assoziiert ist (123, 102). Als am häufigsten isolierte Erreger bei Exazerbationen sind dabei *nontypeable Haemophilus influenza (NTHi)* und *Streptococcus pneumoniae* zu nennen (11, 94, 135, 93). Im Hinblick auf die sogenannte „fall and rise“ Hypothese der Exazerbation ist diese Kolonisation der unteren Atemwege die Grundlage für die dauerhafte Inflammation im Rahmen der COPD. Es wird angenommen, dass die Bakterienanzahl in den Atemwegen eine gewisse Menge (*bacterial load*) erreichen muss, damit die unterschwellige persistierende Entzündung so stark gesteigert wird, dass es dann im Verlauf zu einer Exazerbation mit den typischen klinischen Symptomen kommen kann (90). Schon in den 90-er Jahren konnten Monso und Kollegen im stabilen Stadium der COPD und während der Exazerbation die gleichen Bakterienarten im Lungengewebe nachweisen (94, 170, 125). In aktuelleren Sputumanalysen konnte während einer Exazerbation, im Vergleich zum stabilen Zustand, die 20-fache Menge an Bakterien nachgewiesen werden (50). Eine deutliche Erhöhung der Bakterienanzahl ist klinisch demnach mit einer Exazerbation assoziiert, während eine Kolonisation bei ausreichender Aktivität des Immunsystems bestehen bleibt (7). Eine mögliche therapeutische Konsequenz wäre eine möglichst komplette Eradikation der bakteriellen Besiedelung, um Exazerbationen zu verhindern.

Eine andere Hypothese wiederum postuliert die Akquirierung neuer Bakterien (-stämme), die nötig sind, um eine Exazerbation auszulösen. Die persistierenden Bakterien werden hierbei nur als „*innocent bystanders*“ bezeichnet, die zwar die chronische Inflammation aufrechterhalten und damit die Progression der Krankheit vorantreiben, aber nicht ursächlich für die akute Phase der Exazerbation sind (126, 121). Diese Hypothese wird durch Huang und Kollegen insofern bestätigt, da sie in ihren Analysen zeigen konnten, dass zum Zeitpunkt einer Exazerbation neue bakterielle Stämme eines der dominanten Keime nachweisbar waren (64).

Ob nun die Entstehung einer Exazerbation eng mit Akquirierung neuer Bakterienstämme der dominierenden Bakterienart vergesellschaftet ist, oder die reine quantitative Zunahme der Bakterien entscheidend ist, bleibt aktuell unklar. Denkbar wäre, dass beide Mechanismen in der Pathogenese der Exazerbation eine Rolle spielen und zusammen die

Inflammation steigern und das klinische Bild einer Exazerbation bedingen.

Dass Exazerbationen mit deutlich erhöhter systemischer und lokaler Inflammation assoziiert sind, konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden. Sputumanalysen von Patienten konnten erhöhte Werte von IL-8, TNF alpha, der Neutrophilen- Elastase und des CRPs im Serum ermitteln. Außerdem war die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten vermehrt (152). Die Mehrzahl der Exazerbationen sind mikrobiell getriggert. Papi et al. zeigten 2006, dass in 54,7 % der Fälle Bakterien als Ursache gefunden werden konnten. Viren wurden in der gleichen Studie mit 48,4 % detektiert, Mischinfektionen waren häufig. Neben Bakterien und Viren wird auch die zunehmende Luftverschmutzung als pathogener Faktor diskutiert (159). In ungefähr einem Drittel der Fälle kann allerdings keine Ursache festgestellt werden (55). Patienten, bei denen eine infektiöse Exazerbation bestand, zeigten eine ausgeprägtere Abnahme der Lungenfunktion, als Patienten, bei denen keine Erreger isoliert werden konnten. Zusätzlich fiel auf, dass die Schwere der Exazerbation mit der Höhe der Sputumneutrophilie korrelierte (100). Exazerbationen führen zu einer akzelerierten Progression der COPD und sind mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität verbunden (119, 36, 35). Hieraus ergibt sich die Rationale für eine antimikrobielle und antiinflammatorische Therapie und die Prävention der Exazerbation ist damit ein entscheidender Aspekt in der Therapie der COPD.

1.1.3 *Nontypeable Haemophilus influenzae* (NTHi) und die angeborene Immunantwort

Haemophilus influenzae (NTHi) ist ein gram-negatives fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium. Man unterscheidet zwei verschiedene Typen, den bekapselten und den unbekapselten oder auch nicht typisierbaren *Haemophilus (nontypeable Haemophilus influenzae, NTHi)*. Bei den bekapselten Erregern erfolgt die Typisierung nach unterschiedlichen Kapselantigenen. Die Einteilung erfolgte schon in den Dreißigerjahren von Magarete Pittman und hat auch heute noch ihre Gültigkeit. Es werden sechs Kapselserotypen a-f unterschieden (104).

Der unbekapselte NTHi besiedelt zu 50-80% vorwiegend die Schleimhäute des Respirationstraktes (151). NTHi ist Bestandteil der Standortflora, verursacht aber auch Infektionen wie Pneumonien, Otitis media, Sinusitis und Bakteriämien. Der bekapselte NTHi ist für die invasiven Infektionen, in der ersten Linie die Meningitis, verantwortlich. Im Rahmen der COPD ist NTHi der am häufigsten aus dem Sputum isolierte Keim

während der stabilen Phase und während einer Exazerbation (94, 114, 102, 67).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass die Makrophagenfunktion zur Abwehr von NTHi mittels Phagozytose und Cytokinfreisetzung bei Patienten mit COPD reduziert ist (145, 15). Andere Studien belegten, dass der Nachweis von NTHi aus Sputum von COPD Patienten mit erhöhtem Nachweis von Entzündungsmediatoren, wie TNF alpha, IL-8, IL-12 und IL-1 β , assoziiert ist. Klinisch zeigen diese Patienten einen schlechteren Allgemeinzustand im Vergleich zu Patienten ohne NTHi-Nachweis (86, 87).

NTHi zeichnet sich durch Virulenzfaktoren aus, die es erlauben den lokalen Komponenten des Immunsystems zu entgehen und an das respiratorische Epithel zu adhären und in Epithel und Mucosa einzudringen. Biofilmbildung (43, 141) und Veränderung der Antigeneigenschaften (30) scheinen NTHi vor dem Immunsystem zu schützen und eine Besiedelung zu ermöglichen. Viele Membranproteine vermitteln nicht nur eine Kolonisation, sondern auch die Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Typisch für gram-negative Bakterien wie NTHi sind Lipooligosaccharide (LOS) der äußeren Zellmembran. LOS wirken im menschlichen Körper als Endotoxine. Im Rahmen der angeborenen Immunreaktion werden LOS von Toll-like Rezeptor 4 erkannt. Durch Veränderung der LPS-Struktur kann NTHi dem lokalen Abwehrmechanismus entgehen und invasive Infektionen auslösen (142). Neben LPS, das zusammen mit CD14 von Toll-like Rezeptor 4 erkannt wird (161), ist auch das Membranprotein P6 (OMP P6) von Bedeutung. OMP P6 ist ein häufiges OMP von NTHi und aktiviert das angeborene Immunsystem über die Bindung an den Toll-like Rezeptor 2 (TLR2) (97, 131).

Toll-like Rezeptoren (TLR) sind Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, die als PRR (*Pattern Recognition Receptors*) bestimmte mikrobielle Strukturen, sog. PAMPs (*Pathogen Associated Molecular Pattern*) von Krankheitserregern erkennen. Die menschliche DNA kodiert für 11 unterschiedliche TLRs. Zuerst entdeckt wurden sie 1997 in der Fliege *Drosophila melanogaster* (89) und sind immer noch ein Gegenstand der aktuellen Forschung. Als Mechanismus der frühen Immunantwort sind TLRs auf Epithel- und Endothelzellen sowie auf Neutrophilen und dendritischen Zellen zu finden (101). Im Respirationstrakt findet man sie auf Alveolarzellen Typ II und Makrophagen (38). Nach Bindung an diese Rezeptoren resultiert eine Aktivierung des NF- κ B-Weges. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der für die Regulierung bestimmter Genabschnitte verantwortlich ist. In erster Linie handelt es sich um proinflammatorische Proteine, wie Interleukine, Chemokine und den Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) (131). Ein wichtiges Chemokin ist

Interleukin 8 (IL-8), ein CXC- Chemokin, welches in der Lage ist, weitere Abwehrzellen des Immunsystems, insbesondere neutrophile Granulozyten, anzulocken. Freigesetzt wird es unter anderem von Makrophagen und Neutrophilen. IL-8 spielt eine zentrale Rolle in der Pathogenese der COPD. Die IL-8 Konzentration im Sputum von Patienten mit COPD ist erhöht und korreliert mit der Schwere der Erkrankung (57). Die TNF- α -Produktion resultiert in einer weiteren Stimulation von Abwehrzellen, aber auch einer vermehrten Expression von TLR2-Rezeptoren (130, 70). Viele Studien untersuchten die Expression von Toll-like Rezeptoren im Sputum, Gewebe und Blut von COPD - Patienten. Nach Daten von Droemann et al. unterliegt die Expression des TLR2-Rezeptors bei Patienten mit COPD einer Negativregulation, da in humanen Alveolarmakrophagen aus bronchoalveolären Lavagen von COPD-Patienten die TLR2-Expression im Vergleich zu gesunden Kontrollen deutlich reduziert war. (39). Im Gegensatz dazu konnte eine andere Studie zeigen, dass der TLR2 auf peripheren Monozyten von COPD - Patienten vermehrt exprimiert wurde (106). Andere Autoren konnten dagegen eine Hochregulation von TLR2 auf Zellen des respiratorischen Epithels nach Gabe von inhalativen Kortikosteroiden nachweisen (62). Unumstritten ist, dass der TLR2 eine bedeutende Position im Rahmen der lokalen angeborenen Immunantwort einnimmt, da er in der Lage ist, verschiedene PAMPs zu erkennen und mit TLR1 und TLR6 Heterodimere zu bilden, um eine optimale Aktivierung des Immunsystems zu gewährleisten (108). Der TLR2-Rezeptor ist einer der meist untersuchten Rezeptoren in der Familie der Toll-like Rezeptoren im Rahmen der COPD, aber seine Bedeutung in der Pathogenese der COPD ist weiterhin nicht im Detail geklärt.

1.1.4 Antibiotische Therapie als Grundkonzept mit kausalem Ansatz zur Reduktion der Exazerbation

Da 50-60% aller Exazerbationen bakteriellen Ursprungs sind, ist die antibiotische Therapie eine wesentliche Säule der Therapie. Die Richtlinien nach Gold 2017 (55) empfehlen eine antibiotische Therapie, wenn ein Patient klinische Anzeichen einer bakteriellen Infektion mit folgenden Symptomen aufweist: vermehrte Dyspnoe, vermehrte Sputumproduktion, purulentes Sputum oder eine notwendige Beatmung. Die Auswahl des Antibiotikums richtet sich nach Schweregrad der Exazerbation und nach Vorhandensein von Risikofaktoren (Komorbiditäten, schwere COPD, häufige Exazerbationen (>3/Jahr) und antibiotische Therapie in den letzten 3 Monaten). Das zu erwartende Keimspektrum

variiert dabei je nach Schwere der Exazerbation. Die am häufigsten eingesetzten Antibiotika, je nach Schweregrad, sind Penicilline, Cephalosporine, Makrolide und Fluorchinolone, wobei letztere bei moderater bis schwerer COPD und Patienten mit Risikofaktoren zum Einsatz kommen (55).

Neben der Akuttherapie wurde eine antibiotische Therapie auch als kausaler Therapieansatz zur Vermeidung von Exazerbationen immer wieder kontrovers diskutiert. Seit dem Nachweis chronischer bakterieller Kolonisation in den Atemwegen von COPD - Patienten und der Erkenntnis, dass bakterielle Exazerbationen mit erhöhter Inflammation und respiratorischer Verschlechterung einhergehen (100, 93), wurde diskutiert, dass eine antibiotische Therapie nicht nur die akute Situation verbessern, sondern auch, durch Bekämpfung der bakteriellen Kolonisation die chronische Inflammation reduzieren kann, und somit das Risiko neuer Exazerbationen vermindern kann (85).

Im Jahre 2008 konnte Seemungal et al. in einer Studie mit dem Makrolid Erythromycin erste Erfolge erzielen. Erythromycin konnte die Anzahl der Exazerbationen bei Patienten mit moderater und schwerer COPD signifikant senken (120). Auch bei anderen Erkrankungen des Respirationstraktes, wie Zystischer Fibrose, Bronchiektasie und Asthma, waren Makrolide auch im Langzeitgebrauch wirksam, indem sie die Anzahl von Exazerbationen reduzierten und die Lungenfunktion verbesserten, um somit die Lebensqualität signifikant positiv zu beeinflussen (140, 105, 16, 92). In einer randomisierten Studie konnte Azithromycin als Langzeitprophylaxe über ein Jahr die Anzahl der Exazerbationen senken und somit auch die Lebensqualität verbessern. Allerdings traten in einem Anteil von 25% Hörminderung auf und es kam zu einer Kolonisation mit makrolidresistenten Bakterien (2). Auch andere Studien konnten die Entwicklung von makrolidresistenten Keimen, insbesondere im Rahmen der Langzeittherapie beobachten (82, 147). In einer anderen Studie im Rahmen der zystische Fibrose konnte zusätzlich unter Langzeittherapie mit einem Makrolid die Entwicklung von Infektionen mit nichttuberkulösen Mykobakterien beobachtet werden (44).

Makrolide verdanken ihren vermehrten Einsatz aber nicht nur ihrer antibakteriellen Wirkung, sondern auch ihren immunmodulatorischen Eigenschaften. Makrolide waren die ersten Antibiotika, die neben ihrem antimikrobiellen Wirkspektrum alleine oder in Kombination mit β -Lactam-Antibiotika eine immunmodulatorische Wirkung bei chronisch entzündlichen Prozessen in den Atemwegen zeigten (5). Bahnbrechend für die Erkennung dieser nicht-antibakteriellen Eigenschaften war der Einsatz der Makrolide bei der diffusen

Panbronchiolitis, wodurch das 10-Jahresüberleben von Patienten mit dieser seltenen Erkrankung von unter 40% auf über 90% gesteigert werden konnte. Sie waren unter anderem in der Lage, relevante Zytokine, wie zum Beispiel IL-8, TNF und IL-6, zu reduzieren (118). Schon im Jahre 1997 konnte Takizawa zeigen, dass die IL-8 mRNA in bronchialen Epithelzellen nach Inkubation mit Clarithromycin und Erythromycin reduziert war (144).

Mittlerweile ist eine ganze Reihe von immunmodulatorischen Effekten bekannt. Nicht nur die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wird beeinflusst, sondern auch die Mukusproduktion und -sekretion. Ebenso gibt es Hinweise darauf, dass sie direkt in Signalkaskaden eingreifen und die Expression von TLR-Rezeptoren regulieren (71, 171). Im Jahre 2007 konnten Shinkai et al. zeigen, dass Clarithromycin seinen immunmodulatorischen Effekt u.a. über die Aktivitätsänderung der Extracellular-signal Regulated Kinases (ERK) ausübt und so die weitere Signalkaskade bis hin zur Aktivierung von NFκB und folgender Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-8 beeinflusst (129).

Aufgrund der eingeschränkten Empfehlung zum Einsatz der Makrolide angesichts ihres Nebenwirkungsspektrums und der aktuellen Resistenzlage, gelangten andere nicht zellwandaktive Antiinfektiva, insbesondere die Fluorchinolone, in den Fokus (153).

Fluorchinolone der neueren Generation, wie Moxifloxacin und Levofloxacin, bewirken ihre antibakterielle Eigenschaft durch Hemmung der Gyrase und der Topoisomerase IV in der prokaryotischen Zelle. Diese Enzyme sind vergleichbar mit der Topoisomerase II in den menschlichen Zellen und für das Supercoiling der DNA und somit für die Replikation der DNA verantwortlich. Störung dieser Enzyme führt zu einer verminderten Syntheseleistung des Bakteriums. Chinolone wirken auf proliferierende Keime sekundär bakterizid. Als erstes Chinolon wurde Nalidixinsäure in den 60iger Jahren auf den Markt gebracht. Chemisches Grundgerüst aller Chinolone ist der sogenannte Chinolonring. Durch Einbringung anderer Substituenten, wie z.B. dem Fluoratom, konnte eine verbesserte antibakterielle Wirkung erreicht werden. Dieser Chinolonring bindet an die Gyrase, bzw. an die Topoisomerase und verhindert zum einen die Replikation der bakteriellen DNA und führt zum anderen zur Spaltung der DNA. Die Störung der Replikation führt zunächst zur bakteriostatischen Wirkung der Chinolone. Abhängig von der Konzentration kann es über Aktivierung eines sog. SOS-Programms zum programmierten Zelltod und somit zu einer bakteriziden Wirkung kommen. Die bakterizide Wirkung wird aber entweder abhängig

oder auch unabhängig von der Proteinsynthese über Fragmentierung des bakteriellen Chromosoms erreicht (37, 28, 3). Obwohl die menschliche Topoisomerase der bakteriellen ähnelt, haben Chinolone eine bis zu 1000 -fach stärkere Affinität gegenüber dem bakteriellen Enzym und interferieren nicht mit der menschlichen Topoisomerase (33, 63). Andere bakterizid wirkende Antibiotika mit weitverbreitetem Gebrauch sind die β -Lactam-Antibiotika. Im Vergleich zu den Chinolonen wirken sie über die Hemmung der Zellwandsynthese des Bakteriums bakterizid. Dabei binden sie an penicillinbindende Proteine, sogenannte Transpeptidasen, die für die Quervernetzung von Peptidoglykanfasern im Rahmen der Zellwandsynthese essentiell sind. Unter den Cephalosporinen zählt insbesondere Ceftriaxon zu den häufig eingesetzten Antibiotika bei pulmonalen Infektionen, da es ein breites Wirkspektrum im gram-positiven und gram-negativen Bereich besitzt, einmal täglich appliziert werden muss und gut verträglich ist (47). Weitere Effekte neben ihren antibakteriellen Eigenschaften, wie z.B. den Makroliden vergleichbare immunmodulatorische Eigenschaften konnte bei den Cephalosporinen allerdings nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz dazu konnten Dalhoff et al. (33) bei neueren Fluorchinolonen, wie Moxifloxacin und Levofloxacin analog zu den Makroliden immunmodulatorische Effekte beobachten. Fluorchinolone führen über eine Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP), sowie einer geringeren Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B zu einer Reduktion der TNF- α -Produktion. Damit verbunden ist eine verringerte Produktion von proinflammatorischen Mediatoren, wie z.B. Interleukinen und Chemokinen, insbesondere Interleukin-1, -6 und -8. Die besondere chemische Eigenschaft des Cyclopropyl-Substituenten am ersten Stickstoffatom soll für zusätzliche immunmodulatorischen Eigenschaften von Moxifloxacin (MFX), aber auch von Ciprofloxacin verantwortlich sein (34).

MFX ist ein Fluorchinolon der sog. vierten Generation. Durch mehrere chemische Veränderungen, wie Fluorsubstitution und einem Piperazinsubstituent, erreicht MFX im Vergleich zu anderen Chinolonen *in vitro* eine verbesserte Eigenschaft gegenüber gram-positiven und anaeroben Keimen. Das Wirkungsspektrum schließt die typischen Erreger von respiratorischen Infektionen ein. Auch gegen „atypische“ Erreger, wie *C. pneumoniae* und Mycoplasmen besteht eine hohe Aktivität (20, 73).

Die immunmodulatorischen Eigenschaften der Fluorchinolone, speziell des Moxifloxacins, wurden in weiteren Studien *in-vitro* mit denen anderer Antibiotika verglichen.

Zimmermann et al. konnten in mit TNF- α stimulierten humanen Bronchialepithelzellen zeigen, dass Moxifloxacin eine signifikante Reduktion der IL-8 Konzentration im Vergleich zu anderen getesteten Antibiotika bewirken kann. Die antiinflammatorische Eigenschaft von Levofloxacin war in dieser Studie deutlich geringer. Ceftriaxon, ein Cephalosporin der 3. Gruppe, zeigte sogar eine signifikante Erhöhung der IL-8 Konzentration (173).

Werber et al. konnten zeigen, dass Moxifloxacin direkt in Signalkaskaden von Toll-like Rezeptoren eingreift, so dass eine zytokininduzierte MAP-Kinasen- und NF- κ B-Aktivierung durch Moxifloxacin inhibiert wird. Im Vergleich zu Ciprofloxacin und Azithromycin konnte Moxifloxacin die Aktivierung von IL-8, IL-6, ERK1/2 und NF κ B im Lungenepithel bei zystischer Fibrose hemmen, sowie die MAP-Kinasen Aktivierung in der Zellkultur mit respiratorischem Gewebe (158, 17). In LPS-stimulierten Monocyten konnte unter Therapie mit Moxifloxacin eine geringere Produktion von proinflammatorischen Zytokinen beobachtet werden (8). In einer vergleichbaren Studie konnte eine reduzierte Produktion von TNF- α und IL-6 durch Moxifloxacin erreicht werden (29). Im Lungengewebe von Raten konnte gezeigt werden, dass unter Moxifloxacin die Reduktion von proinflammatorischen Zytokinen über eine Inhibierung von ERK1/2 und NF κ B erfolgt (76).

Mehrere Studien in der Vergangenheit untersuchten die Wirksamkeit von Moxifloxacin im Rahmen von COPD-Exazerbationen und verglichen sie mit anderen Antibiotika, wie Amoxicillin mit Clavulansäure (MAESTRAL)(163), Amoxicillin, Clarithromycin und Cefuroxim (MOSAIC (162, 164), oder Clarithromycin (TACTIC (165), die ebenfalls nach GOLD für die Therapie von Exazerbationen geeignet sind.

Die MOSAIC-Studie, wie auch die MAESTRAL-Studie verglichen als primären Endpunkt die Effektivität verschiedener Antibiotika in Bezug auf die klinische Symptomverbesserung und Heilungsrate bei Patienten mit Exazerbationen des gleichen Schweregrades. In beiden Studien zeigte MFX verglichen mit der jeweiligen Standardtherapie eine ähnlich gute Effektivität, aber keine Überlegenheit (162, 163).

Da die Prävention von Exazerbationen ein wichtiger Bestandteil in der Therapie der COPD ist, wurde die antibiotische Wirkung besonders im Hinblick auf die Langzeitprognose untersucht. In der MOSAIC-Studie konnte MFX, im Gegensatz zu den anderen getesteten Antibiotika, die Zeit zum Auftreten einer erneuten Exazerbation verlängern, die zwar statistisch signifikant war, aber im Vergleich nur wenige Tage beinhaltete. Ursächlich

hierfür wurden zum einen die reduzierte Inflammation mit geringerer Gewebeerstörung, zum anderen eine schnelle und komplette Eradikation mit nachfolgender längerer Zeitspanne bis zur nächsten Exazerbation verantwortlich gemacht (91, 162, 164).

Die MAESTRAL-Studie unterstützt zwar den Aspekt der besseren bakteriellen Eradikation durch MFX, aber über eine definitive Prävention von Exazerbationen durch MFX kann keine Aussage getroffen werden. Dennoch scheint MFX einen gewissen Benefit in der Therapie von bakteriell verursachten Exazerbationen zu haben, auch wenn eine Beeinflussung durch Komorbiditäten oder zusätzlicher Komedikation in diesen Studien nicht ausgeschlossen werden kann.

Ziel unserer Studie ist es, die immunmodulatorischen Eigenschaften von Moxifloxacin im humanen Lungengewebe zu untersuchen. Ein Effekt auf das angeborene Immunsystem und seine Rezeptoren könnte ein weiterer Hinweis dafür sein, dass Fluorchinolone nicht nur durch Eradikation von Bakterienstämmen antibakteriell und damit indirekt antiinflammatorisch in den Atemwegen wirken, sondern auch auf Rezeptorebene zu einer Modulation des Immunsystems führen und damit die angeborene Immunität unterstützen.

Hierfür untersuchten wir die Wirkung von Moxifloxacin im humanen Lungengewebe nach *in vitro*-Infektion mit NTHi hinsichtlich einer möglicher Immunmodulation. Exploratorische Experimente zum gleichen Thema wurden mit Ceftriaxon post hoc durchgeführt. Ein direkter Vergleich von Ceftriaxon und Moxifloxacin war aufgrund der später beschriebenen Limitationen der Arbeit primär nicht beabsichtigt. Die Experimente mit Ceftriaxon wurden lediglich exploratorisch post hoc durchgeführt.

Folgende Aspekte und Fragen waren dabei für unsere Studie von Bedeutung:

1.2 Fragestellung

1. Lässt sich durch unsere *in vitro*-Infektion mit NTHi eine adäquate Inflammation in humanem Lungengewebe erreichen?
Sind dabei proinflammatorische Zytokine nachweisbar?
2. Ist eine antiinflammatorische Reaktion nach Moxifloxacingabe zu beobachten?
3. Gibt es Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Expression des TLR2-Rezeptors?

2 Material und Methoden

2.1 Lungengewebe

Um die Wirkung der antibiotischen Therapie sowie die immunmodulatorischen Fähigkeiten der eingesetzten Antibiotika zu untersuchen, verwendeten wir humanes Lungengewebe von Patienten, die sich aufgrund eines pulmonalen Herdbefundes einer Lobektomie, bzw. einer atypischen Lungenresektion in der Klinik für Chirurgie des UKSH, Campus Lübeck, unterzogen. Die Patienten wurden vor dem geplanten Eingriff über unsere Studie aufgeklärt und gaben ihre schriftliche Einwilligung. Die Verwendung des Lungengewebes der Patienten wurde von der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vorher geprüft und bewilligt (Ethikantrag: Az 08-131). Im Institut für Pathologie wurden unter sterilen Bedingungen und nach Abgrenzen des Tumorareals tumorfreie Präparate zugeschnitten. Für die Versuche wurde das Gewebe in 0,3 bis 0,4 g schwere Stückchen zugeschnitten und anschließend für die weitere Stimulation zunächst im zusatzfreien RPMI-Medium (500 ml RPMI 1640 Firma Biochrome) gelagert.

Nach Abschluss der Stimulationen wurde das Gewebe in HOPE-Lösung (*Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect*) fixiert, die sich im Vergleich zu Formalin durch eine bessere DNA- und Proteinbindung auszeichnet.

Für die Stimulationen wurden ausschließlich Proben von Material aus anatomischen Resektaten von Patienten verwendet. Dabei galten folgende Ausschlusskriterien:

1. Bei der Beurteilung durch den Pathologen konnte kein sicher tumorfreies Gewebe identifiziert werden.
2. Die Beschaffenheit des Gewebes war aus anderen Gründen makroskopisch unzureichend und nicht für valide Stimulationen geeignet (kein erkennbar vitales Gewebe, fibrotisches Gewebe, Emphysem, Einblutungen). Die Beurteilung vor der Stimulation erfolgte immer zusätzlich durch eine zweite Person (Dr. Kristina Rohmann).
3. Patienten mit klinischen Hinweisen auf oder makroskopischen Zeichen einer aktiven bronchopulmonalen Infektion wurden nicht eingeschlossen, um eine mögliche aktive NTHi-Infektion auszuschließen.

Das Lungengewebe wurde über einen Zeitraum von 12 Monaten gesammelt. Die Lungenresektate wurden von einer geschulten Mitarbeiterin während der Operation aus dem OP-Saal abgeholt und auf direktem Weg nativ in die Pathologie gebracht. Durch den Pathologen wurde das Lungengewebe unverzüglich bezüglich des makroskopisch tumorfreien Anteils beurteilt. Der nicht für die weitere pathologische Untersuchung benötigte Teil konnte für unsere Stimulationen freigegeben werden. Das Lungengewebe wurde anschließend sofort für unsere Stimulationen verarbeitet. Konnte ein Resektat nicht mehr der Pathologie übergeben werden (lange OP-Zeit in Randzeiten) wurde dieses von uns in Formalin fixiert und der Pathologie am nächsten Tag übergeben. Mit diesem Material wurde keine Stimulation mehr durchgeführt.

2.1.1 Stimulation mit Moxifloxacin und Ceftriaxon in humanem Lungengewebe

Der Einfluss von MFX (400 mg/250 ml, Firma Bayer) und CEF (2g, Firma SAAR) auf die IL-8-Sekretion im NTHi-stimulierten Lungengewebe sollte in folgendem Versuch untersucht werden. Hierfür wurde das entnommene Lungengewebe in 0,3-0,4g schwere Stückchen geschnitten, auf einer 24-well-Platte verteilt und mit 2 ml der vorbereiteten Infektionslösung (NTHI 1×10^6 cfu/ml) infiziert. Direkt danach erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Antibiotikum.

Die Probenmenge von 0.3-0.4g hat sich in Vorstudien mit diesem Modell als ausreichend und als praktikabel für die Inkubation in der Gewebekulturplatte herausgestellt (40, 167).

Eine Abweichung von maximal 25% wurde dabei toleriert, da von einer zufälligen Verteilung der Gewebstücke auf die Kulturplatte auszugehen war. Das Modell ist mit dem hier beschriebenen Procedere mehrfach in internationalen Journalen, einschließlich der hier genutzten Technik, publiziert (115, 41).

Pro Stimulation wurden mindestens zwei Stücke und maximal sechs Lungenstücke an Lungengewebe verwendet. Aufgrund der limitierten Materialausbeute wurde in den ersten 6 Versuchen nur mit MFX zu unterschiedlichen Zeitpunkten stimuliert (s. Stimulationsplan), um eine ausreichende Basis für die Interpretation der

immunmodulatorischen Eigenschaften dieser Substanz zu erreichen. Die CEF Stimulationen erfolgten dann ergänzend post hoc und nicht im direkten Vergleich zu MFX. Eine vergleichende Betrachtung der Ergebnisse wurde in dieser Arbeit daher durchgehend vermieden.

Zu den Lungenstückchen wurden jeweils Konzentrationen von 0,01 mg/ml und 0,1 mg/ml beider Antibiotika 15 Minuten (t_0) vor der Infektion mit NTHi ins Medium, bzw. nach 15 Minuten (t_1) und 60 Minuten (t_2) gegeben. Die jeweiligen Stammlösungen für Moxifloxacin und Ceftriaxon wurden mit jeweils 250 ml Kochsalzlösung angesetzt. Die jeweiligen notwendigen Volumina um die unterschiedlichen Konzentrationen zu erreichen wurden hierfür direkt aus der Stammlösung entnommen. Antibiotika und NTHi wurden immer direkt in das well gegeben. Um Pipettierfehlern bei geringen Konzentrationen vorzubeugen, wurden 10 ml Konzentrationslösungen hergestellt, aus denen direkt 2 ml in das jeweilige well pipettiert werden konnten. Anschließend wurde die Platte kurz geschwenkt, um eine bestmögliche Vermischung und Benetzung des Lungengewebes zu erzielen.

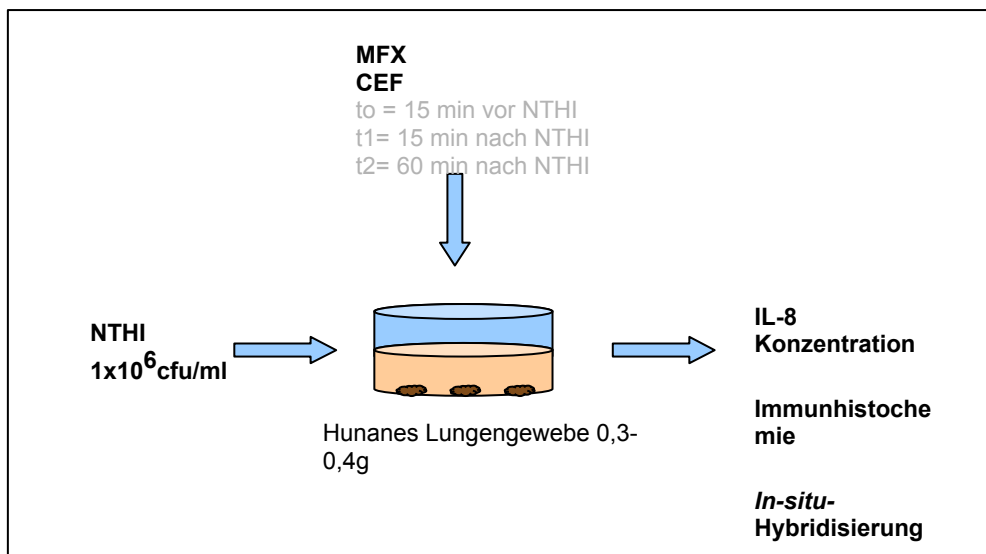


Abbildung (4): Infektionsmodell

Anschließend erfolgte eine Inkubation für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Danach wurden die Überstände gesammelt und bei 3000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert.

Der zellfreie Überstand wurde dann in Reaktionshütchen aliquotiert und bei -70°C für die ELISA-Messung gelagert.

Stimulationsplan für MFX (N=6)									
t_0	Med.+ FCS n=6	0,01 mg/ml n=5	0,1 mg/ml n=5						
+ NTHi 10^6 cfu/ml 24h n=6					- NTHi-Inkubation				
t_1	Med.+ FCS n=6			0,01 mg/ml n=6	0,1 mg/ml n=6			0,01 mg/ml n=6	0,1 mg/ml n=6
t_2	Med. + FCS n=6					0,01 mg/ml n=6	0,1 mg/ml n=6		

Inkubation (37°C , 5 % CO_2) 24 Stunden

Stimulationsplan für CEF (N=4)											
t_0	Med. + FCS n=4	0,01 mg/ml n=1	0,1 mg/ml n=1				0,01 mg/ml n=1	0,1 mg/ml n=1			
+ NTHi 10^6 cfu/ml 24h n=4					- NTHi-Inkubation						
t_1	Med. + FCS n=4			0,01 mg/ml n=4	0,1 mg/ml n=4			0,01 mg/ml n=2	0,1 mg/ml n=2		
t_2	Med. + FCS n=4					0,01 mg/ml n=4	0,1 mg/ml n=4			0,01 mg/ml n=1	0,1 mg/ml n=2

Inkubation (37°C , 5 % CO_2) 24 Stunden

Abbildung (5): Stimulationspläne mit NTHi und den Zeitpunkten der Antibiotika-Applikation.

Die Stimulationen für die jeweiligen Antibiotika wurden zeitgleich auf einer, bzw. zwei Well-Platten durchgeführt.

N= Gesamtanzahl der Lungen; n= Anzahl der durchgeführten Stimulationen, Med. = Medium

Die Tatsache, dass nicht jede Lunge jeder Stimulation unterzogen werden konnte, lag an der unterschiedlichen Menge an verfügbarem Lungengewebe. Dem Medium (RPMI 1640 ohne L-Glutamin, Firma PAA) wurde für die Stimulationen FCS (*Fetal Calf Serum*, Biochrome AG) hinzugefügt.

Antibiotikagaben in zwei Konzentrationen (0,1 mg/ml, 0,01 mg/ml) zu folgenden Zeitpunkten: t_0 =15 min. vor NTHi-Stimulation; t_1 = 15 min. nach NTHi-Stimulation; t_2 = 60 min. nach NTHi-Stimulation; die rechte Spalte beinhaltet Stimulationen, denen nur Antibiotika zugefügt wurde.

Nach Abschluss der Stimulationen wurden die Lungenstückchen in HOPE-Lösung fixiert und für Untersuchungen mittels Immunhistochemie sowie *In-situ*-Hybridisierung

aufbewahrt.

2.2 NTHi

Der Erreger für die Infektion wurde uns vom Institut für Mikrobiologie und Hygiene des UKSH, Campus Lübeck zu Verfügung gestellt. *Nontypeable Haemophilus influenzae* (NTHi Isolat B5144 vom 20.06.2002 eines COPD Patienten mit invasiver Pneumonie, in der 16S rRNA-Sequenzierung typisiert als Stamm Rd KW20) hat einen Bedarf an speziellen Wachstumsfaktoren aus dem Blut. Es benötigt Hämin (= X-Faktor) und NAD/P (= V-Faktor) zum Wachstum. Eine Anzucht ist daher auf normalem Blutagar nur unter dem sog. Ammen- oder Satellitenphänomen möglich, bei dem *Staphylococcus aureus* mittels Hämolyse die benötigten oben genannten Wachstumsfaktoren bereitstellt. Idealerweise erfolgt die Anzüchtung von NTHi auf sogenanntem Kochblutagar. Dieser entsteht wiederum durch das Erhitzen von Blutagar auf 80°C, wodurch dann die benötigten Wachstumsfaktoren Hämin und NAD/P aus den Erythrozyten freigesetzt werden. Das sogenannte Ammenphänomen ist dann nicht notwendig. Für unsere Versuche verwendeten wir ausnahmslos auf Kochblutagar gezüchteten NTHi. Eine Überimpfung des Erregers erfolgte alle 24h durch fraktioniertes Ausstreichen mittels Drei-Ösen-Ausstrich. Für die Verwendung des Erregers erfolgte eine Einstellung der Erregerkonzentration nach der McFarland-Methode. Nach der Herstellung einer Erregersuspension in 0.9% Natriumchloridlösung wird in einem Densitometer die Trübung gemessen und der McFarland-Wert (McF) bestimmt. Wir verwendeten in unserer Studie einen McF von 0,5, was einer Bakterienanzahl von 1×10^8 cfu/ml entspricht. Solange die Erreger in einer konstanten durchschnittlichen Größe in der Suspension vorliegen, kann in einem Bereich von 0,5 bis 10, welcher 30×10^8 cfu/ml entspricht, von einer linearen Beziehung zwischen optischer Dichte und Keimzahl ausgegangen werden. Nach einer 1:100 Verdünnung mit FCS-haltigem (*Fetal Calf Serum*, Biochrome AG), Anzuchtmedium (RPMI 1640 ohne L-Glutamin, Firma PAA) erhielten wir so unsere für die Infektion erforderliche Erregerkonzentration von 1×10^6 cfu/ml. Vorausgegangene Versuche in unsere Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass mit 10^6 cfu/ml eine optimale Infektion im Lungengewebe erzielt werden konnten, ohne dass nennenswerte gewebstoxische Effekte

auftraten.

In einer Untersuchung von K. Rohmann konnten die maximalen Stimulationseffekte hinsichtlich der IL-8-Konzentration in humanem Lungengewebe mit einer Konzentration von 10^6 cfu gezeigt werden. Mit einer Konzentration von 10^7 cfu konnte die Infektion kaum merklich gesteigert werden. Untersuchungen mittels LDH-Elisa zeigten darüber hinaus im Vergleich zu den Mediumwerten keine zusätzliche Zytotoxizität (113).

Zusätzlich konnten bronchoskopische Untersuchungen zeigen, dass im Rahmen von Exazerbationen Erregerkonzentrationen von 10^5 bis 10^6 cfu/ml in den Atemwegen erreicht werden, während bei Kolonisation im stabilen Zustand der COPD eine deutlich geringere Keimzahl von 10^3 bis 10^4 cfu/ml die unteren Atemwege besiedelt (94, 124, 22, 93). Aufgrund dieser Datenlage verwendeten wir in unseren Versuchen NTHi 10^6 cfu/ml, um zytotoxische Effekte möglichst gering zu halten und trotzdem eine der klinischen Situation vergleichbare Infektionsdosis im Lungengewebe *in vitro* zu erzielen.

2.3 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Sezernierte Chemokine oder Cytokine können mittels Immunsorbenstest in einer direkten oder indirekten Form nach dem Prinzip der Antigen-Antikörperreaktion nachgewiesen werden. Die in unserer Studie benutzte Methode erlaubt den indirekten Nachweis nach dem Prinzip der Sandwich-Methode mittels eines zusätzlichen fluoreszierenden Sekundärantikörpers.

Für den Nachweis sezernerter Proteine im stimulierten humanen Lungengewebe wurden die zellfreien Überstände in Eppendorfhütchen als Aliquots von mindestens 160µl bei -70°C eingefroren und aufbewahrt.

Für den Zytokinnachweis mittels ELISA werden 96-Lochplatten 12-24h vorher mit dem Capture-Antikörper (100µl/well) beschichtet und für mindestens 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Dann werden die Platten gewaschen und geblockt, um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern. Bevor die Proben auf die Platten pipettiert werden können, werden die Platten erneut gewaschen und die Proben dann als Doppelwerte hineinpipettiert. Während der Inkubationszeit erfolgt die Bindung des spezifischen Proteins als Antigen an den jeweiligen Antikörper. Anschließend werden die

Platten erneut gewaschen und der Detection-Antikörper aufgetragen. Nach einem weiteren Waschschrift wird Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase, *engl. horseradishperoxidase*) in jedes well pipettiert. HRP bindet an diesen Antikörper und im Folgeschritt katalysiert HRP den Farbumschlag eines Substratkomplexes, der sich in einer Farbreaktion zeigt und dessen Extinktion gemessen werden kann. Nach dem Prinzip des Lambertschen Gesetzes wird dann die Konzentration des zu untersuchenden Stoffes in Bezug auf die Standardkurve in pg/ml berechnet.

2.4 LDH-Zytotoxizitätstest

Um zytotoxische Einflüsse durch unsere Versuchsbedingungen auszuschließen, bestimmten wir mittels ELISA die Lactatdehydrogenasekonzentration (LDH) in jedem unserer Reaktionsansätze. LDH ist ein im Zytoplasma vorkommendes Enzym, welches bei Zellschädigung oder Zelltod freigesetzt wird. Folgende Reaktion wird von der LDH katalysiert:



Zur Messung werden die Proben zunächst wie bei dem oben beschriebenen Sandwich-ELISA in eine 96-Lochplatte pipettiert. Anschließend wird das Substrat hinzugegeben. Die Reaktionkomponenten bestehen aus dem Koenzym NAD und dem eigentlichen Substrat Tetrazoliumchlorid und Laktat. Es kommt zum Farbumschlag. Tetrazoliumchlorid wird mittels LDH zu Formazon reduziert. Dabei korreliert die Menge der LDH- Freisetzung im Gewebe mit der Höhe der Formazonkonzentration, welche dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm analog zum beschriebenen IL-8 ELISA gemessen wird.

2.5 HOPE[®] (*Hepes-Glutamic acid buffer mediated Organic solvent Protection Effect*)-Fixierung

Nach Abschluss der Stimulationen wurden die Lungenstückchen in HOPE[®]-Lösung fixiert, um für die weiteren Untersuchungen mittels *In-situ*-Hybridisierung (ISH) und Immunhistochemie zur Verfügung zu stehen.

Die HOPE[®]-Lösung (56) zeichnet sich im Gegensatz zu anderen Fixierungstechniken

dadurch aus, dass die Gewebemorphologie, darunter auch Strukturproteine und Nukleinsäuren, in ihrer nativen Struktur erhalten bleiben. Die Lungenstücke werden hierfür mit dem 10-fachen Volumen der ursprünglichen Mediummenge inkubiert, was bei einer Mediummenge von 2 ml, 20 ml pro Lungenstückchen ergibt. Das Gewebe wird ca. 12-72 Stunden in der HOPE®-Lösung I inkubiert. Anschließend wird zunächst die HOPE®-Lösung entfernt und 5ml einer Acetonlösung, bestehend aus 100 ml Aceton und 100 µl HOPE®-Lösung II, zu dem Lungengewebe gegeben und 2 Stunden bei 0-2 °C inkubiert. Nach der Inkubation wird die Acetonlösung verworfen und das Röhrchen mit dem Lungengewebe wir nun mit reinem Aceton übergossen und erneut für 2 Stunden inkubiert. Dieser Vorgang wird im Verlauf zweimal wiederholt, um eine optimale Dehydratation zu erreichen. Nach insgesamt acht Stunden wird die Lösung verworfen und vorgewärmtes niedrigschmelzendes Paraffin (Medite Tissue Wax, Schmelzpunkt 52-54°C, Firma Medite) dazugegeben. Anschließend erfolgt eine Inkubation im Brutschrank bei exakt 54-55 °C über Nacht. Die Paraffinierung ist am nächsten Morgen abgeschlossen. Die Lungenstücke werden auf einer Wärmeplatte unter Zugabe von frischem Paraffin ausgebettet. Die fertigen Gewebestücke werden dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C für 30 Minuten vorgekühlt, um dann mit einem Mikrotom geschnitten zu werden. In der Zwischenzeit werden zwei sogenannte Streckbäder mit Aqua dest. vorbereitet. Die Schnitte werden zunächst in Streckbad I (Aqua dest. Raumtemperatur) gesammelt und dann mit einem gereinigten oder beschichteten Objektträger herausgenommen. Die Schnitte werden nun einzeln in Streckbad II (Aqua dest., 35-50°C) ausgezogen. Sobald der Schnitt gerade auf dem Objektträger liegt, werden alle Wasserrückstände gut entfernt und die Objektträger bei 37 °C im Brutschrank über Nacht gelagert. Zum Entparaffinieren werden die Objektträger mit den Gewebeschnitten für 10 Minuten in warmes Isopropanol (60°C) gestellt und danach mit frischem Isopropanol abgewaschen und luftgetrocknet. Zum Rehydratisieren werden die Schnitte zweimal für 10 Minuten mit 70%igem kühlenschrankkaltem Aceton im Kühlschrank inkubiert. Dazwischen werden die Schnitte mit Aqua dest. gewaschen und zum Abschluss für 5 Minuten darin stehen gelassen.

2.6 Haematoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Die rehydratisierten Schnitte werden für 2-4 Minuten in die Hämalaun-Lösung gestellt, danach mit Aqua dest. abgespült und in eine weitere Küvette mit Aqua dest. für 5 Minuten gestellt. In dieser Küvette lässt man die Schnitte 1-2 Minuten unter fließendem Leitungswasser bläuen. Anschließend werden die Schnitte je nach Intensität 2-4 Minuten in der Eosin-Farblösung angefärbt. Danach erfolgt eine zweimalige Waschung mit Aqua dest.. Dann werden die Schnitte durch zwei Küvetten mit 70%igem Isopropanol gezogen und durch 2 Küvetten mit absolutem Alkohol, um schließlich 10 Minuten in absolutem Alkohol zu inkubieren. Die Schnitte werden zum Eindecken vorher noch mit Xylol abgespült und ebenfalls für 5 Minuten in Xylol inkubiert.

2.7 TLR-2 Rezeptornachweis mittels Immunhistochemie in humanem Lungengewebe

Toll-like Rezeptoren (TLR), wie TLR2 spielen in der angeborenen Immunantwort als einer der ersten Abwehrmechanismen eine wichtige Rolle. Um deren Expression im Lungengewebe und mögliche Einflüsse der antibiotischen Therapie auf ihre Expression zu untersuchen, verwendeten wir die Immunhistochemie an HOPE – fixiertem Material.

Die Immunhistochemie ist eine Methode, durch die Gewebsproteine mit Antikörpern sichtbar gemacht werden können. Dabei kann das Protein auch dem jeweiligen Zellkompartiment zugeordnet werden. Auch in der Immunhistochemie werden Antigen-Antikörperreaktionen mit einem Primärantikörper erzeugt, die dann mit einem Sekundärantikörper mittels enzymatischer Farbreaktion nachgewiesen werden. Für unsere Studie wurde ein Polymer-System mit kovalent gebundenem Sekundärantikörper und Enzym (Firma Zytomed-Systems) verwendet. Diese Untersuchungen wurden von Prof. Dr. Goldmann (Klinische und Experimentelle Pathologie, Forschungszentrum Borstel) nach folgendem Prinzip durchgeführt:

Das zu untersuchende Lungengewebe wird fixiert (s.o.) und anschließend zur Blockierung der endogenen Peroxidase für 10 Minuten in 3% H₂O₂ inkubiert. Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu vermeiden, wird das Gewebe mit einem speziellen Blockpuffer behandelt und mit Trispuffer gespült. Im Anschluss erfolgt die Inkubation mit

einem speziellen Primärantikörper für den TLR2-Rezeptor.

Nach einem erneuten Waschschrift wird der Sekundärantikörper hinzugegeben. Dabei handelt es sich um ein HRP-Polymer, bei dem der Sekundärantikörper an das freie Fc-Fragment des Primärantikörpers bindet und nach Zugabe von Substratlösung (Chromogen) die enzymatische Reaktion katalysiert. Es bildet sich ein rotbraunes Reaktionsprodukt, das den TLR2-Rezeptor rötlich im mikroskopischen Lungengewebschnitt erscheinen lässt.

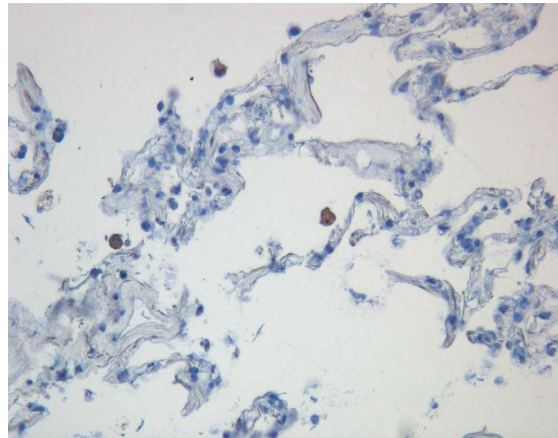


Abbildung (6): Beispiel für TLR2-Rezeptornachweis mittels Immunhistochemie im unstimulierten humanen Lungengewebe. Es zeigen sich nur wenige Alveolarmakrophagen mit rot gefärbten TLR2-Rezeptoren. (Anti-Digoxigenin-Mausantikörper, 400 fache Vergrößerung)

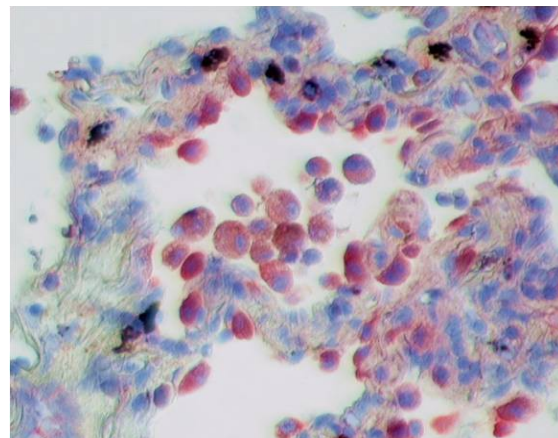


Abbildung (7): Nach Stimulation mit NTHi 10⁶ cfu über 24h kommt der TLR2-Rezeptor mittels Immunhistochemie deutlich rot angefärbt auf der Oberfläche der Mehrzahl der Alveolarmakrophagen sowie auf Alveolarepithelzellen zur Darstellung. (Anti-Digoxigenin-Mausantikörper, 400 fache Vergrößerung)

2.8 IL-8 *In-situ*-Hybridisierung (ISH) in humanem Lungengewebe

Die *In-situ*-Hybridisierung ist eine molekularbiologische Methode um Nukleinsäuren (mRNA und DNA) in Geweben nachzuweisen. Dabei werden Sonden eingesetzt, die dem jeweiligen Nukleinsäureabschnitt komplementär sind.

Goldmann et al. (56) haben speziell für in HOPE-Lösung fixiertes Gewebe das nachfolgende Protokoll für die mRNA-*in-situ*-Hybridisierung erstellt:

Zunächst werden die Objektträger mit den Gewebeproben in Digoxigenin-Waschpuffer (DIG-puffer) gewaschen und zur Blockierung der unspezifischen Bindungen in Blocking Reagent (1%) Maleinsäure inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgt die Detektion mit Phosphatase-konjugierter anti-Digoxigenin-Antikörper in Blocking Reagent. Danach werden die Objektträger erneut gewaschen. Die detektierten Bereiche werden mit speziellen Chromogenen in einer Farbreaktion sichtbar gemacht. Zum Nachweis von mRNA mittels Farbreaktion benutzt man Neo-Fuchsin als Chromogen für die alkalische Phosphatase. Zum Nachweis von DNA wird AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) als Chromogen für die Farbreaktion mit Streptavidin-HRP verwendet. Nach Beendigung der Farbreaktion erfolgt bei mRNA- und DNA-*in situ*-Hybridisierung eine Gegenfärbung mit Mayers Haemalaun, sowie eine Eindeckung mit Kaysers Glyceringelatine. Diese Untersuchungen wurden ebenfalls von Prof. Dr. Goldmann (Klinische und Experimentelle Pathologie, Forschungszentrum Borstel) durchgeführt.

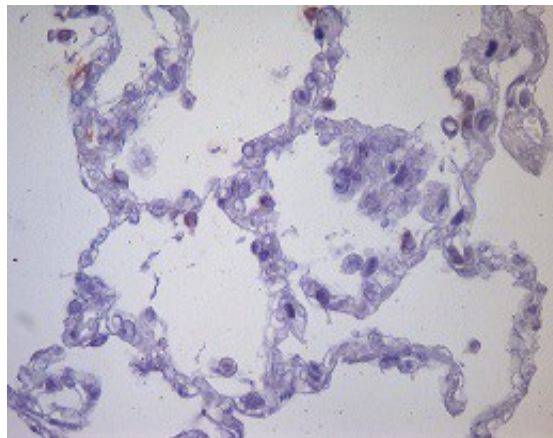


Abbildung (8): Repräsentatives Beispiel für den IL-8 Nachweis mittels *in situ*-Hybridisierung im humanen Lungengewebe. Im unstimulierten Lungengewebe zeigt sich in dieser Technik keine IL-8 Expression. (Anti-Digoxigenin-Mausantikörper, 400 fache Vergrößerung)

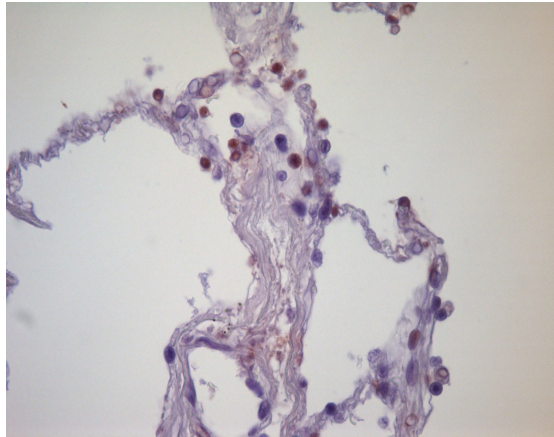


Abbildung (9): Repräsentatives Beispiel für IL-8 Nachweis mittels situ-Hybridisierung in humanem Lungengewebe.. Nach Stimulation mit NTHi 10^6 cfu über 24h zeigt sich eine deutliche IL-8 Expression auf Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelzellen, erkennbar an der rotbraunen Färbung. (Anti-Digoxigenin-Mausantikörper, 400 fache Vergrößerung)

2.9 Statistische Analysen

Die Ergebnisse der Versuche werden im Folgenden als Mittelwert +/- Standardabweichung des Mittelwertes (SD, *standard deviaton*) angegeben.

Zunächst sollte die Analyse der Il-8 Konzentrationen deskriptiv erfolgen. Wir verglichen dabei die resultierenden Il-8-Konzentrationen nach NTHi Stimulation mit der nach zusätzlicher Kostimulation mit Antibiotikum in verschiedenen Konzentrationen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

Die anschließenden Signifikanzprüfungen für die Stimulationsversuche wurden mittels 2-Weg- ANOVA und nachfolgendem post-hoc Test nach Tukey-Kramer durch das Institut für Biometrie und Datenmanagement des Universitätsklinikum Freiburg, Dr. rer. nat. Claudia Schmoor, durchgeführt. Es wurden in separaten Analysen der beiden Antibiotika die Zeit und die Konzentration in Modellen für Messwiederholungen geprüft. Hierfür wurden die Il-8-Werte nach Kostimulation mit dem jeweiligen Antibiotikum der IL-8-Konzentration nach NTHi-Stimulation gegenüber gestellt. Es lagen für MFX (CEF) Daten von 6 (4) Patienten mit je 5 Messungen vor. Auffällige Abweichungen von den Annahmen zeigten sich nicht. Die Ergebnisse der statistischen Tests sind jedoch nicht konfirmatorisch, sondern deskriptiv zu interpretieren, da keine formale Planung einer konfirmatorischen

Testprozedur und entsprechender Stichprobengröße vor Beginn der Experimente durchgeführt wurde.

Die statistische Berechnung erfolgte mit Statistical Analysis System (SAS). Dabei gelten Ergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant. Die graphische Darstellung erfolgte anschließend mit Adobe Illustrator.

3 Ergebnisse

3.1 Patientendaten

Für die Versuche in humanem Lungengewebe wurde im Rahmen thoraxchirurgischer Eingriffe Gewebe von 10 Patienten entnommen (mittleres Alter 66 Jahre (27-77), 7 Männer, 3 Frauen). Die Indikation zum operativen Eingriff war entweder eine notwendige Lungenteilresektion bei einem pulmonalen Herdbefund oder die therapeutische Resektion von Lungengewebe bei bestehendem Pneumothorax. Bei keinem der 10 Patienten bestand zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme eine akute Infektion. Die während des stationären Aufenthaltes erhobenen Daten sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Die Lungen 1-6 wurden mit Moxifloxacin (MFX), die restlichen 4 Lungen mit Ceftriaxon (CEF) stimuliert. Die Lungen 5 und 6 der CEF-Versuche waren schon vor der Stimulation in einem mangelhaften Erhaltungszustand, so dass keine adäquate Stimulation erreicht werden konnte. Zudem stand zu wenig Material zu Verfügung, so dass nicht alle Stimulationen durchgeführt werden konnten. Diese Experimente wurden daher in der Auswertung nicht berücksichtigt.

Lunge	m / w	Alter	COPD-Stadium	FEV ₁ (%) / (L)	FVC (L)	FEV ₁ /FVC (%)	MEF 25 (l/s)	MEF25 (%)	Raucherstatus	Steroide
1	m	74	keine	89 / 2,40	2,8	78	1,28	107	k.A.	keine
2	w	75	keine	81 / 1,62	1,93	84	1,00	105	k.A.	keine
3	m	73	keine	92 / 3,16	3,93	81	1,80	110	k.A.	keine
4	m	76	II	53 / 1,51	2,08	73	0,66	52	140 p/y	keine
5	m	69	keine	116 / 3,62	4,66	78	0,93	63	40 p/y	keine
6	w	70	II	54 / 1,12	2,11	53	0,43	40	ja	keine
7	w	57	keine	83 / 1,90	2,55	75	1,27	93	k.A.	keine
8	m	60	keine	71 / 2,24	2,50	88	1,04	65	100 p/y	keine
9	m	27	keine	73 / 3,43	3,07	112	2,62	93	ja	keine
10	m	77	keine	62 / 1,93	2,42	80	0,75	53	k.A.	keine

Abbildung (10): Klinische Daten der Patienten

Laut der einsehbaren Patientenakten erhielten die Patienten keine immunsuppressive Therapie. Bei zwei der Patienten war die Indikation zur Lobektomie aufgrund einer Metastase eines vorangegangenen Cervixcarzinoms, bzw. eines Urothel-Carcinoms gestellt worden. Bei erstgenanntem erfolgte eine vorherige Antitumorthherapie, bestehend aus Radiatio und Chemotherapie, die 6 Jahre zurück lag. Beim Urothel-Carcinom erfolgte eine

BCG-Instillation. Bei einem weiteren Patienten bestand eine Lungenmetastase aufgrund eines Melanoms, welches zwei Jahre zuvor reseziert wurde. Eine systemische Antitumortherapie bestand hier nicht. Die Patienten erhielten zum Teil eine Medikation zur Reduktion des kardialen Risikoprofils. Nur bei zwei der 10 untersuchten Patienten konnte eine COPD nachgewiesen werden. Im GOLD Stadium II war bei beiden keine Therapie mit Kortikosteroiden notwendig, sondern es erfolgte die leitliniengerechte Therapie mit Tiotropiumbromid und/oder einem langwirksamen Beta-2-Agonisten.

Lediglich bei einem der oben genannten Patienten war eine antibiotische Therapie (Piperacillin/Tazobactam) bei einer poststenotischen Pneumonie im Rahmen des Bronchialkarzinoms indiziert. Dieser Patient wurde infolge der konsekutiven Verteilung der Antibiotikagabe der CEF - Gruppe zugeordnet. Die Piperacillingabe erfolgte wegen bronchopulmonalen Infektes, der zum Zeitpunkt der Operation nach klinischen Kriterien und nach Begutachtung des Resektats abgeklungen war. Ein mikrobiologischer Nachweis eines ursächlichen Keims gelang nicht. Eine Kontamination des Resektats mit vermehrungsfähigem NTHi (primäre Aminopenicillin/Ureidopenicillin-Empfindlichkeit von *H. influenzae* zu dieser Zeit um 90%) ist daher zwar nicht auszuschließen, aber sehr unwahrscheinlich. Eine Resistenzentwicklung des bei der *in vitro* Infektion eingesetzten NTHi Stammes innerhalb von 24h ist nicht anzunehmen.

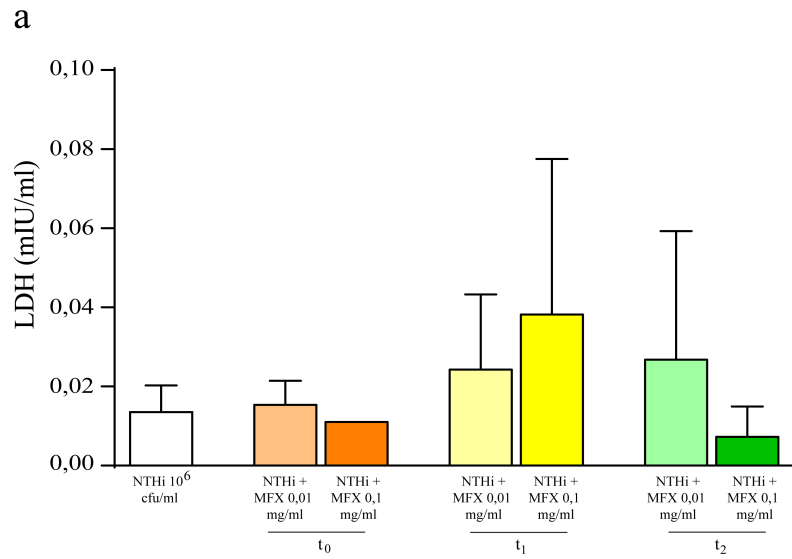
Ein weiterer litt unter einer chronisch entzündlichen Darmerkrankung, die derzeit in Remission befindlich war und zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme keiner immunsuppressiven Therapie bedurfte. Ansonsten erhielten die Patienten eine medikamentöse Dauertherapie zur Reduktion des kardiovaskulären Risikoprofils.

3.2 Zytotoxizität in humanem Lungengewebe nach NTHi- Infektion und Kostimulation mit MFX oder CEF

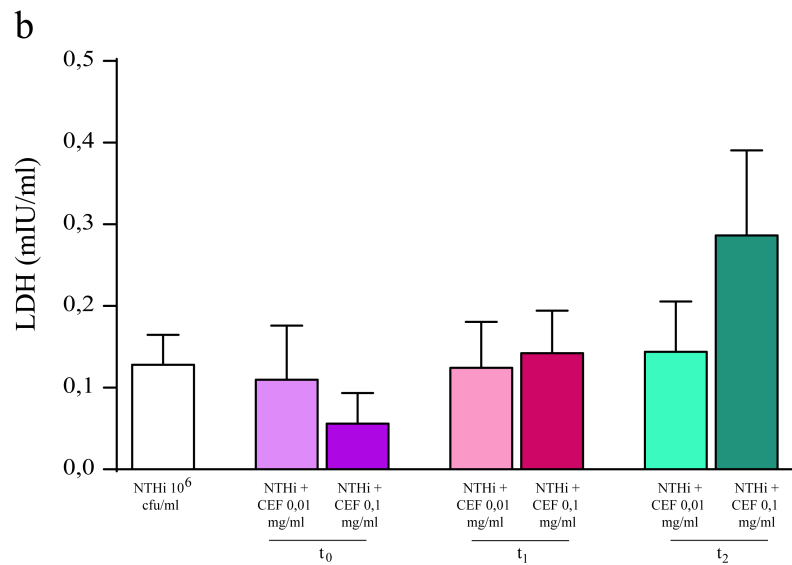
Als Parameter für Zytotoxizität wurde in den Gewebeproben gleichzeitig LDH bestimmt, dessen Konzentration im Überstand mit dem Ausmaß einer Gewebeschädigung korreliert.

Abbildung (11):

Durchschnittliche LDH-Konzentration (mIU/ml) im Gewebekultur-Überstand von humanem Lungengewebe nach Stimulation mit NTHi 10^6 cfu/ml 24h und Inkubation mit MFX oder CEF



a) LDH- Konzentrationen nach NTHi 10^6 , MFX 0,01 mg/ml und 0,1 mg/ml zu den Zeitpunkten t₀, t₁, t₂ nach 24 h (p=ns; jeweils n=6)



b) LDH-Konzentration nach NTHi 10^6 , CEF 0,01 mg/ml und CEF 0,1 mg/ml zu den Zeitpunkten t₀, t₁, t₂ nach 24 h (p=ns; jeweils n=4)

Die Abb. 11 a und b zeigen als Parameter der Zytotoxizität die LDH-Konzentration im Überstand nach Infektion mit NTHi sowie nach Koinkubation mit Antiinfektiva. Insgesamt

ergaben sich über den untersuchten Zeitraum keine signifikanten Differenzen zwischen den unterschiedlichen Stimulationen bei insgesamt sehr niedriger LDH-Freisetzung.

3.3 IL- 8 Konzentrationen in humanem Lungengewebe nach *in vitro* Stimulation mit NTHi für 24h

Die entnommenen Lungengewebsstücke wurden unter standardisierten Bedingungen mit NTHi infiziert. Bei allen Stimulationen konnte eine Infektion mit NTHi nachgewiesen werden. In den ELISA-Ergebnissen fand sich eine signifikante Zunahme der IL-8 Konzentration im Überstand im Vergleich zu den Mediumwerten als Zeichen einer erregerinduzierten Immunantwort.

Zusätzlich führten wir eine Negativkontrolle durch, indem wir die IL-8-Konzentration im Medium mit Medium verglichen, dem nur MFX oder CEF nach 15 Minuten (t_1) zugefügt wurde.

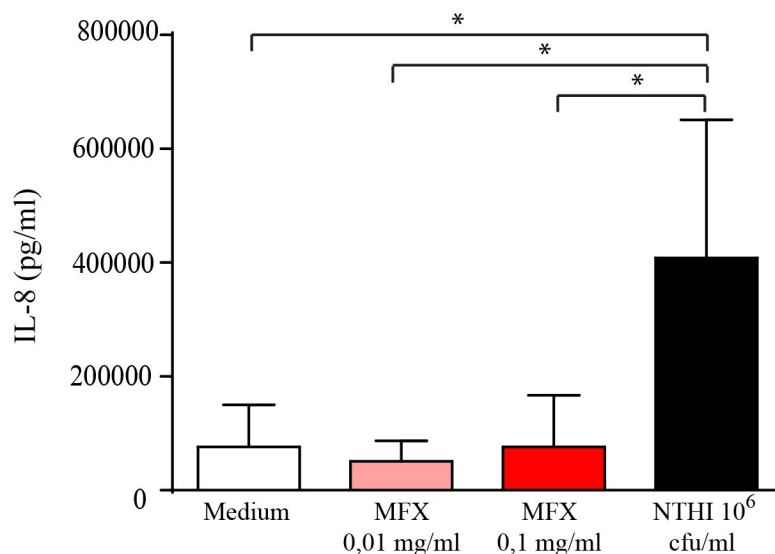


Abbildung (12): Durchschnittliche IL-8 Konzentration (pg/ml) im Gewebekultur-Überstand von humanem Lungengewebe nach Stimulation mit NTHi 10⁶ cfu/ml, MFX 0,01 mg/ml t_1 und MFX 0,1 mg/ml t_1 nach 24h (jeweils n=6), $p < 0,01$ NTHI vs. MFX (0,01 mg/ml); $p < 0,01$ NTHI vs MFX (0,1 mg/ml); $p < 0,01$ NTHI vs. Medium. Bei den IL-8-Konzentration von MFX 0,01 mg/ml vs Medium und MFX 0,1 mg/ml vs Medium gab es keine signifikanten Unterschiede.

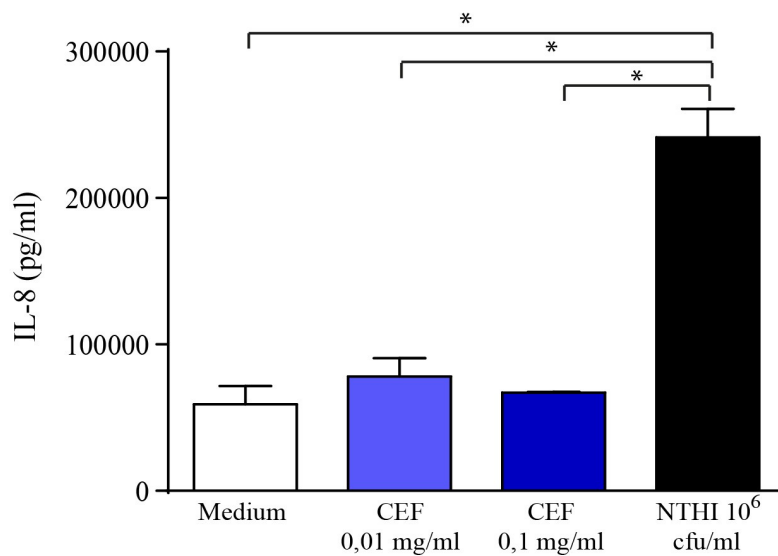


Abbildung (13): Durchschnittliche IL-8 Konzentration (pg/ml) im Gewebekultur-Überstand von humanem Lungengewebe nach Stimulation mit NTHi 10⁶ cfu/ml (n=4), CEF 0,01 mg/ml t₁ (n=2) und CEF 0,1 mg/ml t₁ (n=2) nach 24h, p<0,01 NTHi vs. CEF (0,01 mg/ml); p<0,01 NTHi vs. CEF (0,1 mg/ml); p<0,01 NTHi vs. Medium. Bei den IL-8-Konzentration von CEF 0,01 mg/ml vs. Medium und CEF 0,1 mg/ml vs. Medium gab es keine signifikanten Unterschiede.

Die Abbildungen 12 und 13 zeigen die durchschnittlichen IL-8-Konzentrationen nach Stimulation mit NTHi, Medium und Antibiotikum allein in beiden verwendeten Konzentrationen.

(MFX: Medium MFX 76390 ng/ml +/- 74034 ng/ml; MFX 0,01mg/ml(t₁) 50988 ng/ml +/- 36221 ng/ml; MFX 0,1 mg/ml (t₁) 76656 ng/ml +/- 90082 ng/ml; NTHi 10⁶ cfu/ml 408544 ng/ml +/- 242352 ng/ml, p < 0,01;

CEF: Medium CEF 59099 ng/ml +/- 24904 ng/ml, CEF 0,01 mg/ml (t₁)78248 ng/ml +/- 17531 ng/ml, CEF 0,1 mg/ml (t₁) 67013 ng/ml +/- 723 ng/ml, NTHi 10⁶ cfu/ml CEF 241259 ng/ml +/- 39306 ng/ml, p < 0,01).

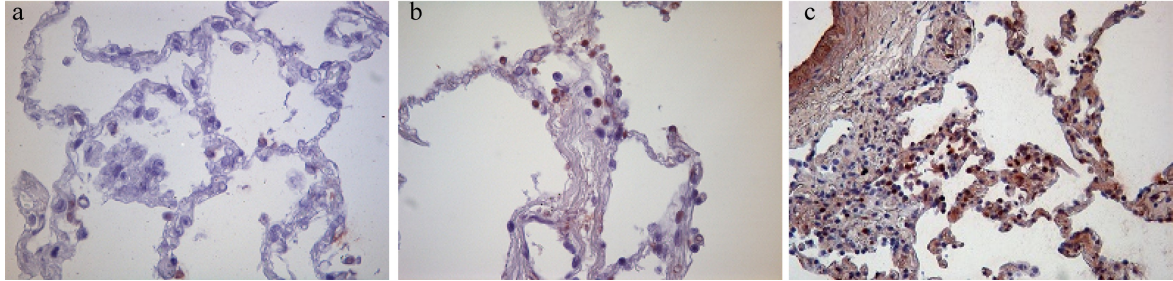
Die Werte für IL-8 waren bei Medium und dem jeweiligem Antibiotikum in zwei Konzentrationen deutlich geringer als die Werte nach NTHi Stimulation. Eine Zugabe der Antiinfektiva resultierte somit in keiner signifikanten Zunahme der IL-8 Konzentration, während die Infektion mit NTHi eine signifikante Stimulation erreichen konnte.

Ein möglicher proinflammatorischer Effekt durch das Antibiotikum selbst kann somit bei der Interpretation der Ergebnisse vernachlässigt werden.

Analog zu den ELISA-Ergebnissen konnte in der *In-situ*-Hybridisierung nach NTHi-

Stimulation vermehrt IL-8 nachgewiesen werden.

Abbildung (14): Beispiel für Nachweis von IL-8 (rotbraun) mittels in situ-Hybridisierung in humanem Lungengewebe. Repräsentatives Beispiel. (Anti-Digoxigenin-Mausantikörper, 400 -fache Vergrößerung)



- a) Im unstimulierten Lungengewebe zeigt sich keine relevante IL-8 Expression in den Alveolarmakrophagen und Alveolarepithelzellen
b) Nach Stimulation mit NTHi 10^6 cfu über 24h zeigt sich rotbraun eine IL-8 Expression in der CEF Gruppe.
c) Nach Stimulation mit NTHi 10^6 cfu über 24h zeigt sich rotbraun eine IL-8 Expression in der MFX Gruppe.

3.4 Antiinflammatorische Effekt von Antiinfektiva in humanem Lungengewebe

Nach Zugabe des jeweiligen Antibiotikums kam es in beiden Gruppen zu einer deutlichen Reduktion der IL-8-Konzentration entweder im Sinne einer möglichen antiinflammatorischen Reaktion oder indirekt durch den antibiotischen Effekt auf die Infektion durch NTHi. Nachdem das Lungengewebe mit NTHi stimuliert wurde, erfolgte die Zugabe von MFX und CEF jeweils in zwei verschiedenen Konzentrationen mit 0,1 mg/ml und 0,01 mg/ml zu unterschiedlichen Zeitpunkten, nach 15 min und 60 min. Generell konnte in allen Gewebeüberständen eine Reduktion der IL-8 Konzentrationen erzielt werden. Vergleicht man nur die verwendeten Konzentrationen untereinander, zeigt sich eine dosisabhängige Reduktion der IL-8 Konzentration im Vergleich zur Konzentration nach NTHi-Stimulation. Die höhere Konzentration konnte jeweils eine ausgeprägtere Reduktion der IL-8-Konzentration bewirken. Mit einer Konzentration von 0,01 mg/ml und einer Konzentration von 0,1 mg/ml nach jeweils 15 Minuten (t_1), sowie mit 0,1 mg/ml nach 60 Minuten (t_2) erreicht MFX signifikante Ergebnisse (0,01 mg/ml t_1 : 222283 pg/ml +/-124382, n=6; p=0,0375; 0,1 mg/ml t_1 : 205803 pg/ml +/- 90184 n=6; p=0,0245; 0,1 mg/ml t_2 226644 +/-172841 n=6; p= 0,0026). Ein Vergleich der Ergebnisse bezogen auf die Zeitpunkte ergab keine signifikante Resultate.

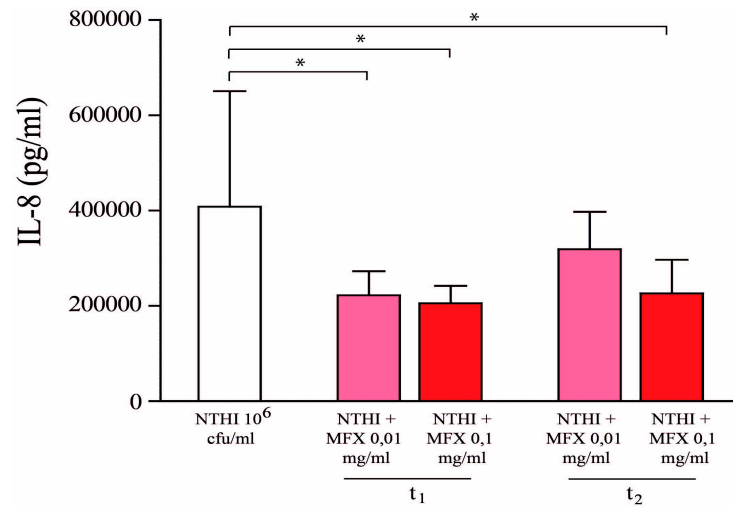


Abbildung (15): IL-8 Konzentration in den Zellüberständen in humanem Lungengewebe nach in vitro-Infektion mit NTHi 10⁶cfu/ml und Kostimulation mit MFX 0,01 mg/ml und MFX 0,1 mg/ml zu t₁ und t₂ (p= 0,0375 bei MFX 0,01 mg/ml t₁, p=0,0245 bei MFX 0,1 mg/ml t₁ und p= 0,0026 bei MFX 0,1 mg/ml t₂ (jeweils n=6)

Entsprechend den MFX-Experimenten wurde auch ein mit NTHi infiziertes Lungengewebe mit zwei unterschiedlichen CEF-Konzentrationen stimuliert.

Eine signifikante Reduktion konnte jedoch mit keiner der verwendeten Konzentration erreicht werden.

Betrachtet man den Einfluss von CEF auf die inflammatorische Reaktion der Versuchsansätze, fällt auf, dass auch hier mit der höheren Konzentration eine tendenziell stärkere Reduktion der IL-8-Konzentration ohne signifikante Ergebnisse erzielt werden konnte, allerdings bei geringerer Anzahl an Experimenten. Die maximale Reduktion der IL-8 Konzentration wird mit Ceftriaxon nach 60 Minuten mit einer Konzentration von 0,1 mg/ml erreicht (0,1 mg/ml (t₂): 190182 pg/ml +/- 76972 p=0,21; 0,1 mg/ml (t₁): 208563 pg/ml +/- 31027 p=0,74).

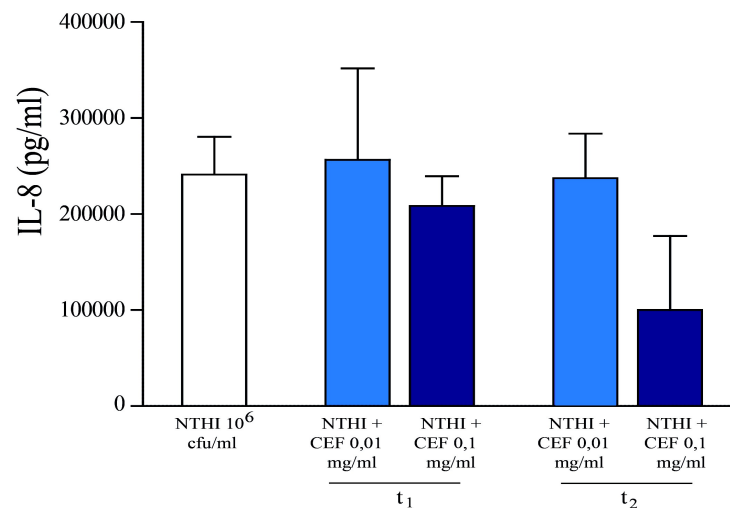


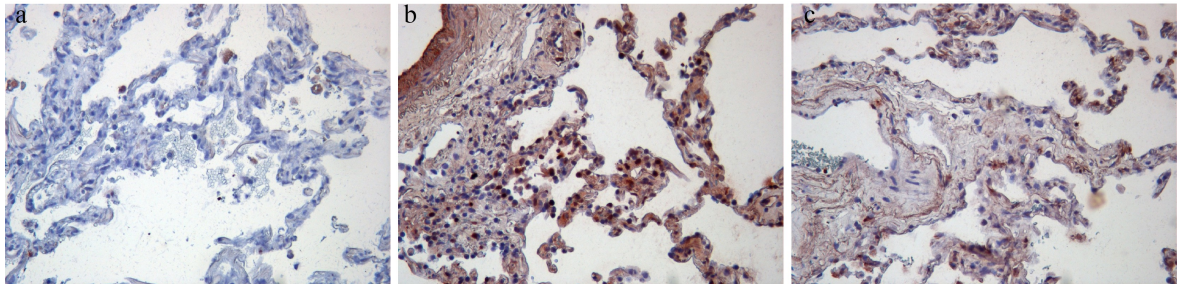
Abbildung (16): IL-8 Konzentration in der Zellüberständen in humanem Lungengewebe nach in vitro-Infektion mit NTHi 10⁶cfu/ml und Kostimulation mit CEF 0,01 mg/ml und CEF 0,1 mg/ml zu unterschiedlichen Zeitpunkten t₁ und t₂ (p=n.s.) nach Infektion (jeweils n=4)

Die MFX-Zugabe 15 Minuten (t₀) vor der eigentlichen NTHi-Infektion, klinisch entsprechend etwa einer prophylaktischen Antibiotikagabe, führte ebenfalls zu einer Reduktion der IL-8 Konzentration. Im Vergleich zu antibiotischer Therapie nach 15 (t₁) und 60 (t₂) Minuten, erreichte sie jedoch nur vergleichbare Werte mit der Applikation nach 60 Minuten. (0,1 mg/ml (t₂): 226644 pg/ml +/- 172841); 15 Minuten vor NTHi-Infektion (t₀): 245632 pg/ml +/- 98083).

Im direkten Vergleich der Zeitpunkte (t₁) und (t₂) untereinander konnten keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden (0,01 mg/ml: t₁/t₂ p = 0,1; 0,1 mg/ml: t₁/t₂ p = 0,62).

Ergänzend zu den Zytokinmessungen im Überstand führten wir im Lungengewebe eine *In-situ*-Hybridisierung durch. Auch hier bestätigten sich, die schon im IL8-ELISA beobachteten Resultate. MFX konnte bereits in einer Konzentration von 0,01 mg/ml nach 60 Minuten (t₂) eine deutliche Reduktion der IL-8 Konzentrationen zeigen.

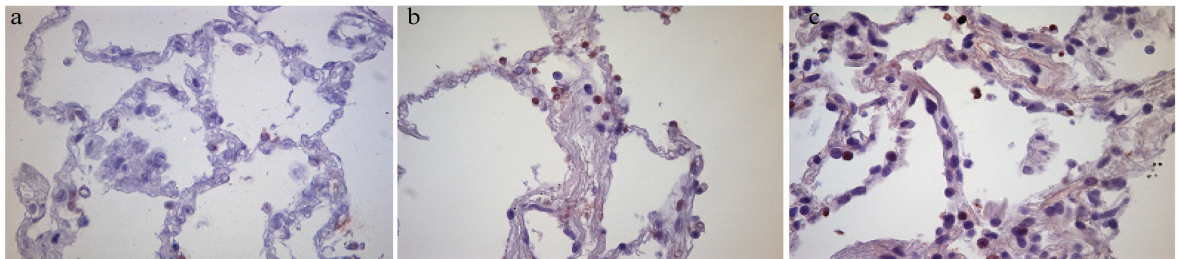
Abbildung (17): Nachweis von IL-8 mittels *in-situ*-Hybridisierung in MFX-Lungen. Nachweis von IL-8 (rotbraun) in Alveolarmakrophagen und weniger in Alveolarepithelzellen. Repräsentatives Beispiel. (Anti-Digoxigenin-Mausantikörper, 400 -fache Vergrößerung)



- a) Unstimuliertes humanes Lungengewebe im MFX-Versuch
- b) Deutlicher IL-8 Nachweis (rotbraun) auf Alveolarzellen nach Infektion mit NTHi 10^6 cfu/ml
- c) Reduzierte Expression von IL-8 (rotbraun) auf Alveolarmakrophagen und -epithelien nach Infektion mit NTHi 10^6 cfu/ml und MFX 0,01 mg nach 24h, im Vergleich zu b)

Analog zu MFX wurde auch nach Inkubation mit CEF eine Darstellung von IL-8 im Gewebe mittels *In-situ*-Hybridisierung durchgeführt. Es zeigt sich eine diskrete Reduktion der IL-8-Konzentration.

Abbildung (18): Nachweis von IL-8 mittels *in-situ*-Hybridisierung in CEF-Lungen. Nachweis von IL-8 (rotbraun) in Alveolarmakrophagen und weniger in Alveolarepithelzellen Repräsentatives Beispiel (Anti-Digoxigenin-Mausantikörper (400 -fache Vergrößerung)



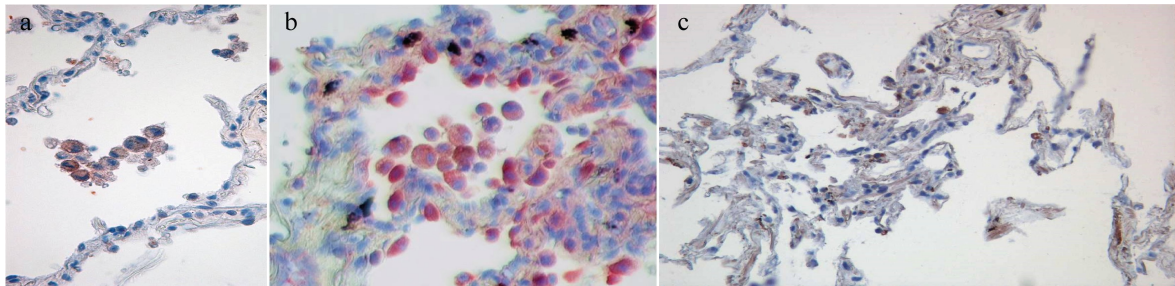
- a) Unstimuliertes humanes Lungengewebe im CEF-Versuch
- b) Nachweis von IL-8 (rotbraun) nach Infektion mit NTHi 10^6 cfu/ml nach 24h
- c) Diskrete Reduktion von IL-8 Molekülen (rotbraun) nach Infektion mit NTHi 10^6 cfu/ml und CEF 0,01 mg/ml t_2 nach 24h im CEF-Versuch, im Vergleich zu b)

3.5 TLR2 Expression im humanen Lungengewebe nach *in vitro*

Infektion mit NTHi und antibiotischer Therapie

Mittels immunhistochemischer Nachweismethoden konnte in den stimulierten Lungengewebestücken auch die Expression des TLR2 Rezeptors beurteilt werden. Vergleicht man unstimuliertes Gewebe mit dem Gewebe nach NTHi-Infektion, so ist eine deutliche Zunahme der TLR2-Expression zu beobachten. In humanem Lungengewebe führte MFX in einer Konzentration von 0,1 mg/ml nach 60 Minuten (t_2) zu einer deutlichen Reduktion der TLR2-Expression nach NTHi-Stimulation.

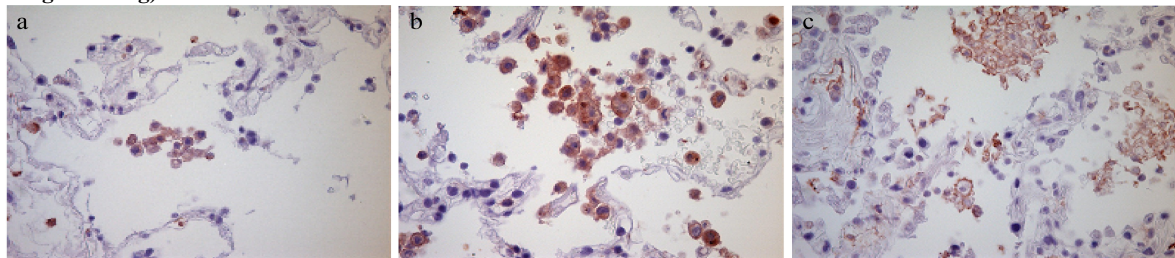
Abbildung (19): Nachweis der TLR2-Expression mittels Immunhistochemie (rot) in humanem Lungengewebe der MFX-Lungen. Die Färbung ist besonders ausgeprägt auf Alveolarmakrophagen, aber nach Stimulation auch auf randständigen Alveolarepithelzellen gut erkennbar. Repräsentatives Beispiel (Anti-Digoxigenin-Mausantikörper (400 fache Vergrößerung)



- a) Geringe TLR2-Expression (rot) in unstimuliertem humanem Lungengewebe
- b) Deutliche TLR2-Expression (rot) im stimulierten Lungengewebe mit NTHi 10⁶cfu/ml nach 24h
- c) Reduzierte TLR2 Expression (rot) im humanen Lungengewebe nach NTHi 10⁶ cfu/ml und Stimulation mit MFX 0,1 mg/ml t_2 nach 24h

Bei der TLR2-Expression im Gewebe der CEF-Versuche ist nach CEF Stimulation ist eine diskrete Reduktion der TLR2-Moleküle nach CEF 0,1 mg/ml nach 60 Minuten (t_2) im Gewebe zu beobachten.

Abbildung (20): Nachweis der TLR2-Expression mittels Immunhistochemie (rote Farbe) in humanem Lungengewebe der CEF-Lungen. Repräsentatives Beispiel. (Anti-Digoxigenin-Mausantikörper, 400 fache Vergrößerung)



- a) Geringe TLR2-Expression (rot) im unstimulierten humanem Lungengewebe
- b) Deutliche TLR2-Expression (rot) im stimulierten Lungengewebe mit NTHi 10⁶cfu/ml nach 24h
- c) Diskrete Reduktion der TLR2 Expression (rot) im humanen Lungengewebe nach NTHi 10⁶ cfu/ml und Stimulation mit CEF 0,1 mg/ml t_2 nach 24h

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es immunmodulatorische Effekte von MFX in humanem Lungengewebe zu untersuchen.

Das in unserer Arbeitsgruppe entwickelte und mehrfach publizierte Infektionsmodell des humanen Lungengewebes (113) ermöglicht die Analyse von Entzündungs- und Infektabwehrmechanismen im Gewebeverband und kann daher als Bindeglied zwischen zellbiologischen, tierexperimentellen und klinischen Studien gelten. Als repräsentativer bakterieller Erreger der COPD-Exazerbation wurde NTHi für die Stimulationen verwendet. Analog zu vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, konnte durch NTHi eine deutliche Stimulation der Zytokinexpression und der TLR-Expression durch den Erreger beobachtet werden.

4.1 Antiinflammatorische Effekte von MFX

MFX konnte die IL-8 Freisetzung im Gewebeüberstand in humanem Lungengewebe nach NTHi-Stimulation signifikant senken. Dabei konnte mit beiden verwendeten Konzentrationen eine signifikante Reduktion erzielt werden.

Die Wirkung von Antibiotika im Lungengewebe wurde in Voruntersuchungen anderer Autoren wiederholt tierexperimentell, aber auch in der Zellkultur untersucht. Der Effekt auf die Zytokinproduktion, Zeitpunkt der Antibiotikaapplikation und Dosis waren dabei von besonderem Interesse. Bisher gab es allerdings keine Studien, die Inflammationsprozesse in humanem Lungengewebe und nicht nur in einzelnen Zelltypen der humanen Lunge oder des Blutes unter den Bedingungen der Antibiotikatherapie bakterieller Infektionen untersuchten. Das Lungengewebe stellt ein komplexes Abwehrsystem dar, bestehend aus ortsständigen Zellen der lokalen Immunabwehr, wie den Bronchial- und Alveolarepithelien und Zellen des Immunsystems wie Alveolarmakrophagen, Mastzellen und natürlichen Killerzellen. Die *ex vivo* Untersuchung des humanen Lungengewebes ermöglicht daher einen besseren Einblick in das Zusammenspiel der einzelnen Komponenten des pulmonalen Abwehrsystems (112, 113). Zimmermann und Kollegen verglichen die antiinflammatorischen Effekte von

unterschiedlichen Antibiotika in der Zellkultur in humanen bronchialen Epithelzellen, die aus dem Lungengewebe von Patienten gewonnen wurden und nach spezieller Aufbereitung mit TNF- α stimuliert wurden. Es wurden unterschiedliche Konzentrationen der Antibiotika verwendet; MFX zeigte wie Azithromycin eine konzentrationsabhängige, signifikante Reduktion der IL-8-Konzentration im Vergleich zu Cefuroxim und Levofloxacin. Tatsächlich konnte durch Cefuroxim eine signifikante Zunahme der IL-8-Konzentration nach Stimulation mit TNF- α in den bronchialen Epithelzellen gezeigt werden (173). In einer anderen Arbeit wurden *in vitro* und *in vivo* Effekte auf die Zytokinproduktion unter Therapie mit verschiedenen Fluorchinolonen in Mäusen, bzw. in isolierten peritonealen Mausmakrophagen, untersucht. Hierbei ergab sich ein heterogenes Bild: Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Norfloxacin und Levofloxacin wurden in zwei verschiedenen Konzentrationen verwendet und zeigten einen unterschiedlichen Einfluss auf die Konzentrationen von Interleukin-6, TNF- α und Interleukin-1 β nach LPS-Stimulation im Serum der Mäuse und den Makrophagen. Während Norfloxacin, Gatifloxacin und Ciprofloxacin die Konzentration von TNF- α im Mausserum signifikant reduzieren konnte, zeigte Levofloxacin in der geringen Dosierung eine signifikante Steigerung der TNF- α Konzentration. Unter Ciprofloxacin ergab sich zusätzlich eine Steigerung des IL-6 Levels, während die anderen Fluorchinolone keinen relevanten Effekt auf die IL-6-Produktion hatten. In den Analysen der Zytokinproduktion in Makrophagen konnte die TNF- α Produktion durch alle verwendeten Fluorchinolone, bis auf Levofloxacin tendenziell reduziert werden (99). Diese Arbeit verdeutlicht, dass verschiedene Fluorchinolone unterschiedliche Einflüsse auf die Zytokinproduktion während einer Inflammation haben können. Dalhoff und Kollegen fassten dieses Phänomen bereits in einem Review 2005 zusammen, in dem sie die immunmodulatorische Aktivität alter und neuerer Fluorchinolone in unterschiedlichen Gewebetypen darstellten (33).

Der Zeitpunkt der Zugabe des Antibiotikums wurde in keiner dieser Arbeiten untersucht. Araujo und Kollegen testeten den Effekt von MFX zusätzlich zu unterschiedlichen Zeitpunkten und mit unterschiedlichen Konzentrationen hinsichtlich des Einflusses auf die Produktion verschiedener Zytokine, insbesondere IL-6 und TNF- α , in humanen Monozyten von gesunden Blutspendern nach erfolgter LPS-Stimulation. Auch in dieser Studie ließen

sich antiinflammatorische Effekte beobachten, wobei die Reduktion der Konzentration von TNF- α signifikant war und IL-8 allerdings nicht getestet wurde (8).

In den hier zitierten Arbeiten erfolgte keine Infektion mit einem vitalen Erreger, sondern nur Stimulationen mit LPS oder proinflammatorischen Zytokinen. Die Infektion mit einem kompletten Erreger ermöglicht aber im Vergleich zu einer Mediator-Stimulation eine kliniknähere Beurteilung des Entzündungsvorganges, da während einer Infektion eine Vielzahl von PAMPs und Virulenzfaktoren den Inflammationsprozess durch Aktivierung unterschiedlicher Rezeptoren beeinflussen und darüber hinaus vitale Erreger nach Internalisierung zahlreiche Möglichkeiten der direkten intrazellulären Interaktion mit der Wirtszelle nutzen, die ebenfalls durch die Stimulation mit PAMPs nicht getestet werden können. So spielt bei dem in unserer Arbeit verwendeten NTHi für die Interaktion mit dem TLR-2-Rezeptor das Membranprotein OMP P6 eine entscheidende Rolle.

Weiterhin konnte unsere Arbeitsgruppe in einer früheren Studie eine deutliche ausgeprägtere Inflammation nach Inkubation respiratorischer Zellen mit vitalen, im Vergleich zu abgetöteten NTHi nachweisen (113).

Choi und Kollegen testeten die Wirkung von MFX ebenfalls in unterschiedlichen Konzentrationen nach Stimulation mit einem vitalen Erreger in mononukleären Zellen aus menschlichem Blut. MFX konnte hier nach erfolgter Stimulation mit *Streptococcus pneumoniae* und *Escherichia coli* die Produktion von TNF- α und IL-6 konzentrationsabhängig stärker reduzieren als Levofloxacin oder Ceftriaxon (29). Die hierfür verwendeten Konzentrationen von MFX waren geringer als Konzentrationen, die auch im Serum erreicht werden können. Anders als in unserer Arbeit wurde hier allerdings nur mit einem Zelltyp aus peripherem Blut gearbeitet. Die bei uns verwendeten Konzentrationen lagen höher und entsprachen dem Konzentrationsbereich, der auch im Gewebe nachgewiesen werden kann (137). Eine gewebstoxische Wirkung von MFX durch die eingesetzten Antibiotikadosen- oder Erregerkonzentrationen konnte mittels LDH-ELISA ausgeschlossen werden. Unsere Ergebnisse zeigen erstmals in humanem Lungengewebe eine konzentrationsabhängige, signifikante Reduktion der IL-8-Konzentration unter MFX nach NTHi-Stimulation.

4.2 Proinflammatorischer Effekt von CEF

β -Laktam-Antibiotika besitzen eine vorwiegend zeitabhängige Wirkung, während die bakterizide Wirkung der Chinolone konzentrationsabhängig ist. Zellwandkomponenten und Bestandteile des Zytoplasmas können proinflammatorisch wirken, wenn sie im Rahmen der bakteriellen Zellyse freigesetzt werden. Durch den Wirkmechanismus der β -Laktam-Antibiotika kommt es durch Störung der Zellwandsynthese zu Freisetzung von Komponenten, wie Lipoteichonsäure und Peptidoglykan bei gram-positiven Bakterien und Lipoproteinen, wie LPS, bei gram-negativen Bakterien. Im Kaninchenmodell mit Pneumokokken-Meningitis konnte bereits in den 80iger Jahren eine proinflammatorische Wirkung durch Freisetzung dieser Komponenten unter der Therapie mit β -Lactam-Antibiotika nachgewiesen werden (148, 149, 150, 52).

Nach Infektion mit Pneumokokken im Zellkulturmodell mit TLR2-transfizierten HeLa-Zellen konnte durch freigesetztes Peptidoglycan eine vermehrte Aktivierung des TLR-2-Rezeptor mit folgender erhöhter Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie auch IL-8 nachgewiesen werden (95). Diese proinflammatorischen Faktoren wurden für die klinische Verschlechterung im Rahmen eines septischen Schocks verantwortlich gemacht und die Entwicklung von antimikrobiellen Peptiden schloss sich an. Trotz Reduktion der proinflammatorischen Aktivität und Besserung von Outcome und Mortalität, ist der Einsatz durch schwerwiegende Nebenwirkungen limitiert (117). Im Vergleich hierzu wurde unter nicht zellwandaktiven Antibiotika, wie Makroliden und Fluorchinolonen, eine vergleichbare proinflammatorische Wirkung bei diesen Substanzen nicht beobachtet (139). Betrachtet man die Ergebnisse der Cephalosporin-Gruppe unter diesen Aspekten, steht die weniger ausgeprägte Reduktion und leichte IL-8-Zunahme nach Zugabe des Antibiotikums in Einklang mit diesen Erkenntnissen. In Analogie hierzu konnte auch Zimmermann in seiner Arbeit mit bronchialen Epithelzellen eine deutliche Zunahme der IL-8-Produktion unter Inkubation mit Cefuroxim beobachten (173). In einer klinischen randomisierten Studie wurden Serumkonzentrationen von verschiedenen Zytokinen nach 0, 24, 72 und 120 Stunden untersucht, nachdem Patienten mit einer Pneumokokkenpneumonie entweder Ceftriaxon oder Levofloxacin erhalten hatten. Auch hier zeigten sich unter Ceftriaxon verglichen mit Levofloxacin persistierend höhere Werte für TNF- α nach 120 Stunden. Als

Ursache wurden auch hier die proinflammatorische Wirkungen von Zellwandbestandteilen der Bakterien angenommen, aber auch immunmodulatorische Effekte von Levofloxacin (23).

4.3 Immunmodulatorischer Wirkmechanismus von MFX

Beim immunmodulatorischen Wirkmechanismus von MFX gibt es Hinweise zur Beeinflussung von zyklischem AMP (cAMP) und verschiedenen Proteinkinasen sowie zur Regulation von intrazellulären Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren (33). MAP-Kinasen (*mitogen-activated protein kinases*), spielen eine wichtige Rolle bei Zellwachstum, Zelldifferenzierung und Entzündungsvorgängen. Der MAP-Kinaseweg umfasst mindestens drei in „Reihe“ geschaltete Kinasen, die *Extracellular-signal regulated kinases (ERK)*, *P38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38)* und *C-Jun-N-terminale Kinase (JNK)*. Dass die Zytokinproduktion eng mit der Aktivierung von NF- κ B und verschiedenen MAP-Kinasewegen zusammenhängt konnte in den letzten Dekaden durch mehrere Studien nachgewiesen werden (61). JNK-Kinase und ERK1/2-Kinase spielen neben einer NF- κ B-Aktivierung über den NIK-IKK-I κ B α -NF κ B-Weg eine wichtige Rolle und führen zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und IL-8 (74, 96). Die p38-Kinase spielt auch in der Pathophysiologie der NTHi-Infektion eine wichtige Rolle. Neben der Produktion von Zytokinen über eine NF- κ B-Aktivierung, stimuliert sie zusätzlich die Produktion von MUC5AC, einem zentralen mukus-regulierendem Protein. MUC5AC spielt eine wichtige Rolle im Rahmen der Abwehr bakterieller Erreger in der Mukosa des Respirationstraktes. Interessanterweise inhibiert die parallel durch NTHi aktivierte Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) die Aktivität der p38-Kinase und somit die NF- κ B-Aktivierung, während NTHi über die Aktivierung des TLR2-Rezeptors zu einer NF- κ B-Aktivierung und Produktion von proinflammatorischen Zytokinen führt (77, 156). Die p38-Kinase und der TLR2-Rezeptor haben somit gegensätzliche Effekte.

Zur immunmodulierenden Wirkung von MFX liegen eine Reihe von zellbiologischen Untersuchungen vor: MFX führt nicht nur durch Hemmung der ERK1/2-Kinase, sondern auch über eine Inhibierung der p38-Kinase zu einer Reduktion der Inflammation, wie eine zellbiologische Studie an Monozyten zeigen konnte, die durch *Aspergillus fumigatus*

vorstimuliert wurden (127). Werber et al. konnten ebenfalls eine antiinflammatorische Wirkung von MFX zeigen, indem die Aktivierung von JNK und ERK 1/2 sowie NF- κ B inhibiert wurde, nachdem A549 Zellen mit Interleukin-1 β und Interferon- γ stimuliert wurden (158). In zwei weiteren Studien konnte eine ähnliche Beeinflussung der Signaltransduktion bezüglich ERK1/2 und JNK durch MFX in mit *Candida albicans* infizierte A 549 Zellen sowie in durch LPS stimulierten humanen Monozyten gezeigt werden (17, 157).

In glatten Muskelzellen von Ratten zeigte sich analog durch MFX eine supprimierte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-8, nach Stimulation mit TNF- α , die durch Inhibition der ERK 1/2-Kinase und der Nf κ B Aktivierung vermittelt war (76).

Im Hinblick auf weitere Mechanismen der immunmodulatorischen Effekte von Antibiotika in humanem Lungengewebe untersuchten wir zusätzlich die TLR2-Expression vor und nach NTHi-Stimulation, sowie 15 und 60 Minuten nach Antibiotikagabe. Unter MFX war eine Reduktion der TLR2-Expression deutlich nachzuweisen.

Im Zusammenhang mit der antiinfektiven Therapie ist dabei die Interaktion mit respiratorischen Erregern zu berücksichtigen. So kommt es bei Infektion mit NTHi nach Bindung an den TLR 2 zur vermehrten Expression von proinflammatorischen Molekülen sowie zur Hochregulation von TLR 2. Neben der Aktivierung von NF- κ B ist auch die p38-MAP Kinase involviert. Über beide Wege stimuliert NTHi die Freisetzung proinflammatorischer Moleküle und beeinflusst so auch die Expression von TLR 2 und des MUC 2-Rezeptors, die eine NTHi-Erkennung durch die Zielzellen verbessern. Der p38-Weg funktioniert dabei allerdings hinsichtlich der TLR2-Expression als Negativ-Regulator, so dass eine gesteigerte Expression des TLR 2-Rezeptors hauptsächlich über die Aktivierung von NF- κ B vermittelt wird (130, 77, 78). Studien zur Interaktion mit Steroiden konnten zeigen, dass Glukokortikoide über eine Inhibierung des p38 Weges in der Lage sind, die Expression des TLR2-Rezeptors zu erhöhen (155, 130).

Im Tiermodell mit Muskelzellen aus dem Respirationstrakt von Ratten hemmte MFX die MAP-Kinase ERK1/2 und führte zu einer verringerten Produktion von Zytokinen, unter anderem auch IL-8. Zusätzlich kam es zu einer Reduktion des NF- κ B-Levels (76).

Weiss et al konnten zusätzlich in ihren Versuchen mit durch LPS stimulierten humanen

Monozyten mittels *Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)* eine Verhinderung der Bindung von NF- κ B an die DNA nachweisen. Weitere Untersuchungen der IKK-I κ Ba-NF κ B- Signalkaskade zeigten, dass MFX eine Abspaltung von I- κ B verhindert und somit keine Aktivierung von NF- κ B erfolgen kann (157). Dies resultiert nicht nur in einer Reduktion von proinflammatorischen Molekülen, sondern auch in einer geringeren Expression des TLR-2- Rezeptors auf der Oberfläche der jeweiligen Zelle.

MFX ist somit in der Lage durch Inhibition aller drei MAP-Kinasen in deren Signalweg einzugreifen und beeinflusst so die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine.

Auch durch die Inhibition der NF- κ B-Aktivierung über den IKK-I κ Ba-NF κ B-Weg wird die Produktion proinflammatorischer Zytokine reduziert und eine Runterregulation der TLR-2- Expression gewährleistet.

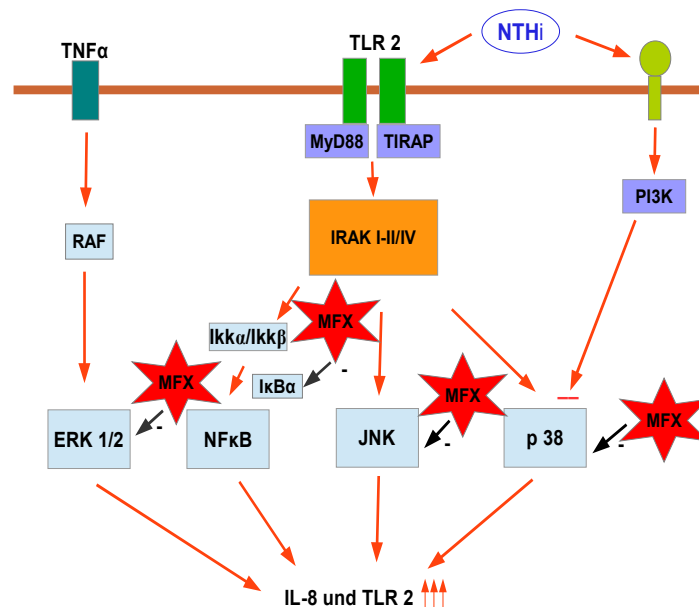


Abbildung (21): Schematische Darstellung der durch NTHi induzierten Signalwege und relevanten Kinasen unter Therapie mit MFX: MFX hemmt die Aktivität der MAP-Kinasen (ERK 1/2, JNK, p38) und des NF κ B-Weges

TLR 2 (Toll-like Rezeptor 2); TNF (Tumornekrosefaktor); MyD88 (myeloid differentiation primary response protein); TIRAP (toll-like receptor adaptors); RAF (rapidly accelerated fibrosarcoma); IRAK (interleukin-1 receptor-associated kinase-1); PI3K (phosphoinositide 3-kinase); ERK (extracellular-signal Regulated Kinase); NF κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells); JNK (c-Jun N-terminal kinases); p38 (p38-kinase); I κ B α (regulator protein NF κ B); I κ B β (I kappa kinase)

Die unter Inkubation mit MFX beobachtete signifikante Reduktion der IL-8 Konzentration und die reduzierte TLR-2-Expression sind somit durch diese immunmodulatorischen Effekte erklärbar. CEF aus der Gruppe der β -Lactam-Antibiotika weist im Gegensatz zu

Fluorchinolonen aufgrund seines Wirkmechanismus keine intrazelluläre Wirksamkeit auf. Immunmodulatorische Effekte durch eine direkte Interaktionen mit Signalkaskaden und einzelnen Kinasen, können bei CEF daher nicht erwartet werden.

Limitationen:

Diese Arbeit weist eine Reihe von Limitationen auf. Zunächst war aufgrund der begrenzten Anzahl von verfügbaren Lungen nur eine bedingte Interpretationsmöglichkeit gegeben.

Insbesondere war ein direkter Vergleich der Effekte beider Antibiotika nicht möglich, da ein Lungengeweberesektat jeweils nur mit einem Antibiotikum inkubiert werden konnte, so dass die Experimente nicht simultan, sondern konsekutiv durchgeführt wurden.

Auch wenn die Patientendaten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen aufweisen, variiert dennoch die Beschaffenheit des Lungengewebes und die Einflüsse auf das Lungengewebe durch Transport, Lagerung und Verarbeitung, können trotz einheitlicher Prozesse nicht komplett standardisiert werden.

In der Vergangenheit haben sich viele Studien mit der Wirkung von Antibiotika in unterschiedlichen, meist tierexperimentellen Modellen beschäftigt. Trotz der genannten Limitationen konnten wir erstmals durch Verwendung des Lungengewebsmodells mit Stimulationen in humanem Gewebe, dennoch die Vorgänge während einer pulmonalen Infektion repräsentativer darstellen, als dies durch die Untersuchung mit einzelnen Komponenten des pulmonalen Immunsystems möglich ist. Dabei war es uns möglich, signifikante immunmodulatorische Effekte von MFX nachzuweisen.

4.4 Klinische Konsequenzen: Antibiotische Therapie und Immunmodulation in der Therapie von COPD-Exazerbationen

Aufgrund der hohen Morbidität und Mortalität der COPD spielt die erfolgreiche Therapie der Exazerbation, aber auch deren Prävention, eine bedeutende Rolle in der aktuellen Forschung.

MFX hat aufgrund seiner immunmodulatorischen Eigenschaft ein Potential bei der Reduktion andauernder Inflammation im Lungengewebe bei Patienten mit infektssoziierter Exazerbation. Die Substanz stellt somit aus pathophysiologischer Sicht eine

Kombination von Antibiotikum und Immunmodulator da. Allerdings ist das Nebenwirkungsprofil von MFX nicht zu unterschätzen. Schwerwiegend sind die kardiovaskulären Komplikationen, die unter der Therapie mit MFX auftreten können. Von besonderer Bedeutung ist die QT-Zeit verlängernde Wirkung von Fluorchinolonen, von denen MFX mit 600 ms im Mittel einen besonders ausgeprägten Effekt aufweist (68). Folgen dieser QT-Zeit Verlängerung sind maligne Herzrhythmusstörungen, wie *Torsade de pointes*, die in Kammerflimmern übergehen und zum Herzstillstand führen können (4) und mit hoher Mortalität assoziiert sind (49, 46). Diese unerwünschte Wirkung erfordert einen umsichtigen Einsatz von MFX. Eine klinische Studie, die kardiovaskuläre Nebenwirkungen unter Therapie von Fluorchinolonen, insbesondere MFX, und Betalaktam-Antibiotika untersuchte, konnte zeigen, dass bei Patienten mit kardiovaskulärer Grunderkrankung die Mortalität aufgrund kardiovaskulärer Events unter MFX 2-3 fach gegenüber Amoxicillin erhöht ist (31). Somit sollte der Einsatz von MFX gerade bei Patienten mit kardiovaskulären Vorerkrankungen, wie sie die meisten COPD-Patienten aufweisen, genau geprüft und überwacht werden. Zusätzlich warnt die Europäische Arzneimittelagentur vor möglichen schweren Leberschäden durch die Anwendung von MFX. Die Indikation sollte somit genau geprüft werden und der Einsatz von MFX ist aktuell nur empfohlen, wenn andere Antibiotika keine Wirksamkeit zeigen oder aus anderen Gründen ungeeignet sind (45).

Der Umstand, dass nicht alle Exazerbationen bakteriellen Ursprungs sind und bei einer nicht unbedeutenden Zahl die Ursache nicht sicher ermittelt werden kann, führt zu der Frage, ob und wann eine antibiotische Therapie überhaupt indiziert ist. Eine Cochrane-Analyse sämtlicher Antibiotikastudien der COPD während Exazerbationen konnte einen klaren Benefit der antibiotischen Therapie erkennen, wenn die Patienten intensivpflichtig waren. Für alle anderen Patientengruppen war die Datenlage nicht eindeutig. Die Antibiotika hatten weder einen Einfluss auf die Mortalität oder auf die Dauer des Krankenhausaufenthaltes (154).

Aufgrund dieser Datenlage befassten sich Studien mit diagnostischen Möglichkeiten, um Ursachen einer Exazerbation schnellstmöglich zu erkennen. Die Analysen von Sputum und Bewertungen von Biomarkern, wie CRP, Neopterin und Procalcitonin, sollten bei der

Entscheidung helfen, wann eine antibiotische Therapie indiziert ist. Bafadhel und Kollegen definierten vier verschiedene Arten von Exazerbationen anhand von Biomarkern. Exazerbationen mit bakterieller Ursache waren mit erhöhten Werten von IL-1 β im Sputum assoziiert (10). Die Verschreibung von Antibiotika konnte deutlich reduziert werden und es kam zu keiner Zunahme der Mortalität oder der unerwünschten Ereignisse (9). Soler und Kollegen untersuchten ambulante Patienten mit Exazerbation und behandelten nur diejenigen Patienten mit Antibiotika, bei denen purulentes Sputum und ein erhöhtes CRP nachgewiesen werden konnte. Auch hier kam es zu keiner Zunahme der Mortalität (134). Obwohl in beiden Studien die Behandlung nicht randomisiert erfolgte und das durchaus als Limitation gesehen werden muss, ermöglichen die verfügbaren Daten dennoch in der Klinik einen kalkulierten Einsatz von Antibiotika. Der Einsatz von Antibiotika wird somit in aktuellen internationalen Leitlinien empfohlen, wenn der Verdacht auf eine bakterielle Ursache einer Exazerbation besteht und ist dann mit einem besseren Outcome assoziiert. In der Klinik betrifft das die Patienten mit vermehrter Dyspnoe, vermehrtem und purulentem Sputum (55). Hierfür werden im frühen Stadium β -Lactam-Antibiotika, ggf. mit β -Lactamase-Inhibitoren empfohlen. Fluorchinolone, insbesondere MFX, sind erst in fortgeschrittenen Stadien empfohlen (21, 166).

Aufgrund der Erkenntnis der unkontrollierten und persistierenden Aktivierung des Immunsystems durch proinflammatorische Komponenten im Rahmen der Pathogenese der COPD wird Hoffnung in Medikamente gesetzt, die mit antiinflammatorischen und immunmodulatorischen Fähigkeiten gezielt in die Pathogenese der COPD eingreifen können, um so Exazerbationen vorzubeugen.

Phosphodiesterasehemmer wirken bronchodilatatorisch und besitzen einen antiinflammatorischen Effekt (12, 88). Auch wenn durch den Einsatz von Roflumilast, einem neueren Phosphodiesterasehemmer, eine Verbesserung der Lungenfunktion beobachtet werden konnte, wird die Anwendung aufgrund des Nebenwirkungsprofil aktuell nur bei Patienten mit fortgeschrittener COPD als ergänzende Therapie empfohlen (103).

N-Acetylcysteine ist ein weit gebräuchliches Antioxidant und kann positiv auf Inflammationsprozesse im Lungengewebe einwirken (116). Durch Reduktion der Hypersekretion im Lungengewebe und durch seine mukolytische Eigenschaft wird es nicht

nur bei COPD-Patienten, sondern auch bei Patienten mit Mukoviszidose eingesetzt. Allerdings konnte in einer Cochrane Analyse aufgrund der nicht eindeutigen Studienlage faktisch kein Benefit unter der Therapie beobachtet werden. Daher kann auch in internationalen Leitlinien aktuell keine generelle Empfehlung für den Einsatz von N-Acetylcysteine gegeben werden (55, 107).

Die Erprobung von Chemokin- und Zytokinrezeptorantagonisten, die direkt an dem jeweiligen Rezeptor konkurrieren, ist Gegenstand aktueller Forschung. MK-7123 zeigte als CXCR2-Antagonist neben einer deutlichen Abnahme der Inflammation im Lungengewebe eine Verbesserung der Lungenfunktion mit einer reduzierten Anzahl von Exazerbationen und einer Besserung der Symptomatik und Lebensqualität. Trotz dosisabhängiger Neutropenie kam es nicht zu vermehrten Infekten, obwohl dies sicherlich ein limitierender Faktor in der therapeutischen Anwendung werden kann. Benralizumab zeigte als Interleukin-5-Rezeptorantagonist allerdings gegenüber Placebo keine bessere Wirkung in Bezug auf Reduktion der Exazerbation (111, 24, 19).

Aufgrund der Bedeutsamkeit und der Möglichkeit der Immunmodulation, ist die Entwicklung von Inhibitoren von MAP-Kinasen eine logische Konsequenz. Insbesondere die p38 Kinase spielt dabei eine besondere Rolle. Eine Inhibierung dieser Kinase konnte in ersten Studien tatsächlich eine Verbesserung der Lungenfunktion durch Unterbindung der persistierenden Inflammation erzielen. Insbesondere Losmapimod und PH-797804 konnten inhalativ eine vermehrte Hemmung der p38-Kinase zeigen. PH-797804 konnte in einer klinischen Studie eine Verbesserung der Lungenfunktion gegenüber Placebo bei Patienten mit moderater bis schweren COPD bewirken (98, 81).

Aktuell sind MFX und Azithromycin die einzigen klinisch einsetzbaren Substanzen, die neben antibakteriellen Eigenschaften antiinflammatorisch und immunmodulatorisch wirksam sind. Azithromycin konnte in einer randomisierten Studie zu einer Verlängerung des exazerbationsfreien Intervalls führen (2).

Die weitere Entwicklung von Medikamenten, die zu einer Reduktion der Inflammation führen, sind ein vielversprechender Ansatz in der Therapie der stabilen COPD und der Reduktion von Exazerbationen.

Mit dem vorrangigen Ziel, Exazerbationen zu verhindern, könnte die Progression der

Erkrankung aufgehalten werden und damit eine positive Beeinflussung der Morbidität und Mortalität in der Zukunft gelingen.

5 Zusammenfassung

Die COPD ist derzeit eine der führenden Ursachen für Morbidität und Mortalität und wird in ihrer Progredienz in erster Linie durch die Anzahl und Schwere von Exazerbationen bestimmt.

Bakterielle Infektionen sind als häufigste Ursache für Exazerbationen der COPD verantwortlich. *Haemophilus influenzae* ist das am häufigsten isolierte Bakterium bei solchen Infektexazerbationen und somit von besonderer Bedeutung hinsichtlich Pathogenese und Therapie. Eine antibiotische Therapie der bakteriellen Infektionen hat demnach eine extrem große Bedeutung. Zusätzlich spielen immunmodulatorische Mechanismen bei der Entstehung von Exazerbationen eine entscheidende Rolle, die Gegenstand dieser Arbeit waren.

Für unsere Versuche verwendeten wir humanes Lungengewebe von Patienten, die sich aufgrund pulmonaler Rundherde oder Ähnlichem einem thoraxchirurgischen Eingriff unterziehen mußten. Nach *in vitro*-Stimulation mit *Hämophilus influenzae* und Zugabe von Moxifloxacin oder Ceftriaxon untersuchten wir das Lungengewebe und die Gewebeüberstände hinsichtlich immunologischer Veränderungen auf Rezeptorebene und die dadurch bedingten Änderung der Sekretion inflammatorischer Mediatoren.

Unsere *ex vivo* Ergebnisse konnten bei mit Moxifloxacin stimulierten Lungen eine signifikante Reduktion der Konzentration des proinflammatorisch wirkenden Interleukin-8 zeigen. Zusätzlich konnte eine Reduktion der Expression des Toll-like Rezeptor 2 in humanem Lungengewebe durch Moxifloxacin beobachtet werden. Neben den antimikrobiellen Effekten einer antibiotischen Therapie weisen unsere Ergebnisse auf zusätzliche immunmodulatorische Eigenschaften von Moxifloxacin in humanem Lungengewebe hin.

Immunmodulatorische Effekte zur Reduktion der entzündlichen Aktivität können ein zusätzlicher Benefit in der Therapie der COPD und der Exazerbation sein, da bei der Pathogenese der COPD eine chronische Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle spielt. Durch immunmodulatorische Effekte der eingesetzten Pharmaka könnte durch die Prävention von Exazerbationen die Progression der Erkrankung möglicherweise verzögert und die Lebensqualität der Patienten gebessert werden.

6 Literatur

1. Agusti A. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary diseases: what we know and what we don't know (but should). *Proc Am Thorac Soc.* 2007; (4(7)):522–5.
2. Albert RK, Connett J, Bailey WC, Casaburi R, Cooper, J Allen D, Criner GJ et al. Azithromycin for prevention of exacerbations of COPD. *The New England journal of medicine* 2011; 365(8):689–98.
3. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry* 2014; 53(10):1565–74.
4. Altin T, Ozcan O, Turhan S, Ongun Ozdemir A, Akyurek O, Karaoguz R et al. Torsade de pointes associated with moxifloxacin: a rare but potentially fatal adverse event. *The Canadian journal of cardiology* 2007; 23(11):907–8.
5. Amsden GW. Anti-inflammatory effects of macrolides--an underappreciated benefit in the treatment of community-acquired respiratory tract infections and chronic inflammatory pulmonary conditions? *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2005; 55(1):10–21.
6. Anthonisen NR, Skeans MA, Wise RA, Manfreda J, Kanner RE, Connett JE. The effects of a smoking cessation intervention on 14.5-year mortality: a randomized clinical trial. *Annals of internal medicine* 2005; 142(4):233–9.
7. Anzueto A, Sethi S, Martinez FJ. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2007; 4(7):554–64.
8. Araujo FG, Slifer TL, Remington JS. Effect of moxifloxacin on secretion of cytokines by human monocytes stimulated with lipopolysaccharide. *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2002; 8(1):26–30.
9. Bafadhel M, Clark TW, Reid C, Medina M, Batham S, Barer MR et al. Procalcitonin and C-reactive protein in hospitalized adult patients with community-acquired pneumonia or exacerbation of asthma or COPD. *Chest* 2011; 139(6):1410–8.

10. Bafadhel M, McKenna S, Terry S, Mistry V, Reid C, Haldar P et al. Acute exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: identification of biologic clusters and their biomarkers. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(6):662–71.
11. Ball P. Epidemiology and treatment of chronic bronchitis and its exacerbations. *Chest* 1995; 108(2 Suppl):43S-52S.
12. Barjaktarevic IZ, Arredondo AF, Cooper CB. Positioning new pharmacotherapies for COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 2015; 10:1427–42.
13. Barnes PJ. Chronic obstructive pulmonary disease: a growing but neglected global epidemic. *PLoS medicine* 2007; 4(5):e112.
14. Barnes PJ, Celli R. Systemic manifestations and comorbidities of COPD. *Eur. Respir.J* 2009; (33(5)):1165–85.
15. Berenson CS, Kruzel RL, Eberhardt E, Dolnick R, Minderman H, Wallace PK et al. Impaired innate immune alveolar macrophage response and the predilection for COPD exacerbations. *Thorax* 2014; 69(9):811–8.
16. Blasi F, Bonardi D, Aliberti S, Tarsia P, Confalonieri M, Amir O et al. Long-term azithromycin use in patients with chronic obstructive pulmonary disease and tracheostomy. *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 2010; 23(3):200–7.
17. Blau H, Klein K, Shalit I, Halperin D, Fabian I. Moxifloxacin but not ciprofloxacin or azathioprin selectively inhibits IL-8, IL-6 ERK1/2 JNK, and NF-kappa B activation in a cystic fibrosis epithelial cell line. *Am J Physiol Lung cell Mol Physiol* 2007; (292(1)):343–52.
18. Brandstetter RD, Kazemi H. Aging and the respiratory system. *The Medical clinics of North America* 1983; 67(2):419–31.
19. Brightling CE, Bleecker ER, Panettieri RA, Bafadhel M, She D, Ward CK et al. Benralizumab for chronic obstructive pulmonary disease and sputum eosinophilia: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a study. *The Lancet. Respiratory medicine* 2014; 2(11):891–901.

20. Brueggemann AB, Kugler KC, Doern GV. In vitro activity of BAY 12-8039, a novel 8-methoxyquinolone, compared to activities of six fluoroquinolones against *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(7):1594–7.
21. Butorac-Petanjek B, Parnham MJ, Popovic-Grle S. Antibiotic therapy for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease (COPD). *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)* 2010; 22(5):291–7.
22. Cabello H, Torres A, Celis R, El-Ebiary M, Puig de la Bellacasa, J, Xaubet A et al. Bacterial colonization of distal airways in healthy subjects and chronic lung disease: a bronchoscopic study. *Eur Respir J* 1997; 10(5):1137–44.
23. Calbo E, Alsina M, Rodríguez-Carballeira M, Lite J, Garau J. Systemic expression of cytokine production in patients with severe pneumococcal pneumonia: effects of treatment with a beta-lactam versus a fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(7):2395–402.
24. Caramori G, Adcock IM, Di Stefano A, Chung KF. Cytokine inhibition in the treatment of COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 2014; 9:397–412.
25. Cavarra E, Lucattelli M, Gambelli F, Bartalesi B, Fineschi S, Szarka A et al. Human SLPI inactivation after cigarette smoke exposure in a new in vivo model of pulmonary oxidative stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281(2):L412-7.
26. Celli BR, Halbert RJ, Nordyke RJ, Schau B. Airway obstruction in never smokers: results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Med* 2005; 118(12):1364–72.
27. Charlson ES, Bittinger K, Haas AR, Fitzgerald AS, Frank I, Yadav A et al. Topographical continuity of bacterial populations in the healthy human respiratory tract. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184(8):957–63.
28. Cheng G, Hao H, Dai M, Liu Z, Yuan Z. Antibacterial action of quinolones: from target to network. *European journal of medicinal chemistry* 2013; 66:555–62.

29. Choi J, Song M, Kim S, Choi S, Lee D, Yoo J et al. Effect of moxifloxacin on production of proinflammatory cytokines from human peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(12):3704–7.
30. Cholon DM, Cutter D, Richardson SK, Sethi S, Murphy TF, Look DC et al. Serial isolates of persistent *Haemophilus influenzae* in patients with chronic obstructive pulmonary disease express diminishing quantities of the HMW1 and HMW2 adhesins. *Infection and immunity* 2008; 76(10):4463–8.
31. Chou H, Wang J, Chang C, Lai C, Lai M, Chan KA. Risks of cardiac arrhythmia and mortality among patients using new-generation macrolides, fluoroquinolones, and β -lactam/ β -lactamase inhibitors: a Taiwanese nationwide study. *Clin Infect Dis* 2015; 60(4):566–77.
32. Cosio BG, Tsaprouni L, Ito K, Jazrawi E, Adcock IM, Barnes PJ. Theophylline restores histone deacetylase activity and steroid responses in COPD macrophages. *J Exp Med* 2004; 200(5):689–95.
33. Dalhoff A. Immunomodulatory activities of fluoroquinolones. *Infection* 2005; 33 Suppl 2:55–70.
34. Dalhoff A, Shalit I. Immunomodulatory effects of quinolones. *Lancet Infect Dis* 2003; 3(6):359–71.
35. Donaldson GC, Seemungal, T A R, Bhowmik A, Wedzicha JA. Relationship between exacerbation frequency and lung function decline in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 2002; 57(10):847–52.
36. Donaldson GC, Seemungal, T A R, Patel IS, Lloyd-Owen SJ, Wilkinson, T M A, Wedzicha JA. Longitudinal changes in the nature, severity and frequency of COPD exacerbations. *Eur Respir J* 2003; 22(6):931–6.
37. Drlica K, Malik M, Kerns RJ, Zhao X. Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(2):385–92.
38. Droemann D, Goldmann T, Branscheid D, Clark R, Dalhoff K, Zabel P et al. Toll-like receptor 2 is expressed by alveolar epithelial cells type II and macrophages in the human

lung. *Histochem Cell Biol* 2003; 119(2):103–8.

39. Droemann D, Goldmann T, Tiedje T, Zabel P, Dalhoff K, Schaaf B. Toll-like receptor 2 expression is decreased on alveolar macrophages in cigarette smokers and COPD patients. *Respir Res* 2005; 6:68.

40. Droemann D, Rupp J, Goldmann T, Uhlig U, Branscheid D, Vollmer E et al. Disparate innate immune responses to persistent and acute *Chlamydia pneumoniae* infection in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175(8):791–7.

41. Dromann D, Rupp J, Rohmann K, Osbahr S, Ulmer AJ, Marwitz S et al. The TGF-beta-pseudoreceptor BAMBI is strongly expressed in COPD lungs and regulated by nontypeable *Haemophilus influenzae*. *Respir Res* 2010; 11:67.

42. Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA et al. Analysis of the lung microbiome in the "healthy" smoker and in COPD. *PloS one* 2011; 6(2):e16384.

43. Erwin AL, Smith AL. Nontypeable *Haemophilus influenzae*: understanding virulence and commensal behavior. *Trends Microbiol* 2007; 15(8):355–62.

44. Esther CR, Esserman DA, Gilligan P, Kerr A, Noone PG. Chronic *Mycobacterium abscessus* infection and lung function decline in cystic fibrosis. *Journal of cystic fibrosis : official journal of the European Cystic Fibrosis Society* 2010; 9(2):117–23.

45. Fachinformation Avalox, Rote Liste Service Gmbh, Frankfurt, Stand: Mai 2017. Fachinformation Avalox, Rote Liste Service Gmbh, Frankfurt, Stand: Mai 2017.

46. Falagas ME, Rafailidis PI, Rosmarakis ES. Arrhythmias associated with fluoroquinolone therapy. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29(4):374–9.

47. Flanders SA, Dudas V, Kerr K, McCulloch CE, Gonzales R. Effectiveness of ceftriaxone plus doxycycline in the treatment of patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Journal of hospital medicine* 2006; 1(1):7–12.

48. Fletcher C, Peto R. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J* 1977; 1(6077):1645–8.

49. Frothingham R. Rates of torsades de pointes associated with ciprofloxacin, ofloxacin, levofloxacin, gatifloxacin, and moxifloxacin. *Pharmacotherapy* 2001; 21(12):1468–72.
50. Garcha DS, Thurston SJ, Patel, Anant R C, Mackay AJ, Goldring, James J P, Donaldson GC et al. Changes in prevalence and load of airway bacteria using quantitative PCR in stable and exacerbated COPD. *Thorax* 2012; 67(12):1075–80.
51. Garcia-Nuñez M, Millares L, Pomares X, Ferrari R, Pérez-Brocal V, Gallego M et al. Severity-related changes of bronchial microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of clinical microbiology* 2014; 52(12):4217–23.
52. Ginsburg I. The role of bacteriolysis in the pathophysiology of inflammation, infection and post-infectious sequelae. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 2002; 110(11):753–70.
53. Gladysheva ES, Malhotra A, Owens RL. Influencing the decline of lung function in COPD: use of pharmacotherapy. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 2010; 5:153–64.
54. Gold DR, Wang X, Wypij D, Speizer FE, Ware JH, Dockery DW. Effects of cigarette smoking on lung function in adolescent boys and girls. *The New England journal of medicine* 1996; 335(13):931–7.
55. Gold (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive. Gold (Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease) Global strategy for the diagnosis, management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease, 2017 report. Available from: URL:www.goldcopd.org.
56. Goldmann T, Wiedorn KH, Kuhl H, Olert J, Branscheid D, Pechkovsky D et al. Assessment of transcriptional gene activity in situ by application of HOPE-fixed, paraffin-embedded tissues. *Pathol Res Pract* 2002; 198(2):91–5.
57. Hacievliyagil SS, Gunen H, Mutlu LC, Karabulut AB, Temel I. Association between cytokines in induced sputum and severity of chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2006; 100(5):846–54.

58. Hill AT, Campbell EJ, Hill SL, Bayley DL, Stockley RA. Association between airway bacterial load and markers of airway inflammation in patients with stable chronic bronchitis. *Am J Med* 2000; 109(4):288–95.
59. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PloS one* 2010; 5(1):e8578.
60. Hogg JC, Chu F, Utokaparch S, Woods R, Elliott WM, Buzatu L et al. The nature of small-airway obstruction in chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2004; 350(26):2645–53.
61. Holtmann H, Winzen R, Holland P, Eickemeier S, Hoffmann E, Wallach D et al. Induction of interleukin-8 synthesis integrates effects on transcription and mRNA degradation from at least three different cytokine- or stress-activated signal transduction pathways. *Molecular and cellular biology* 1999; 19(10):6742–53.
62. Homma T, Kato A, Hashimoto N, Batchelor J, Yoshikawa M, Imai S et al. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2004; 31(4):463–9.
63. Hooper DC, editor. *Quinolone antimicrobial agents*. 2. ed. Washington D. C.: American Soc. for Microbiology; 1993.
64. Huang YJ, Sethi S, Murphy T, Nariya S, Boushey HA, Lynch SV. Airway microbiome dynamics in exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Journal of clinical microbiology* 2014; 52(8):2813–23.
65. Hurst JR, Donaldson GC, Quint JK, Goldring, James J P, Baghai-Ravary R, Wedzicha JA. Temporal clustering of exacerbations in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179(5):369–74.
66. Hurst JR, Vestbo J, Anzueto A, Košnik M. Susceptibility to exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *New England journal of medicine* 2010; 363(12):1128–38.
67. Hurst JR, Wilkinson, Tom M A, Perera WR, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationships among bacteria, upper airway, lower airway, and systemic inflammation in

COPD. *Chest* 2005; 127(4):1219–26.

68. Iannini PB. Cardiotoxicity of macrolides, ketolides and fluoroquinolones that prolong the QTc interval. *Expert Opin Drug Saf* 2002; 1(2):121–8.

69. Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA* 2005; 294(10):1255–9.

70. Jono H, Shuto T, Xu H, Kai H, Lim DJ, Gum, James R Jr et al. Transforming growth factor-beta -Smad signaling pathway cooperates with NF-kappa B to mediate nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced MUC2 mucin transcription. *J Biol Chem* 2002; 277(47):45547–57.

71. Kanoh S, Rubin BK. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin Microbiol Rev* 2010; 23(3):590–615.

72. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 153(2):530–4.

73. Krasemann C, Meyer J, Tillotson G. Evaluation of the clinical microbiology profile of moxifloxacin. *Clin Infect Dis* 2001; 32 Suppl 1:S51-63.

74. Krause A, Holtmann H, Eickemeier S, Winzen R, Szamel M, Resch K et al. Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB. *J Biol Chem* 1998; 273(37):23681–9.

75. Lange P, Parner J, Vestbo J, Schnohr P, Jensen G. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *The New England journal of medicine* 1998; 339(17):1194–200.

76. Li H, Zhu S, He S, Hao L. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on rat airway smooth muscle cells exposed to allergen: Inhibition of extracellular-signal-regulated kinase and nuclear factor-κB activation and of interleukin-8 and eotaxin synthesis. *Respirology (Carlton, Vic.)* 2012; 17(6):997–1005.

77. Li J. Exploitation of host epithelial signaling networks by respiratory bacterial pathogens. *Journal of pharmacological sciences* 2003; 91(1):1–7.
78. Liu Y, Wang Y, Yamakuchi M, Isowaki S, Nagata E, Kanmura Y et al. Upregulation of toll-like receptor 2 gene expression in macrophage response to peptidoglycan and high concentration of lipopolysaccharide is involved in NF-kappa b activation. *Infection and immunity* 2001; 69(5):2788–96.
79. Louhelainen N, Ryttilä P, Haahtela T, Kinnula VL, Djukanovic R. Persistence of oxidant and protease burden in the airways after smoking cessation. *BMC Pulm Med* 2009; 9:25.
80. Macnee W. Pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Chest Med* 2007; 28(3):479-513, v.
81. Macnee W, Allan RJ, Jones I, De Salvo, Maria Cristina, Tan LF. Efficacy and safety of the oral p38 inhibitor PH-797804 in chronic obstructive pulmonary disease: a randomised clinical trial. *Thorax* 2013; 68(8):738–45.
82. Malhotra-Kumar S, Lammens C, Coenen S, van Herck K, Goossens H. Effect of azithromycin and clarithromycin therapy on pharyngeal carriage of macrolide-resistant streptococci in healthy volunteers: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet (London, England)* 2007; 369(9560):482–90.
83. Mammen MJ, Sethi S. COPD and the microbiome. *Respirology (Carlton, Vic.)* 2016.
84. Mannino DM, Buist AS. Global burden of COPD: risk factors, prevalence, and future trends. *Lancet* 2007; 370(9589):765–73.
85. Maraffi T, Piffer F, Cosentini R. Prophylactic antibiotic therapy in chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Respir Dis* 2010; 4(3):135–42.
86. Marin A, Garcia-Aymerich J, Sauleda J, Belda J, Millares L, García-Núñez M et al. Effect of Bronchial Colonisation on Airway and Systemic Inflammation in Stable COPD. *COPD* 2012.
87. Marin A, Monsó E, Garcia-Núñez M, Sauleda J, Noguera A, Pons J et al. Variability and effects of bronchial colonisation in patients with moderate COPD. *Eur Respir J* 2010;

35(2):295–302.

88. Matera MG, Page C, Cazzola M. PDE inhibitors currently in early clinical trials for the treatment of asthma. *Expert opinion on investigational drugs* 2014; 23(9):1267–75.

89. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway, C A Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388(6640):394–7.

90. Miravittles M. Exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease: when are bacteria important? *Eur Respir J Suppl* 2002; 36:9s-19s.

91. Miravittles M. Moxifloxacin in the management of exacerbations of chronic bronchitis and COPD. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease* 2007; 2(3):191–204.

92. Miravittles M, Anzueto A. Antibiotic prophylaxis in COPD: Why, when, and for whom? *Pulmonary pharmacology & therapeutics* 2015; 32:119–23.

93. Miravittles M, Espinosa C, Fernandez-Laso E, Martos JA, Maldonado JA, Gallego M. Relationship between bacterial flora in sputum and functional impairment in patients with acute exacerbations of COPD. *Study Group of Bacterial Infection in COPD. Chest* 1999; 116(1):40–6.

94. Monso E, Ruiz J, Rosell A, Manterola J, Fiz J, Morera J et al. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. A study of stable and exacerbated outpatients using the protected specimen brush. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152(4 Pt 1):1316–20.

95. Moore LJ, Pridmore AC, Dower SK, Read RC. Penicillin enhances the toll-like receptor 2-mediated proinflammatory activity of *Streptococcus pneumoniae*. *The Journal of infectious diseases* 2003; 188(7):1040–8.

96. Neff L, Zeisel M, Sibia J, Schöller-Guinard M, Klein JP, Wachsmann D. NF-kappaB and the MAP kinases/AP-1 pathways are both involved in interleukin-6 and interleukin-8 expression in fibroblast-like synoviocytes stimulated by protein I/II, a modulin from oral streptococci. *Cellular microbiology* 2001; 3(10):703–12.

97. Nelson MB, Murphy TF, van Keulen H, Rekosh D, Apicella MA. Studies on P6, an important outer-membrane protein antigen of Haemophilus influenzae. Rev Infect Dis 1988; 10 Suppl 2:S331-6.
98. Norman P. Investigational p38 inhibitors for the treatment of chronic obstructive pulmonary disease. Expert opinion on investigational drugs 2015; 24(3):383–92.
99. Ogino H, Fujii M, Ono M, Maezawa K, Hori S, Kizu J. In vivo and in vitro effects of fluoroquinolones on lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production. Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy 2009; 15(3):168–73.
100. Papi A, Bellettato CM, Braccioni F, Romagnoli M, Casolari P, Caramori G et al. Infections and airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease severe exacerbations. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173(10):1114–21.
101. Parker LC, Prince LR, Sabroe I. Translational mini-review series on Toll-like receptors: networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. Clin Exp Immunol 2007; 147(2):199–207.
102. Patel IS, Seemungal, T A R, Wilks M, Lloyd-Owen SJ, Donaldson GC, Wedzicha JA. Relationship between bacterial colonisation and the frequency, character, and severity of COPD exacerbations. Thorax 2002; 57(9):759–64.
103. Pinner NA, Hamilton LA, Hughes A. Roflumilast: a phosphodiesterase-4 inhibitor for the treatment of severe chronic obstructive pulmonary disease. Clinical therapeutics 2012; 34(1):56–66.
104. Pittman M. Variation and type Specificity in the bacterial species hemophilus influenzae . J Exp Med 1931; 53(4):471–92.
105. Pomares X, Montón C, Espasa M, Casabon J, Monsó E, Gallego M. Long-term azithromycin therapy in patients with severe COPD and repeated exacerbations. International journal of chronic obstructive pulmonary disease 2011; 6:449–56.
106. Pons J, Sauleda J, Regueiro V, Santos C, López M, Ferrer J et al. Expression of Toll-like receptor 2 is up-regulated in monocytes from patients with chronic obstructive

pulmonary disease. *Respir Res* 2006; 7:64.

107. Poole P, Chong J, Cates CJ. Mucolytic agents versus placebo for chronic bronchitis or chronic obstructive pulmonary disease. *The Cochrane database of systematic reviews* 2015; (7):CD001287.

108. Punturieri A, Copper P, Polak T, Christensen PJ, Curtis JL. Conserved nontypeable *Haemophilus influenzae*-derived TLR2-binding lipopeptides synergize with IFN-beta to increase cytokine production by resident murine and human alveolar macrophages. *J Immunol* 2006; 177(1):673–80.

109. Rahman I, Adcock IM. Oxidative stress and redox regulation of lung inflammation in COPD. *Eur Respir J* 2006; 28(1):219–42.

110. Rangelov K, Sethi S. Role of infections. *Clin Chest Med* 2014; 35(1):87–100.

111. Rennard SI, Dale DC, Donohue JF, Kanniss F, Magnussen H, Sutherland ER et al. CXCR2 Antagonist MK-7123. A Phase 2 Proof-of-Concept Trial for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2015; 191(9):1001–11.

112. Rohmann K, Tschernig T, Pabst R, Goldmann T, Drömann D. Innate immunity in the human lung: pathogen recognition and lung disease. *Cell and tissue research* 2011; 343(1):167–74.

113. Rohmann K. Die angeborene Immunität in der humanen Lunge [Inauguraldissertation]. Lübeck: Universität zu Lübeck; 2011.

114. Rosell A, Monsó E, Soler N, Torres F, Angrill J, Riise G et al. Microbiologic determinants of exacerbation in chronic obstructive pulmonary disease. *Archives of internal medicine* 2005; 165(8):891–7.

115. Rotta Detto Loria, Johannes, Rohmann K, Droemann D, Kujath P, Rupp J, Goldmann T et al. Nontypeable *Haemophilus Influenzae* Infection Upregulates the NLRP3 Inflammasome and Leads to Caspase-1-Dependent Secretion of Interleukin-1beta - A Possible Pathway of Exacerbations in COPD. *PloS one* 2013; 8(6):e66818.

116. Sadowska AM. N-Acetylcysteine mucolysis in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Ther Adv Respir Dis* 2012; 6(3):127–35.
117. Schuerholz T, Brandenburg K, Marx G. Antimicrobial peptides and their potential application in inflammation and sepsis. *Critical care (London, England)* 2012; 16(2):207.
118. Schultz MJ. Macrolide activities beyond their antimicrobial effects: macrolides in diffuse panbronchiolitis and cystic fibrosis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2004; 54(1):21–8.
119. Seemungal TA, Donaldson GC, Paul EA, Bestall JC, Jeffries DJ, Wedzicha JA. Effect of exacerbation on quality of life in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(5 Pt 1):1418–22.
120. Seemungal, Terence A R, Wilkinson, Tom M A, Hurst JR, Perera WR, Sapsford RJ, Wedzicha JA. Long-term erythromycin therapy is associated with decreased chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178(11):1139–47.
121. Sethi S, Evans N, Grant, Brydon J B, Murphy TF. New strains of bacteria and exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2002; 347(7):465–71.
122. Sethi S, Mallia P, Johnston SL. New paradigms in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease II. *Proc Am Thorac Soc* 2009; 6(6):532–4.
123. Sethi S, Maloney J, Grove L, Wrona C, Berenson CS. Airway inflammation and bronchial bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173(9):991–8.
124. Sethi S, Murphy TF. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14(2):336–63.
125. Sethi S, Murphy TF. Infection in the pathogenesis and course of chronic obstructive pulmonary disease. *The New England journal of medicine* 2008; 359(22):2355–65.
126. Sethi S, Wrona C, Eschberger K, Lobbins P, Cai X, Murphy TF. Inflammatory profile

of new bacterial strain exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177(5):491–7.

127. Shalit I, Halperin D, Haite D, Levitov A, Romano J, Osherov N et al. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on IL-8, IL-1beta and TNF-alpha secretion and NFkappaB and MAP-kinase activation in human monocytes stimulated with *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2006; 57(2):230–5.

128. Shapiro SD. Proteolysis in the lung. *Eur Respir J Suppl* 2003; 44:30s-32s.

129. Shinkai M, López-Boado YS, Rubin BK. Clarithromycin has an immunomodulatory effect on ERK-mediated inflammation induced by *Pseudomonas aeruginosa* flagellin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2007; 59(6):1096–101.

130. Shuto T, Imasato A, Jono H, Sakai A, Xu H, Watanabe T et al. Glucocorticoids synergistically enhance nontypeable *Haemophilus influenzae*-induced Toll-like receptor 2 expression via a negative cross-talk with p38 MAP kinase. *J Biol Chem* 2002; 277(19):17263–70.

131. Shuto T, Xu H, Wang B, Han J, Kai H, Gu XX et al. Activation of NF-kappa B by nontypeable *Hemophilus influenzae* is mediated by toll-like receptor 2-TAK1-dependent NIK-IKK alpha /beta-I kappa B alpha and MKK3/6-p38 MAP kinase signaling pathways in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(15):8774–9.

132. Sin DD, Man, S F Paul. Impact of cancers and cardiovascular diseases in chronic obstructive pulmonary disease. *Curr Opin Pulm Med* 2008; 14(2):115–21.

133. Singh R, Mackay AJ, Patel AR, Garcha DS, Kowlessar BS, Brill SE et al. Inflammatory thresholds and the species-specific effects of colonising bacteria in stable chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Res* 2014; 15:114.

134. Soler N, Esperatti M, Ewig S, Huerta A, Agustí C, Torres A. Sputum purulence-guided antibiotic use in hospitalised patients with exacerbations of COPD. *Eur Respir J* 2012; 40(6):1344–53.

135. Soler N, Torres A, Ewig S, Gonzalez J, Celis R, El-Ebiary M et al. Bronchial microbial patterns in severe exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease

(COPD) requiring mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157(5 Pt 1):1498–505.

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

137. Soman A, Honeybourne D, Andrews J, Jevons G, Wise R. Concentrations of moxifloxacin in serum and pulmonary compartments following a single 400 mg oral dose in patients undergoing fibre-optic bronchoscopy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1999; 44(6):835–8.

138. Soriano JB, Lamprecht B, Ramírez AS, Martínez-Cambler P, Kaiser B, Alfageme I et al. Mortality prediction in chronic obstructive pulmonary disease comparing the GOLD 2007 and 2011 staging systems: a pooled analysis of individual patient data. *The Lancet. Respiratory medicine* 2015; 3(6):443–50.

139. Stuertz K, Schmidt H, Eiffert H, Schwartz P, Mäder M, Nau R. Differential release of lipoteichoic and teichoic acids from *Streptococcus pneumoniae* as a result of exposure to beta-lactam antibiotics, rifamycins, trovafloxacin, and quinupristin-dalfopristin. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42(2):277–81.

140. Suresh Babu K, Kastelik J, Morjaria JB. Role of long term antibiotics in chronic respiratory diseases. *Respir Med* 2013; 107(6):800–15.

141. Swords WE. Nontypeable *Haemophilus influenzae* biofilms: role in chronic airway infections. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 2012; 2:97.

142. Swords WE, Jones PA, Apicella MA. The lipo-oligosaccharides of *Haemophilus influenzae*: an interesting array of characters. *J Endotoxin Res* 2003; 9(3):131–44.

143. Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink JV et al. The lung tissue microbiome in chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185(10):1073–80.

144. Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, Kawasaki S, Kohyama T, Sato M et al. Erythromycin modulates IL-8 expression in normal and inflamed human bronchial

epithelial cells. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156(1):266–71.

145. Taylor AE, Finney-Hayward TK, Quint JK, Thomas, C M R, Tudhope SJ, Wedzicha JA et al. Defective macrophage phagocytosis of bacteria in COPD. *Eur Respir J* 2010; 35(5):1039–47.

146. Thorleifsson SJ, Margretardottir OB, Gudmundsson G, Olafsson I, Benediktsdottir B, Janson C et al. Chronic airflow obstruction and markers of systemic inflammation: results from the BOLD study in Iceland. *Respir Med* 2009; 103(10):1548–53.

147. Tramper-Stranders GA, Wolfs, Tom F W, Fleer A, Kimpen, Jan L L, van der Ent, Cornelis K. Maintenance azithromycin treatment in pediatric patients with cystic fibrosis: long-term outcomes related to macrolide resistance and pulmonary function. *The Pediatric infectious disease journal* 2007; 26(1):8–12.

148. Tuomanen E, Hengstler B, Rich R, Bray MA, Zak O, Tomasz A. Nonsteroidal anti-inflammatory agents in the therapy for experimental pneumococcal meningitis. *The Journal of infectious diseases* 1987; 155(5):985–90.

149. Tuomanen E, Liu H, Hengstler B, Zak O, Tomasz A. The induction of meningeal inflammation by components of the pneumococcal cell wall. *The Journal of infectious diseases* 1985; 151(5):859–68.

150. Tuomanen E, Rich R, Zak O. Induction of pulmonary inflammation by components of the pneumococcal cell surface. *The American review of respiratory disease* 1987; 135(4):869–74.

151. Turk DC. The pathogenicity of *Haemophilus influenzae*. *J Med Microbiol* 1984; 18(1):1–16.

152. Veeramachaneni SB, Sethi S. Pathogenesis of bacterial exacerbations of COPD. *COPD* 2006; 3(2):109–15.

153. Vogelmeier C. Leitlinie der Deutschen Atemwegsliga und der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin zur Diagnostik und Therapie von Patienten mit chronisch obstruktiver Bronchitis und Lungenemphysem

. Stuttgart: Thieme; 2007. (Pneumologie61.2007, Sonderdr).

154. Vollenweider DJ, Jarrett H, Steurer-Stey CA, Garcia-Aymerich J, Puhan MA. Antibiotics for exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. The Cochrane database of systematic reviews 2012; 12:CD010257.

155. Wagner C, Goldmann T, Rohmann K, Rupp J, Marwitz S, Rotta Detto Loria, Johannes et al. Budesonide Inhibits Intracellular Infection with Non-Typeable Haemophilus influenzae Despite Its Anti-Inflammatory Effects in Respiratory Cells and Human Lung Tissue: A Role for p38 MAP Kinase. Respiration; international review of thoracic diseases 2015; 90(5):416–25.

156. Wang B, Lim DJ, Han J, Kim YS, Basbaum CB, Li J. Novel cytoplasmic proteins of nontypeable Haemophilus influenzae up-regulate human MUC5AC mucin transcription via a positive p38 mitogen-activated protein kinase pathway and a negative phosphoinositide 3-kinase-Akt pathway. J Biol Chem 2002; 277(2):949–57.

157. Weiss T, Shalit I, Blau H, Werber S, Halperin D, Levitov A et al. Anti-inflammatory effects of moxifloxacin on activated human monocytic cells: inhibition of NF-kappaB and mitogen-activated protein kinase activation and of synthesis of proinflammatory cytokines. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48(6):1974–82.

158. Werber S, Shalit I, Fabian I, Steuer G, Weiss T, Blau H. Moxifloxacin inhibits cytokine-induced MAP kinase and NF-kappaB activation as well as nitric oxide synthesis in a human respiratory epithelial cell line. The Journal of antimicrobial chemotherapy 2005; 55(3):293–300.

159. White AJ, Gompertz S, Stockley RA. Chronic obstructive pulmonary disease 6: The aetiology of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 2003; 58(1):73–80.

160. WHO. WHO. Available from: URL:www.who.int.

161. Wieland CW, Florquin S, Maris NA, Hoebe K, Beutler B, Takeda K et al. The MyD88-dependent, but not the MyD88-independent, pathway of TLR4 signaling is important in clearing nontypeable haemophilus influenzae from the mouse lung. J

Immunol 2005; 175(9):6042–9.

162. Wilson R, Allegra L, Huchon G, Izquierdo J, Jones P, Schaberg T et al. Short-term and long-term outcomes of moxifloxacin compared to standard antibiotic treatment in acute exacerbations of chronic bronchitis. *Chest* 2004; 125(3):953–64.

163. Wilson R, Anzueto A, Miravittles M, Arvis P, Alder J, Haverstock D et al. Moxifloxacin versus amoxicillin/clavulanic acid in outpatient acute exacerbations of COPD: MAESTRAL results. *Eur Respir J* 2012; 40(1):17–27.

164. Wilson R, Jones P, Schaberg T, Arvis P, Duprat-Lomon I, Sagnier PP. Antibiotic treatment and factors influencing short and long term outcomes of acute exacerbations of chronic bronchitis. *Thorax* 2006; 61(4):337–42.

165. Wilson R, Kubin R, Ballin I, Deppermann KM, Bassaris HP, Leophonte P et al. Five day moxifloxacin therapy compared with 7 day clarithromycin therapy for the treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 1999; 44(4):501–13.

166. Wilson R, Sethi S, Anzueto A, Miravittles M. Antibiotics for treatment and prevention of exacerbations of chronic obstructive pulmonary disease. *The Journal of infection* 2013; 67(6):497–515.

167. Xu F, Droemann D, Rupp J, Shen H, Wu X, Goldmann T et al. Modulation of the inflammatory response to *Streptococcus pneumoniae* in a model of acute lung tissue infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 2008; 39(5):522–9.

168. Yamamoto C, Yoneda T, Yoshikawa M, Fu A, Tokuyama T, Tsukaguchi K et al. Airway inflammation in COPD assessed by sputum levels of interleukin-8. *Chest* 1997; 112(2):505–10.

169. Yoshida T, Tuder RM. Pathobiology of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease. *Physiol Rev* 2007; 87(3):1047–82.

170. Zalacain R, Sobradillo V, Amilibia J, Barron J, Achotegui V, Pijoan JI et al. Predisposing factors to bacterial colonization in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 1999; 13(2):343–8.

171. Zarogoulidis P, Papanas N, Kioumis I, Chatzaki E, Maltezos E, Zarogoulidis K. Macrolides: from in vitro anti-inflammatory and immunomodulatory properties to clinical practice in respiratory diseases. *Eur J Clin Pharmacol* 2012; 68(5):479–503.
172. Zhang X, Zheng H, Zhang H, Ma W, Wang F, Liu C et al. Increased interleukin (IL)-8 and decreased IL-17 production in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) provoked by cigarette smoke. *Cytokine* 2011; 56(3):717–25.
173. Zimmermann GS, Neurohr C, Villena-Hermoza H, Hatz R, Behr J. Anti-inflammatory effects of antibacterials on human Bronchial epithelial cells. *Respir Res* 2009; 10:89.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich für die langjährige Unterstützung vieler Menschen besonders bedanken.

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Klaus Dalhoff für die Überlassung des Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung während der letzten Jahre danken.

Außerdem möchte ich meinen ganz besonderen Dank Frau Prof. Dr. med. Brigitte Stiller aussprechen, für ihr unerschöpfliches Engagement, ihre moralische Unterstützung und ihre stete Hilfsbereitschaft, die ich sehr zu schätzen weiß.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Claudia Schmoor für die großartige Hilfe bei der statistischen Auswertung meiner Arbeit danken.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. rer. nat. Torsten Goldmann aus dem Institut für Klinische und Experimentelle Pathologie am Forschungszentrum Borstel für die Unterstützung bei *in situ*-Hybridisierung und Immunhistochemie.

Für meine Einarbeitung in die Laborarbeit und ihre praktische Mithilfe im Labor danke ich besonders Frau Dr. med. Kristina Rohmann und außerdem Frau Ute Knuppertz und Frau Heike Sauerbier, die mir alle während der gesamten Zeit durch ihre fachliche Kompetenz eine unverzichtbare Unterstützung waren.

Ich danke auch der Klinik für Chirurgie des UK-SH, Campus Lübeck, besonders Herrn Prof. Dr. med. Peter Kujath, für die Unterstützung bei der Patientenrekrutierung und Materialgewinnung.

Die uneingeschränkte Unterstützung, die ich in meinem Leben durch meine Eltern und meine Schwester erfahren darf, hat für mich einen unschätzbaren Wert.

Ich widme ihnen daher diese Arbeit.

8 Lebenslauf

Persönliches

Meike Schwendt

persönliche Daten: geboren am 25. Februar 1981 in Lübeck

Berufstätigkeit

- seit 01.01.2014 **Klinik für angeborene Herzfehler und Pädiatrische Kardiologie, Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin der Universitätsklinik Freiburg**
Assistenzärztin in der fachärztlichen Weiterbildung Pädiatrie
- 09.2011-31.12.2013: **Zentrum für Kinder- und Jugendmedizin, St. Elisabethen Krankenhaus Lörrach**
Assistenzärztin in der fachärztlichen Weiterbildung Pädiatrie
- 08.2006 – 07.2011: **Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck**
Medizinische Klinik II: internistische Intensivstation
Studentische Pflegekraft
- 06.2003 – 03.2004: **Deutsches Rotes Kreuz Kreisverband Lübeck e.V.**
Hauptamtliche Rettungsassistentin im Rettungsdienst der
Hansestadt Lübeck

Hochschulstudium und Schulbildung

- 10.2004 – 05.2011: Studium der Humanmedizin an der **Universität zu Lübeck**
- 05.2011: 2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08.2006: 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
- seit 2009: Dissertationsarbeit „*Immunmodulatorische Effekte von Moxifloxacin in humanem Lungengewebe*“
in der Medizinischen Klinik III für Pneumologie und Infektiologie am **Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck**
- 08.1991 – 07.2000: **Ernestinenschule zu Lübeck**
Abschluss: Abitur (allg. Hochschulreife)

Berufsausbildung

- 08.2001 – 06.2003: **Deutsches Rotes Kreuz Kreisverband Lübeck e.V.**
Ausbildung zur staatlich geprüften Rettungsassistentin

Lübeck, Juli 2018

