

Aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss von Ethanol auf TNF- α und IFN- γ produzierende CD4⁺
und CD8⁺ T-Zellen am operativen, infektiösen Mausmodell**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anett Neumann

aus Eisenhüttenstadt

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. C. Spies

2. Prof. Dr. Dr. K. Zacharowski

3. Priv.-Doz. Dr. med. vet. J. Unger

Datum der Promotion:

29. Januar 2010

*Der Beginn aller Wissenschaft ist das Erstaunen,
dass die Dinge so sind, wie sie sind.*

Aristoteles

Meiner Familie

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden vor Abschluss des Promotionsverfahrens mit Genehmigung des Promotionsausschusses des Universitätsklinikums Charité veröffentlicht:

Originalarbeit:

Spies, C. D.; Lanzke, N.; Schlichting, U.; Muehlbauer, S.; Pipolo, C.; von, Mettenheim M.; Lehmann, A.; Morawietz, L.; Nattermann, H.; Sander, M. (2008): Effects of ethanol on cytokine production after surgery in a murine model of gram-negative pneumonia. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 32, Nr. 2, Seite 331-338.

Abstract:

Lanzke, N.; Kleinwachter, R.; Kerschischnik, S.; Sargsyan, L.; Groneberg, D. A.; Kamradt, T.; Liesenfeld, O.; Krenn, V.; Sander, M.; Spies, C. (2007): Differential effects of ethanol on IFN-gamma- and TNF-alpha-producing splenic T lymphocytes in a murine model of gram-negative pneumonia. *Addict.Biol.*: Band 12, Nr. 1, Seite 59-68.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1
1.1	Bedeutung des Alkoholkonsums in der Bevölkerung	1
1.2	Relevanz des Alkoholkonsums im medizinischen Alltag	2
1.3	Immunsystem	3
1.3.1	Angeborene und erworbene Immunität.....	4
1.3.2	CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	4
1.3.3	TNF- α und IFN- γ - zwei essentielle Zytokine der Immunabwehr.....	6
1.3.4	Veränderung der immunologischen Parameter unter Alkoholeinfluss	7
1.3.5	Immunologische Veränderungen durch operativen Stress.....	9
1.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	11
1.4.1	Die Bedeutung der bakteriellen Virulenzfaktoren	11
1.4.2	Immunantwort auf Klebsiellenpneumonie bei Alkoholikern.....	11
1.5	Zielsetzung	13
2.	Materialien.....	15
2.1	Versuchstiere	15
2.1.1	Gruppeneinteilung	15
2.1.2	Ausschlusskriterien	15
2.2	Pufferherstellung	16
2.3	Antikörper	16
2.4	Verbrauchsmaterialien	16
2.5	Reagenzien	17
2.6	Geräte	18
2.7	Software	18
3.	Methoden	19
3.1	Gruppenspezifischer Versuchsablauf	19
3.2	OP-Modell	20
3.3	Erhebung des klinischen Scores	20
3.4	Tötung und Präparation der Versuchstiere.....	21
3.4.1	Blutentnahme und Tötung.....	21
3.4.2	Präparation von Lungen und Milz.....	21
3.4.3	Histologische Untersuchung nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung.....	22
3.5	Durchflusszytometrische Untersuchung	23
3.5.1	Herstellung einer Zellsuspension	25
3.5.2	Stimulation der T-Lymphozyten	26
3.5.3	Färbung der Oberflächenantigene CD4 ⁺ und CD8 ⁺	26
3.5.4	Färbung der intrazellulären Antigene TNF α und IFN γ	26
3.6	Postoperative Infektion mit <i>Klebsiella pneumoniae</i>	27
3.6.1	Tierpassage.....	27
3.6.2	Herstellen einer Nährbouillon	28
3.6.3	Infektion der Versuchstiere	28
3.6.4	Ausplattierung der Lungen für Keimzahlbestimmung.....	29
3.6.5	Ausplattierung eines Blutropfens für Bakteriämienachweis.....	29
3.7	Bestimmung der Alkoholkonzentration im Blut	29
3.8	Statistische Analyse.....	30

4.	Ergebnisse	31
4.1	Durchflusszytometrische Ergebnisse	31
4.1.1	Messung der TNF- α produzierenden CD4 ⁺ T-Lymphozyten	32
4.1.2	Messung der IFN- γ produzierenden CD4 ⁺ T-Lymphozyten	34
4.1.3	Messung der TNF- α produzierenden CD8 ⁺ T-Lymphozyten	36
4.1.4	Messung der IFN- γ produzierenden CD8 ⁺ T-Lymphozyten	38
4.2	Mikrobiologische Ergebnisse	40
4.2.1	Ergebnisse der Keimzahlbestimmung zur postoperativen Infektion.....	40
4.2.2	Keimzahlbestimmung von <i>Klebsiella pneumoniae</i> in den Lungen.....	40
4.2.3	Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse des Blutes	42
4.3	Histologische Ergebnisse	43
4.3.1	Histologie der Lunge	43
4.3.2	Histologie der Leber.....	45
4.4	Kriterien zur Beurteilung der Befindlichkeit der Tiere	45
4.5	Alkoholbestimmung im Blut.....	47
5.	Diskussion	49
5.1	Ethanoleinfluss auf Zytokin produzierende T-Zellen ohne Infektion	49
5.2	Immunsuppression unter Ethanol und Infektion	52
5.2.1	TNF- α produzierende CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Lymphozyten	52
5.2.2	IFN- γ produzierende CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Lymphozyten	54
5.2.3	Histologische und mikrobiologische Veränderungen	57
5.3	Methodendiskussion.....	58
5.3.1	OP-Modell.....	58
5.3.2	Infektionsmodell.....	60
5.3.3	Durchflusszytometrische Untersuchung	61
5.4	Schlussfolgerungen und Ausblick.....	62
6.	Zusammenfassung	65
	Literaturverzeichnis	67
	Anhang	81
	Abbildungsverzeichnis	81
	Tabellenverzeichnis.....	83
	Abkürzungsverzeichnis	85
	Lebenslauf	87
	Danksagung	89
	Erklärung an Eides Statt.....	91

1. Einleitung

1.1 Bedeutung des Alkoholkonsums in der Bevölkerung

Seit Menschen Gedenken wird dem Konsum von Alkohol, in Form von Ethanol, im gesellschaftlichen Leben eine besondere Bedeutung beigemessen. Die natürliche Gärung von Zuckern aus Früchten und Getreide zu Ethanol wurde bereits in frühen Jahren genutzt. Schon die Sumerer, die vor etwa 5000 Jahren lebten, hinterließen Keilschriften, auf denen die Bierherstellung detailliert festgehalten war. In der heutigen Zeit gehört Alkohol zu einer der am häufigsten missbrauchten Drogen der Welt [72].

Auch in Deutschland spielen der übermäßige Alkoholgenuss und dessen Folgen eine große Rolle. Während Deutschland 2003 mit einem jährlichen Pro-Kopf-Konsum von rund 11 Litern reinen Ethanols auf Platz 5 im europäischen Vergleich lag [147], konnte laut Angaben der Deutschen Hauptstelle für Suchtfragen e.V. 2007 ein leichter Rückgang des Pro-Kopf-Konsums auf 9,9 Liter verzeichnet werden [32].

Zur Charakterisierung des Alkoholkonsummusters finden sich in der Literatur neben der Betrachtung der konsumierten Alkoholmenge in den letzten 12 Monaten (Tabelle 1) [16] auch die Einteilung in internationalen Diagnose- und Klassifikationssystemen (ICD-10, DSM-IV), in denen mit Hilfe festgelegter Kriterien Alkoholmissbrauch („schädlicher Gebrauch“) und -abhängigkeit definiert sind [65].

Tabelle 1: Alkoholkonsummuster nach Menge des konsumierten Alkohols

	Alkoholmenge Frauen [g/Tag]	Alkoholmenge Männer [g/Tag]
Abstinenz	0	0
Risikoarmer Konsum	>0-20	>0-30
Riskanter Konsum	>20-40	>30-60
Gefährlicher Konsum	>40-80	>60-120
Hochkonsum	>80	>120

Etwa 4,3 Millionen Deutsche konsumieren Alkohol in Dosen mit gesundheitsschädigender Wirkung [77]. Etwa drei Prozent der 18- bis 59-Jährigen (ca. 1,6 Millionen Menschen) gelten laut Schätzungen der Bundesstudie von 2000 [64] und der Lübecker TACOS-Studie [85] als

alkoholabhängig. Weitere 2,4 Millionen betreiben einen „schädlichen Gebrauch“ (Alkoholmissbrauch).

Folgen des übermäßigen Alkoholkonsums sind zum einen die direkten Schädigungen des Organismus durch Krankheiten wie Leberzirrhose, Pankreatitis und bösartige Neubildungen, zum anderen aber auch indirekte Schädigungen wie beispielsweise im Rahmen von Unfällen, die unter Alkoholeinfluss verursacht werden. Nach Schätzungen des Bundesministeriums für Gesundheit sterben jährlich etwa 42.000 Menschen an den direkten und indirekten Folgen des Alkoholkonsums [16]. Aus volkswirtschaftlicher Sicht verursacht die Behandlung alkoholbezogener Krankheiten geschätzte 20 Milliarden Euro Kosten pro Jahr [8]. Dies entspricht etwa 1,1 % des Bruttonationalproduktes.

1.2 Relevanz des Alkoholkonsums im medizinischen Alltag

Die Anzahl Alkohol konsumierender Patienten wird im Klinikalltag häufig unterschätzt. Jeder fünfte ins Krankenhaus eingewiesene Patient ist alkoholabhängig [87]. Dabei ist die Prävalenz alkoholkranker Patienten in operativen Disziplinen höher als in neurologisch-psychiatrischen Einrichtungen [87]. Sie beträgt zwischen 20 % und 50 % [77, 141]. Bei der Hälfte der Traumatpatienten auf Intensivstationen kann anamnestisch ein Alkoholabusus eruiert werden [40]. Laut Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind etwa 11 % bis 18 % der behandelten Fälle in Notaufnahmen auf den Genuss von Alkohol zurückzuführen [146].

Übermäßiger Alkoholkonsum führt zu einer Vielzahl von organischen Veränderungen. Neben Erkrankungen wie Leberzirrhose und Pankreatitis sind auch das Auftreten maligner Neoplasien, beispielsweise im Bereich der oberen Luftwege, des Verdauungstraktes und der Leber von Bedeutung [105]. Akuter und chronischer Alkoholkonsum beeinflusst alle wichtigen Organsysteme darunter das Herz-Kreislauf- und das Nervensystem, die Leber und das Immunsystem [13, 113]. Vor allem im postoperativen Verlauf zeigt sich dadurch bei alkoholkranken Patienten eine um das Zwei- bis Fünffache erhöhte Morbidität gegenüber Nicht-Alkoholkranken [119, 120, 122, 135, 137]. Im Vordergrund stehen Infektionen, kardiale Komplikationen, Blutungen und die Entwicklung eines Alkoholentzugssyndroms [113, 120, 122, 124, 135]. Die erhöhte Komplikationsrate bei alkoholkranken Patienten verlängert die intensivmedizinische Liegedauer im Median um acht bis neun Tage [122, 123]. Damit verbunden sind gesteigerte Gesundheitskosten.

Das Auftreten von Infektionen hat während des intensivmedizinischen Aufenthaltes besondere Bedeutung. Nach operativem Eingriff ist das Infektionsrisiko alkoholkranker Patienten um das Zwei- bis Vierfache im Vergleich zu Nicht-Alkoholkranken [120, 122, 123] erhöht. Neben Wund- und Harnwegsinfektionen [54, 74, 107, 120, 135] muss insbesondere der Entwicklung einer Pneumonie und Sepsis auf Intensivstationen Beachtung geschenkt werden [123]. Die nosokomiale Pneumonie stellt die häufigste intensivmedizinische Komplikation [25, 54, 74] dar.

Von Heymann et al. [141] zeigten bei alkoholkranken Patienten, die nach einem Trauma intensivstationär behandelt wurden, ein vermehrtes Auftreten von Pneumonie, Multiorganversagen und Sepsis. Spies et al. [121] konnten eine erhöhte Inzidenz von Pneumonie und Sepsis bei alkoholkranken Patienten nach elektivem Eingriff nachweisen. Dabei begünstigte ein präoperativer Alkoholkonsum das Auftreten perioperativer Komplikationen und erhöhte das Sterberisiko. Jensen et al. [54] zeigten, dass die Mortalität von alkoholkranken Patienten im Vergleich zu ebenfalls kritisch Erkrankten ohne regelmäßigen Alkoholkonsum etwa doppelt so hoch war. Während 50 % der alkoholkranken Patienten im Verlauf der intensivmedizinischen Behandlung verstarben, waren es 26 % der ebenfalls kritisch erkrankten Nicht-Alkoholkranken. Auch Spies et al. [123] konnten eine erhöhte Mortalitätsrate alkoholkranker Patienten nach Tumorsektion im Bereich der oberen Atemwege nachweisen. Im Gegensatz zu einer Mortalität von 7 % bei Alkoholkranken, verstarb kein Patient in der Gruppe der Nicht-Alkoholkranken. Nicht zuletzt die erhöhte Mortalität verdeutlicht, dass Alkoholranke in der Medizin Hochrisikopatienten darstellen, die es zu erkennen gilt und denen besondere Aufmerksamkeit im peri- und postoperativen Verlauf geschenkt werden muss [119, 123].

1.3 Immunsystem

Übermäßiger Alkoholkonsum führt zu einer Reihe von Organ- und Systemveränderungen. Das Immunsystem ist dabei besonders betroffen. Die veränderten immunologischen Funktionen äußern sich unter anderem durch eine erhöhte Infektanfälligkeit und Wundkomplikationsrate alkoholkranker Patienten im postoperativen Verlauf [74, 107, 120, 122, 123]. Während Mechanismen der angeborenen Immunität in diesem Zusammenhang bereits gut verstanden sind, ist die Rolle von T-Lymphozyten als Vertreter der erworbenen Immunität und deren Beeinflussung durch Alkohol wenig untersucht.

1.3.1 Angeborene und erworbene Immunität

Das Immunsystem schützt das Individuum vor verschiedenen Pathogenen wie Bakterien, Viren, Pilzen oder Parasiten. Es wird eine angeborene (unspezifische) von einer adaptiven (spezifischen) Immunität unterschieden, die erst durch ihr Zusammenspiel die komplexe Immunantwort des Körpers ermöglichen [81]. Zu den angeborenen Abwehrmechanismen gehören Epithelien, das Komplementsystem, unspezifische Mediatoren wie Interleukine und Interferone und im zellulären Sektor Granulozyten, das Monozyten-Makrophagensystem, Dendritische Zellen (DC) sowie die natürlichen Killerzellen (NK) [52].

Im Falle einer Entzündung wird durch die Mechanismen der angeborenen Immunität bereits ein Großteil der eingedrungenen Erreger vernichtet. Gleichzeitig wird durch Sekretion inflammatorischer Mediatoren und Zytokine, durch Opsonierung und Phagozytose des Pathogens sowie durch Antigenpräsentation auf Histokompatibilitätskomplexen („major histocompatibility complex“, MHC II) der Weg für die spezifische Immunantwort geöffnet [52].

Zum adaptiven Immunsystem gehören T- und B-Lymphozyten. Diese Zelltypen können hochspezifisch auf ein Antigen reagieren und klonal expandieren, so dass eine effektive Immunantwort und die Ausbildung einer Gedächtnisreaktion möglich sind. Ob dabei eher humorale oder zelluläre Abwehrmechanismen zum Tragen kommen, ist abhängig von einem komplexen, spezifischen Zytokinmilieu.

1.3.2 CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten

T-Lymphozyten als Vertreter der adaptiven Immunität werden nach spezifischer Reifung und Selektion in die Zirkulation entlassen [52, 103]. Naive T-Zellen zirkulieren zwischen dem Blut und den lymphatischen Geweben. Sie wandern in sekundär lymphatische Organe wie Milz, Lymphknoten und mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe (MALT) nach Verlassen der Gefäße im Bereich der hochendothelialen Venole (HEV) ein. Die Milz, das größte lymphatische Organ, besteht unter anderem aus der weißen Pulpa, in deren periarteriolärer Lymphozytenscheide (PALS) T-Lymphozyten lokalisiert sind.

Bei Entzündungen werden die bakteriellen Antigene nach Prozessierung auf Antigen präsentierenden Zellen (AgPC) dargeboten. Die AgPC zirkulieren im Blutkreislauf und kommen in der Milz mit T-Zellen in Kontakt, die einen für das Antigen spezifischen T-Zellrezeptor (TCR) besitzen. Es schließt sich ein umfangreicher Aktivierungsprozess an, der je nach wirkendem Zytokinmuster und Form der Antigenpräsentation zur Differenzierung in die verschiedenen Effektorzellen führt. Am Ende dieser Vorgänge stehen die Vernichtung des einge-

drungenen Pathogens sowie die Ausbildung einer Gedächtnisreaktion, die bei Zweitkontakt mit dem Antigen eine schnellere und effektivere Immunantwort zur Folge hat.

T-Lymphozyten werden anhand der Expression von CD4 und CD8 auf der Zelloberfläche unterschieden. CD4 positive ($CD4^+$) T-Zellen, auch T-Helferzellen (T_H) genannt, erkennen exogene Antigene über MHC II. Man unterscheidet T_{H1} - und T_{H2} -Effektorzellen. T_{H1} -Effektor-T-Lymphozyten entstehen durch die Interaktion mit DC und die Zytokine Interleukin-12 (IL-12), IL-23 und IL-27. Sie sezernieren unter anderem IL-2, Interferon-gamma ($IFN-\gamma$) und Tumornekrosefaktor-alpha ($TNF-\alpha$) als sogenanntes proinflammatorisches Zytokinmuster und führen über die Makrophagenaktivierung zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen. T_{H1} -Zellen sind außerdem für die Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (Typ IV) und über die Stimulation von zytotoxischen CD8 positiven ($CD8^+$) T-Zellen für die Immunantwort bei Virusinfektion unentbehrlich.

T_{H2} -Effektor-T-Lymphozyten entstehen nach Antigenpräsentation in Gegenwart von IL-4. Sie induzieren durch die Freisetzung von IL-4 und IL-5 die Differenzierung und die Antikörperproduktion von B-Zellen und sezernieren neben diesen beiden Interleukinen weitere wie beispielsweise IL-10. Beide T_H -Zellpopulationen sind durch ihre unterschiedlich sezernierten Zytokinmuster in der Lage sich gegenseitig zu inhibieren. So behindert $IFN-\gamma$ die Aktivierung von T_{H2} -Zellen, während IL-10 die Makrophagenaktivierung und damit die T_{H1} -Antwort supprimiert [103].

$CD8^+$ T-Lymphozyten, auch zytotoxische Zellen (T_c) genannt, werden ebenfalls wie $CD4^+$ T-Zellen in T_{c1} - und T_{c2} -Effektorzellen unterteilt. T_c -Zellen sezernieren unter anderem $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und $TNF-\beta$. Sie erkennen intrazellulär prozessierte Antigene über MHC I und induzieren apoptotische Vorgänge in pathogenbefallenden Zellen. Dies geschieht über unterschiedliche Mechanismen, die schließlich zum Zelltod der infizierten Zelle führen.

Durch ihre vielseitigen Aufgaben nehmen $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten eine Schlüsselrolle bei der Immunantwort auf eingedrungene Pathogene ein. Obwohl eine veränderte Funktion dieser Zellen den Organismus nachhaltig beeinträchtigt, gibt es bisher nur wenige Arbeitsgruppen, die die Beeinflussung von Zytokin produzierenden T-Lymphozyten im Rahmen einer Ethanolbehandlung untersucht haben.

1.3.3 TNF- α und IFN- γ - zwei essentielle Zytokine der Immunabwehr

Interferone und Tumornekrosefaktoren gehören neben Interleukinen, Wachstumsfaktoren und Chemokinen zu den Zytokinen. Zytokine sind Proteine, die die Zellinteraktion und weit reichende zelluläre Funktionen wie Aktivierung, Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose über spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche vermitteln. Ihre Expression erfolgt in verschiedenen Zelltypen. Die Menge der sezernierten Zytokine und das Zytokinprofil geben Aufschluss über die Kompetenz und Regulationsfähigkeit des Immunsystems [52].

TNF- α ist eines der wichtigsten proinflammatorischen Zytokine, das erstmals 1975 von Carswall et al. isoliert wurde [18]. TNF- α wird von Makrophagen, T- und B-Zellen, NK-Zellen [140] und DC [6] gebildet und ist bei der antibakteriellen Immunabwehr beispielsweise im Rahmen von Pneumonien von großer Bedeutung. Die Neutralisierung von TNF- α zeigt, dass die Immunantwort auf Pathogene in Abwesenheit von TNF- α erheblich gestört ist. Durch seine Präsenz wird das bakterielle Wachstum vermindert und die Überlebenszeit von Versuchstieren nach Induktion einer Pneumonie verlängert [41, 88, 90, 127].

TNF- α ist ein Akut-Phase-Protein, das im Falle einer Infektion sowohl Komponenten der angeborenen als auch der adaptiven Immunität beeinflusst. TNF- α ist bei Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* für eine optimale Koordination der Differenzierung spezifischer T-Zellen zur Sekretion der T_H1-Zytokine und der Entwicklung von Granulomen notwendig, in denen aktivierte Makrophagen das bakterielle Wachstum hemmen [35]. Bei adäquater Ausschüttung übernimmt TNF- α durch Aktivierung von Zytokinkaskaden, Rekrutierung von Makrophagen und Neutrophilen, Steigerung der Expression von Adhäsionsmolekülen sowie Induktion von Fieber eine Schlüsselrolle in der Immunabwehr [45]. Im Gegensatz dazu begünstigen hohe systemische TNF- α Spiegel die Entstehung eines septischen Schocks [33, 52, 86] mit Blutdruckabfall, Endothelschäden, Förderung von Mikrothrombosen sowie Multiorganversagen und korrelieren mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko [108].

Die Gruppe der Interferone wurde 1957 von Isaacs und Lindenmann entdeckt [51]. Ihre Einteilung erfolgt in Typ I- (IFN- α , IFN- β) und Typ II-Interferone (IFN- γ). Während man anfänglich davon ausging, dass nur CD4⁺ T_H1-Lymphozyten, CD8⁺ T-Lymphozyten und NK-Zellen IFN- γ produzieren, zeigen neuere Untersuchungen, dass ebenfalls B-Zellen und AgPC in die IFN- γ Produktion einbezogen sind [115]. Dabei scheint die IFN- γ Sekretion durch NK-Zellen und AgPC eine wichtige Rolle während der frühen Immunantwort bei Infektion zu

spielen, wobei T-Lymphozyten die Hauptquelle der IFN- γ Produktion in der adaptiven Immunantwort darstellen.

IFN- γ ist ein vielseitiges Zytokin, das entscheidende Aufgaben in der angeborenen und adaptiven Immunität übernimmt. Es stimuliert die Antigenpräsentation durch verstärkte Expression von MHC I und II auf der Zelloberfläche von Makrophagen und AgPC, fördert die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und erhöht die mikrobizide Funktion der Makrophagen durch verstärkte Bildung von freien Sauerstoffradikalen.

Im Rahmen der adaptiven Immunität spielt IFN- γ eine Rolle bei der zellvermittelten Reaktion vom Spättyp. Es unterstützt die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen (T_H0) in T_H1-Zellen bei gleichzeitiger Inhibierung der T_H2-Zellaktivierung und stimuliert Tc-Lymphozyten. IFN- γ steuert somit die Immunantwort in Richtung einer inflammatorischen T-Zellantwort und unterstützt so beispielsweise die Bekämpfung eingedrungener bakterieller Pathogene.

1.3.4 Veränderung der immunologischen Parameter unter Alkoholeinfluss

Regelmäßiger Alkoholkonsum führt bereits nach einer Woche [128] zu einer Reihe von Veränderungen im Bereich der angeborenen und adaptiven Immunität. Als Folge der gestörten Immunabwehr zeigt sich ein erhöhtes Infektionsrisiko alkoholkranker Patienten vor allem im postoperativen Verlauf [120, 122, 123].

Alkohol kann auf unterschiedliche Weise die Immunantwort auf eindringende Erreger beeinträchtigen [129]. So hemmt der Konsum unter anderem die zellvermittelte Immunantwort sowie die Migrations- und Phagozytosefähigkeit von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen [3, 22, 129]. Weiterhin ist die Expression von MHC II-Molekülen auf der Zelloberfläche von AgPC vermindert. Dadurch wird die Fähigkeit zur Antigenpräsentation [46, 76, 130] und Prozessierung supprimiert und so die zellvermittelte Immunantwort gestört. Unabhängig davon werden Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit von T- und B-Lymphozyten gesenkt sowie die Zellzahlen in Blut, Thymus, Milz und Lymphknoten unter Einfluss von Alkohol vermindert [1, 56, 131]. In mehreren Studien konnte eine Alkohol induzierte Apoptose von CD4⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden [7, 50]. Im Gegensatz dazu wurde sowohl an Mäusen [24, 118] als auch bei chronisch Alkohol konsumierenden Menschen [23] eine T-Zellaktivierung nachgewiesen.

Neben der direkten Wirkung auf die Zellen beeinflusst Ethanol auch durch eine Veränderung der Zytokinproduktion die Zellfunktionen und immunologischen Abläufe. Bisher wurde der Einfluss von Ethanol auf die Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender T-Zellen zurückhal-

tend untersucht. Lanzke et al. [68] konnten zeigen, dass eine achttägige Ethanolbehandlung von Balb/c-Mäusen keinen Einfluss auf TNF- α und IFN- γ produzierende T-Lymphozyten der Milz hatte. Bei induzierter Klebsiellenpneumonie zeigte sich eine gesteigerte Anzahl TNF- α produzierender T-Zellen bei gleichzeitiger Verminderung des IFN- γ produzierenden Zellanteils. In einer weiteren Studie wurde Tieren eine orale Ethanol-diät verabreicht. Nach vier Wochen konnte eine verminderte Anzahl von IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden [106].

Auch im monozytären Bereich belegen zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien die Veränderungen in der Zytokinproduktion sowohl nach akuter als auch nach chronischer Alkoholgabe. In den einzelnen Studien zeigte sich, dass bei akuter einmaliger Einnahme von Alkohol unter anderem die Produktion von TNF- α in humanen mit Lipopolysaccharid (LPS) stimulierten Monozyten vermindert [95, 132] bzw. der IFN- γ Level in stimulierten Monozyten aus freiwilligen Probanden erniedrigt war.

Bei chronischem Alkoholkonsum werden immunologische Veränderungen mit und ohne Leberbeteiligung differenziert [37, 101, 120, 125]. Bei Patienten mit chronischem Alkoholkonsum ohne Lebererkrankung konnte ein Abfall von TNF- α in LPS-stimulierten Monozyten [37, 101, 151] beobachtet werden, während ein Leberschaden bei chronisch Alkohol konsumierenden Menschen mit erhöhten TNF- α , IFN- γ Level verbunden war [69]. Das veränderte Zytokinmuster bewirkte eine T_H1/T_H2-Imbalance zugunsten der T_H2-Antwort [70, 143, 155]. Spies et al. [125] konnten bereits präoperativ eine Verminderung der T_H1/T_H2 Ratio alkoholkranker Patienten im Vergleich zu Nicht-Alkoholkranken nachweisen. In diesem Zusammenhang waren erhöhte IgE-Serumspiegel [128] und die verminderte T_H1-vermittelten Reaktion vom Spättyp auf Hauttestantigene (DHT) [142, 143] zu erklären, die sich nach etwa achtwöchiger Abstinenz normalisierten [136].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der Konsum von Alkohol eine Vielzahl an immunologischen Veränderungen zur Folge hat. Die Abbildung 1 zeigt schematisch wie über verschiedene Wirkmechanismen sowohl die zelluläre als auch die humorale Immunität beeinflusst werden. Die Folge ist eine gestörte Immunabwehr auf eindringende Erreger.

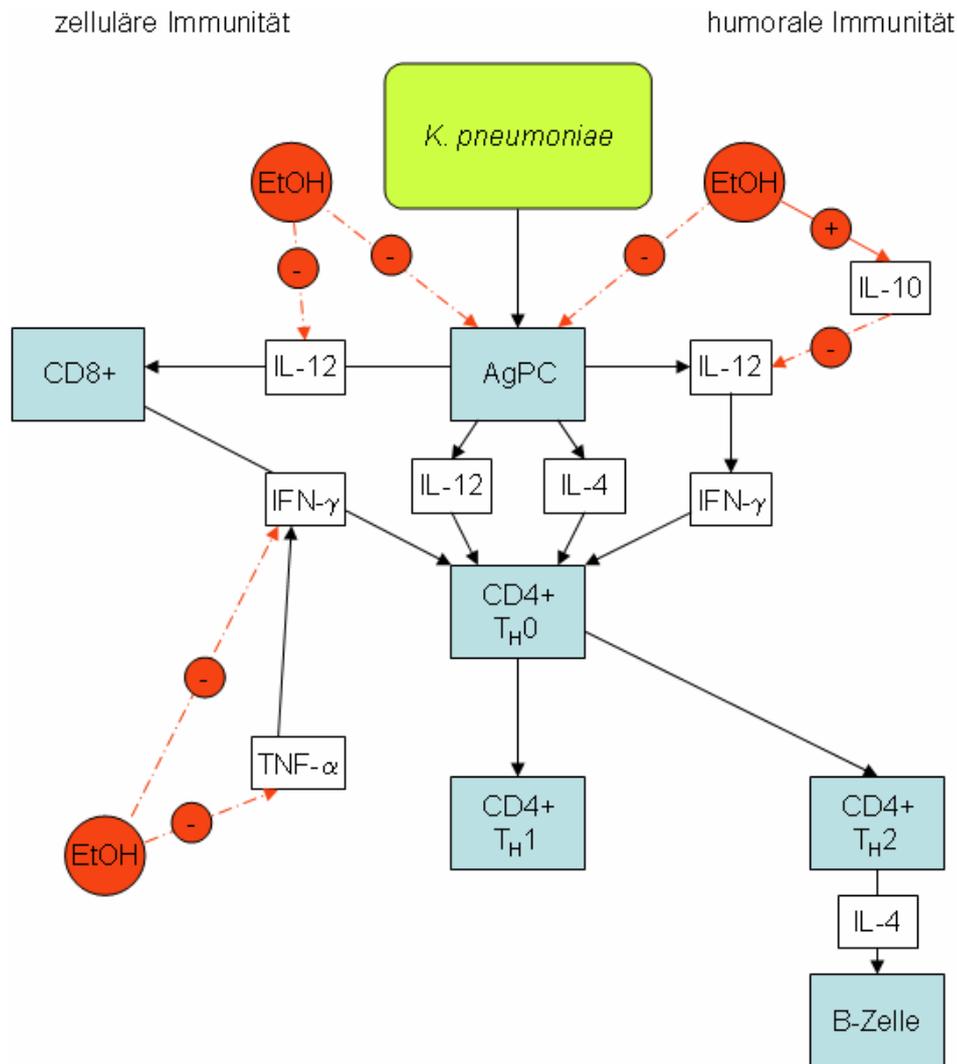


Abbildung 1: Abläufe der zellulären und humoralen Immunität (schematische Darstellung) bei Infektion mit *K. pneumoniae* und deren Beeinflussung durch Ethanolbehandlung. Abkürzung: EtOH, Ethanol; *K. pneumoniae*, Klebsiella pneumoniae; AgPC, Antigenpräsentierende Zelle; IL, Interleukin; IFN- γ , Interferon-gamma; TNF- α , Tumornekrosefaktor-alpha; T_H, T-Helferzellen

1.3.5 Immunologische Veränderungen durch operativen Stress

Operativer Stress beeinflusst die immunologischen Abläufe über zahlreiche Mechanismen und führt zu einer zusätzlichen Immunsuppression [84]. Es ist bekannt, dass ein operativer Eingriff unter anderem durch eine Erniedrigung von IFN- γ und der T_{H1}/T_{H2}-Ratio die zelluläre Immunantwort supprimiert [9, 28, 83, 100]. Einer starken Immunantwort nach einem operativen Eingriff kann eine Immunparalyse der zellvermittelten Immunität folgen [5]. Durch die beschränkte Fähigkeit der Makrophagen, auf einen LPS-Stimulus mit einer adäquaten TNF- α Produktion [99] zu reagieren, wird nachfolgend die Aktivierung von T-Lymphozyten beeinträchtigt.

Tierexperimentelle Untersuchungen bestätigen die genannten immunologischen Veränderungen unter operativem Stress. Ooshiro et al. [102] zeigten an murinen Lymphozyten der Milz nach einer Laparotomie eine erniedrigte Produktion von IFN- γ . An Ratten konnte gezeigt werden, dass ein operativer Eingriff die T-Zellantwort beeinträchtigte [2] und initial erhöhte TNF- α Level [71] zur Folge hatte.

Zu alkoholbedingten immunologischen Veränderungen in Zusammenhang mit operativen Eingriffen gibt es bisher nur wenige publizierte klinische Studien. Sander et al. [112] fanden unmittelbar nach einer Operation eine verminderte IL-6/IL-10-Ratio, die mit einer erhöhten Infektionsrate während der sich anschließenden intensivmedizinischen Behandlung verbunden war. IL-6 ist ein proinflammatorisches Zytokin, das eine große Bedeutung bei der Akute-Phase-Reaktion beispielsweise durch Induktion von Akute-Phase-Proteinen wie dem C-reaktiven Protein (CrP) hat. Aufgrund einer Halbwertszeit im Minutenbereich und schneller Aktivierung während eines Entzündungsvorganges wird IL-6 in der Intensivmedizin zur raschen Beurteilung akuter septischer Krankheitsbilder genutzt. IL-10 gehört zur Gruppe der antiinflammatorischen Zytokine. Es supprimiert unter anderem die Expression von proinflammatorischen T_H1-Zytokinen wie IFN- γ und TNF- α und hemmt die Antigenpräsentation durch Verminderung von MHC II-Molekülen. Die Entzündungsreaktion wird eingedämmt.

Die T_H1/T_H2-Ratio unterscheidet sich postoperativ nicht zwischen alkoholkranken und nicht-alkoholkranken Patienten, während präoperativ die Ratio bei den alkoholkranken Patienten reduziert ist [125]. Die dazu gehörige reduzierte Immunreaktion vom verzögerten Typ auf Hauttestantigene (DTH) wird bei chronisch alkoholkranken Patienten prä- und eine weitere Reduktion postoperativ beschrieben [120, 136].

Operativer Stress und plötzliche Alkoholabstinenz verstärken die immunsuppressive Wirkung von Ethanol zusätzlich [112, 125]. Die tief greifenden Veränderungen des Immunsystems stehen in engem Zusammenhang mit der gesteigerten Infektionsrate alkoholkranker Patienten und deren erhöhter Morbidität und Mortalität im postoperativen Verlauf [120, 135, 137]. Während die immunmodulatorische Wirkung der Einzelfaktoren Ethanol und operativer Stress gut verstanden ist, gibt es bisher kein geeignetes Modell, welches die beiden Faktoren zusammen betrachtet und deren Einfluss auf die Immunantwort anhand einer postoperativ induzierten Infektion darstellt.

1.4 *Klebsiella pneumoniae*

Die Pneumonie hat als häufigste postoperative Komplikation alkoholkranker Patienten besondere Bedeutung während der intensivmedizinischen Behandlungsphase [123, 125]. *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) zählt zu den häufigsten Erregern nosokomialer Infektionen [53, 75]. Neben Harnwegs- und Wundinfektionen stellt vor allem die Klebsiellenpneumonie (Friedländerpneumonie) [53] ein Krankheitsbild von großer klinischer Relevanz dar. Die Verläufe von pulmonalen Infektionen gehen durch einen multilobulären Befall, eine rasche Progredienz und die Ausbildung von Abszessen häufig mit Komplikationen einher [17]. Eine Behandlung von Infektionen mit gramnegativem Keimspektrum gestaltet sich aufgrund immer häufiger auftretender Resistenzen schwierig [11, 73].

Klebsiellen spielen insbesondere bei alkoholkranken Patienten eine wichtige Rolle. Die Besiedlung des Nasopharynx mit pathogenen Keimen nach Alkoholabusus [39, 144] und die gesteigerte Aspirationsgefahr führen zu einer erhöhten Rate an Pneumonien [36, 98, 129] in dieser Patientengruppe. Damit verbunden ist ein erhöhtes Risiko, an einer Klebsiellenpneumonie zu versterben [117].

1.4.1 Die Bedeutung der bakteriellen Virulenzfaktoren

Die Gattung der *Klebsiella* gehört zur Familie der Enterobacteriaceae. Man unterscheidet 77 Serotypen. Die wichtigsten Vertreter sind *K. pneumoniae* und *K. oxytoca*. Bei *K. pneumoniae* handelt es sich um ein gramnegatives, aerobes, unbewegliches Stäbchen, das von einer Polysaccharidkapsel umgeben wird. Diese enthält die Virulenzfaktoren Kapselpolysaccharid (KPS), auch K-Antigen genannt [104] und LPS, das O-Antigen. KPS verhindert die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten, während LPS ein wichtiger Mediator des septischen Schocks und verantwortlich für die Resistenz gegen Serumbakterizide ist. Zusammen bilden beide einen Komplex, welcher für die bei einer Pneumonie auftretenden typischen Nekrosen verantwortlich zu sein scheint.

1.4.2 Immunantwort auf Klebsiellenpneumonie bei Alkoholikern

Die Klebsiellenpneumonie ist durch einen rasch progredienten und häufig komplizierten Verlauf charakterisiert. Im Falle einer pulmonalen Infektion kommt es normalerweise zur Rekrutierung von Neutrophilen und Makrophagen in das betroffene Gewebe, die die antigenen Strukturen der Erreger erkennen, binden, internalisieren und zu Peptiden (Antigenen) abbauen. AgPC präsentieren das Antigen über MHC. T-Lymphozyten mit einem für das Antigen spezifischen TCR erkennen und binden das Peptid. Über die Bindung TCR, antigenes Peptid

und MHC laufen im Zusammenspiel mit CD80- und CD28-Molekülen komplexe Aktivierungsvorgänge innerhalb der T-Lymphozyten ab, die schließlich zur Tötung der eingedrungenen Pathogene und zur Ausbildung einer Gedächtnisfunktion führen [103].

Bisher belegen zahlreiche Studien, dass T-Lymphozyten [26, 31] und die Zytokine TNF- α und IFN- γ [63, 66, 67, 91, 127, 148] von entscheidender Bedeutung bei der Abwehr von *K. pneumoniae* sind. Ihre Präsenz beeinflusst nachhaltig das Überleben des Organismus. Die Abwehr des eingedrungenen Pathogens ist von einer intakten T_H1-vermittelten Immunität und einem komplexen Zusammenspiel der Zytokine abhängig [42, 91]. TNF- α , dessen Ausschüttung insbesondere durch LPS stimuliert wird, übernimmt eine Schlüsselrolle in der pulmonalen Abwehr und T-Zellaktivierung [29]. Moore et al. [88] zeigten, dass nach Anwendung eines neutralisierenden TNF- α Antikörpers die Letalität der Versuchstiere erhöht und die Eliminierung der Bakterien in der Lunge vermindert war. Eine Behandlung mit einem TNF- α Agonisten hatte die entgegengesetzte Wirkung [66]. Auch für IFN- γ konnte bei lokalisierten, pulmonalen gramnegativen Entzündungen eine besondere Bedeutung für das Überleben der Tiere aufgezeigt werden [91].

Zahlreiche Studien zeigen, dass die komplexen pulmonalen Abwehrmechanismen durch den Einfluss von Ethanol und/oder operativem Stress gestört werden [44, 112]. So scheint die durch operative Interventionen induzierte Immunsuppression eine wichtige Ursache für nosokomial erworbene Pneumonien zu sein. TNF- α und IFN- γ Spiegel von Mäusen nach postoperativ induzierter Pneumonie sind niedriger als bei Tieren, die nicht operiert wurden. Damit verbunden sind eine verminderte Eliminierung der Bakterien sowie eine um das mehr als vierfache erhöhte Mortalität [75].

Bezüglich der Ethanol induzierten Immunsuppression zeigt sich, dass eine akute einmalige intraperitoneale oder intravenöse Alkoholgabe sowohl die durch LPS als auch die durch *K. pneumoniae* stimulierte TNF- α Produktion in Serum, Lunge und Alveolarmakrophagen senkt [96]. Der Abfall von TNF- α verhindert die Leukozytenrekrutierung und Endothelzellaktivierung [111]. Die zusätzliche Verminderung von IL-12 in Milz und Lunge stört die Ausbildung von T_H1-Zellen und vermindert so die zelluläre Immunantwort. Chronische Alkoholgaben von zwei Wochen führen zu unterschiedlichen Ergebnissen in der Zytokinproduktion. Während TNF- α in Lungen von Mäusen nach Klebsiellenpneumonie erhöht und IFN- γ erniedrigt ist [155], zeigen andere Studien eine deutliche Inhibierung der LPS induzierten TNF- α und IFN- γ Sekretion in der bronchoalveolären Lavage nach zweiwöchiger Alkoholdiät [143].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass T-Lymphozyten und ihre Zytokine TNF- α und IFN- γ eine wichtige Rolle bei der Abwehr pulmonaler Infektionen spielen. Alkohol und operativer Stress hemmen durch ihren immunsupprimierenden Effekt die körpereigenen Abwehrmechanismen und erhöhen so die Mortalität der mit *K. pneumoniae* infizierten Tiere. Die pulmonalen Abwehrmechanismen der angeborenen Immunität sowie die Aufgabe der Zytokine im Zusammenhang mit einer bakteriellen Pneumonie sind bereits gut verstanden [92, 126]. Unklar bleibt allerdings, wie sich eine postoperative Pneumonie bei präoperativ bestehendem Alkoholkonsum auf die Anzahl der Zytokin produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten auswirkt.

1.5 Zielsetzung

Der Konsum von Alkohol führt zu einer Reihe von Organveränderungen. Im Besonderen ist dabei das Immunsystem betroffen, dessen veränderte Funktion sich durch eine erhöhte Infektanfälligkeit alkoholkranker Patienten bemerkbar macht. Von zentraler Bedeutung in der intensivmedizinischen Behandlung ist die Entwicklung einer Pneumonie, der häufigsten postoperativen Komplikation alkoholkranker Patienten. Erwiesen ist, dass regelmäßiger Alkoholkonsum einen immunsuppressiven Effekt auf den Organismus hat. Ebenso beeinflusst ein operativer Eingriff die immunologischen Funktionen.

Beide Faktoren führen unabhängig voneinander zu einer verminderten Immunantwort im Rahmen einer Pneumonie. Diese Immunsuppression führt auf Ebene der T-Zellen und deren Zytokinproduktion zu einer verminderten Eliminierung von bakteriellen Pathogenen und zu einer erhöhten Mortalität der Versuchstiere. Während die Einzelmechanismen bereits gut verstanden sind, bleibt bisher unklar, wie eine Kombination aus präoperativem Alkoholkonsum und operativem Stress die Anzahl Zytokin produzierender T-Zellen und somit die T-Zellantwort auf eine postoperativ induzierte Klebsiellenpneumonie beeinflusst.

Ziel dieser Arbeit ist deshalb die Untersuchung der Anzahl der Zytokin produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ Milz-T-Lymphozyten im Rahmen einer Pneumonie bei präoperativ bestehendem Ethanolkonsum. Zu diesem Zweck soll ein operatives murines Infektionsmodell etabliert werden, um die nachfolgende Hypothese zu stützen und die sich daraus ergebenden Fragen zu klären.

Folgende Hypothese wird formuliert:

Präoperativer Alkoholkonsum verändert die Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und fördert so die Entstehung und Unterhaltung einer Klebsiellenpneumonie.

Daraus ergeben sich folgende Fragestellungen:

- (1) Supprimiert Ethanol in einem operativen Versuchsaufbau die Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender T-Zellen?
- (2) Führt die Induktion einer Klebsiellenpneumonie bei zuvor bestehendem Ethanolkonsum zu einer Herunterregulation der TNF- α und IFN- γ produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten?
- (3) Sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung mit entsprechenden histologischen Veränderungen von Lunge und Leber vergesellschaftet?
- (4) Beeinflussen eine präoperative Ethanolgabe und die Induktion einer Pneumonie durch *K. pneumoniae* das klinische Erscheinungsbild der Balb/c-Mäuse?

2. Materialien

2.1 Versuchstiere

Die Versuche wurden mit acht bis zwölf Wochen alten, weiblichen, spezifisch pathogenfreien (SPF) Balb/c-Mäusen, die von der Zuchtstation Harlan Winkelmann, Deutschland bezogen wurden, durchgeführt. Nach der Anlieferung wurden die Balb/c-Mäuse eine Woche zur Adaptation in Gruppen zu maximal je neun Tieren auf Makrolon-Käfige verteilt und tierschutzgerecht in einem klimatisierten Raum (Temperatur 27 °C ((25±2) °C), relative Luftfeuchte 52 % ((55±5) %), mit kontinuierlichem Licht-/ Dunkel-Wechsel (zwölfstündlich), mit Standardtrockenfutter und Wasser ad libitum in SPF-Käfigen gehalten. Balb/c-Mausmodelle wurden sowohl für alkoholtoxische [114] als auch für operative [58] und Infektionsversuche [79] verwendet.

2.1.1 Gruppeneinteilung

Für die einzelnen Versuche wurden die Tiere in unterschiedliche Gruppen (Tabelle 2) eingeteilt, um die Auswirkungen der Alkoholapplikation und postoperativer Infektionen auf das Immunsystem beurteilen zu können. Die Gruppenbezeichnung wurde frei nach alphabetischer Reihenfolge gewählt. Innerhalb der laufenden Versuchsreihe wurden die Tiere zur besseren Unterscheidung farblich auf dem Rücken markiert.

Tabelle 2: Übersicht über die Versuchsgruppeneinteilung

Gruppe	Behandlung	
A	NaCl i.p. behandelte Kontrolltiere	+ OP
B	Ethanol i.p. behandelte Tiere	+ OP
C	NaCl i.p.+ <i>K. pneumoniae</i> intranasal behandelte Tiere	+ OP
D	Ethanol i.p. + <i>K. pneumoniae</i> intranasal behandelte Tiere	+ OP

NaCl, Kochsalz; EtOH, Ethanol; i.p., intraperitoneal; OP, Operation

2.1.2 Ausschlusskriterien

Tiere, die bereits vor oder während der Behandlung verstarben, älter als zwölf Wochen waren bzw. schon am ersten Behandlungstag ein Körpergewicht größer als 23 g aufwiesen, wurden nicht in die statistische Auswertung mit einbezogen.

2.2 Pufferherstellung

PBA	500 ml PBS, + 2,5 g Bovines Serum Albumin, + 0,5 g NaN ₃
1 %-RPMI-Medium	485 ml RPMI-Medium + 5 ml FCS + 5 ml Penicillin/Streptomycin + 5 ml Hepes
10 %-RPMI-Medium	440 ml RPMI-Medium + 50 ml FCS + 5 ml Penicillin/Streptomycin + 500 µl Mercaptoethanol + 5 ml Hepes
Hämolysepuffer	0,01 M KHCO ₃ + 0,155 M NH ₄ Cl + 0,1 mM EDTA
Wash Perm	10 ml Saponin (5 %) + 90 ml PBS

2.3 Antikörper

Purified anti-mouse CD16/CD32, 0.5 mg/ml	PD Pharmingen, Heidelberg, D
PE labeled anti-mouse CD4, 0,2 mg/ml	PD Pharmingen, Heidelberg, D
PerCP-Cy5.5 anti-mouse CD8a, 0.2 mg/ml	PD Pharmingen, Heidelberg, D
FITC labeled anti-mouse IFN- γ , 0.5 mg/ml	PD Pharmingen, Heidelberg, D
APC-rat anti-mouse TNF- α , 0.2 mg/ml	PD Pharmingen, Heidelberg, D
FITC Mouse Anti Rat IgG ₁	PD Pharmingen, Heidelberg, D
APC Mouse Anti Rat IgG ₁	PD Pharmingen, Heidelberg, D

2.4 Verbrauchsmaterialien

Sterile Einwegmaterialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße (0,5; 1,5 und 2 ml), Kryoröhrchen, Schraubdeckel-Röhrchen (1,5; 15 und 50 ml), FACS-Röhrchen (5 ml) wurden von Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg, D), Sarstedt (Nümbrecht, D) und Eppendorf (Hamburg, D) bezogen. Spezielle Verbrauchsmaterialien sind nachfolgend aufgeführt:

Cell Strainer (70µm), Falcon	Becton Dickonson, Heidelberg, D
NeoLab Beutel, 10×15 cm, steril	NeoLab, Heidelberg, D
Ethicon Vicryl 5.0	Johnsson&Johnsson

2.5 Reagenzien

Alle handelsüblichen Substanzen wurden von Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D), SIGMA-ALDRICH (Steinheim, D) und Falcon/Becton Dickinson (Heidelberg, D) bezogen. Spezielle Reagenzien sind nachfolgend aufgeführt.

Schaedler Anaerobe Broth	Oxoid, Wesel, D
Columbia-Agarbasis	Oxoid, Wesel, D
5 % Schafsblut	Oxoid, Wesel, D
Fetales Calf Serum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, D
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, D
Trypan Blue Solution, 0,4 %, 20 ml	Sigma, Schnelldorf, D
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma Aldrich, Steinheim, D
Ionomycin 5 mg	Sigma, Schnelldorf, D
Brefeldin A haltiger Golgi Plug 5 mg	BD Biosciences, Mountain View, USA
Saponin	Sigma, Schnelldorf, D
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin, D
PBS	Biochrom, Berlin, D
Panthenol-Augensalbe	Jenapharm GmbH, Jena, D
Isofluran	Baxter, Hamburg, D
Ethanol, 95 %	Braun, Melsungen, D
NaCl 0,9 %	Braun, Melsungen, D
Ketanest [®] (Ketamin), 10mg/ml	Parke-Davis GmbH, Karlsruhe, D
Dormicum [®] (Midazolam), 5mg/ml	Roche Pharma AG, Grenzach, D
Na-Heparin Hämatokritkapillare	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Vicryl 5.0	Ethicon GmbH, Norderstedt, D
Liquimin N 25000 [®]	Roche Pharma AG, Grenzach, D

2.6 Geräte

Neben Laborgeräten wie Tischzentrifuge, Zentrifugen, Vortexer und Sicherheitswerkbank wurden nachfolgende Geräte verwendet:

Narkosegerät Sulla 800V, Vapor 19.3	Dräger Medical, Lübeck, D
FACSCalibur	BDBiosciences, Heidelberg, D
Neubauer Tiefe 0,100mm, 0,0025 mm ²	Brand, Wertheim, D
Mikroskop ID 03	Zeiss, Jena, D
BagMixer [®] MiniMix	NeoLab, Heidelberg, D

2.7 Software

CellQuest	BD Biosciences, Mountain View, USA
SigmaPlot Version 10.0	Systat Software Inc, San Jose, USA
SPSS Version 14.0	SPSS Inc., Chicago, USA

3. Methoden

Die Tierversuche im Rahmen dieser experimentellen Doktorarbeit wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung (Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM)) unter damaliger Leitung von PD Dr. Ch. Große-Siestrup, Charité Universitätsmedizin-Berlin, Campus Virchow Klinikum, Augustenburger Platz 1, 13353 Berlin durchgeführt. Die Zustimmung der örtlichen Tierschutzkommission lag vor. Alle Protokolle wurden nach den Richtlinien zum Schutz und zur Verwendung von Versuchstieren durch das Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit, Berlin (LAGetSi) geprüft und im Rahmen des Tierversuchsantrag Nr. G0271/00 am 09. April 2001 bewilligt.

3.1 Gruppenspezifischer Versuchsablauf

Die Tabelle 3 gibt einen Überblick über die Versuchsgruppen und den gruppenspezifischen Versuchsablauf. Es wurden vier Gruppen, A, B, C und D, unterschieden. Tieren der Gruppen A und C wurden mit einer achttägigen intraperitonealen (i.p.) Injektion von Kochsalz (NaCl) behandelt. Die Applikation von Ethanol (EtOH) erfolgte bei Tieren der Gruppe B und D über acht Tage. Die Tiere erhielten jeden Tag um acht Uhr morgens 3 g EtOH/kg Körpergewicht [68, 78] (3,8 µl/g Körpergewicht) i.p.

Tabelle 3: Gruppenspezifischer Versuchsablauf

G.	1. Tag bis 7. Tag	8. Tag	9. Tag	10. Tag	11. Tag
A	NaCl i.p., Gewicht am 1. Tag	Gewicht, NaCl i.p., Laparotomie	Gewicht	Gewicht	Erhebung des klin. Scores, Gewicht, Tötung, Präparation
B	EtOH i.p., Gewicht am 1. Tag	Gewicht, EtOH i.p., Laparotomie	Gewicht	Gewicht	Erhebung des klin. Scores, Gewicht, Tötung, Präparation
C	NaCl i.p., Gewicht am 1. Tag	Gewicht, NaCl i.p., Laparotomie	Gewicht, <i>K. pneumoniae</i> i.n.	Gewicht	Erhebung des klin. Scores, Gewicht, Tötung, Präparation
D	EtOH i.p., Gewicht am 1. Tag	Gewicht, EtOH i.p., Laparotomie	Gewicht, <i>K. pneumoniae</i> i.n.	Gewicht	Erhebung des klin. Scores, Gewicht, Tötung, Präparation

G., Gruppe; i.p., intraperitoneal; i.n., intranasal; NaCl, Kochsalz; EtOH, Ethanol; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*, klin.; klinisch

Am achten Tag wurde eine mediane Laparotomie mit Mobilisation des linken Leberlappens durchgeführt. Die Tiere wurden zwei weitere Tage postoperativ beobachtet und am dritten postoperativen Tag getötet. In der C- und D-Gruppe erfolgte zusätzlich zu den NaCl- bzw. EtOH-Injektionen i.p. am zweiten postoperativen Tag die intranasale (i.n.) Applikation von *K. pneumoniae*.

3.2 OP-Modell

Am achten Tag des Versuchsablaufes wurde eine mediane Laparotomie mit anschließender Mobilisation des linken Leberlappens durchgeführt. Die Einleitung der Narkose erfolgte für 10 bis 15 Sekunden bei 0,8 l/min Sauerstoff und 3 bis 4 % Isofluran. Die Maus wurde hierzu mit dem Kopf in eine abgeschnittene 20 ml Spritze, die als Beatmungsmaske diente, gehalten. Nachdem eine ausreichende Narkosetiefe anhand des Zwischenzehenreflexes sichergestellt wurde, erfolgte die Lagerung und Fixierung der Maus auf einem 38 °C warmen Gelkissen in Rückenlage, um eine Hypothermie zu vermeiden.

Während der OP wurde die Narkose mit 0,4 l/min eines 1,5 bis 2 %igen Isofluran-Sauerstoffgemisches aufrechterhalten [133]. Zur OP-Vorbereitung wurde das Tier im Operationsfeld rasiert, desinfiziert und steril abgedeckt [14]. Anschließend wurde die mediane Laparotomie unter einer keimarmen Arbeitsbank durchgeführt. Nach Mobilisation des linken Leberlappens wurde das Peritoneum in fortlaufender Maschen- und die Haut in Einzelknopfnahmt mittels eines 5.0 Vicrylfadens verschlossen und die Wunde mit einem Sprühverband versorgt. Nach Abschluss des Eingriffs wurde die Narkose beendet und das Tier bis zu seinem Erwachen beobachtet. Um einer metabolischen Entgleisung vorzubeugen, wurde eine 5 %ige Glukoselösung zum Trinken angeboten [58].

3.3 Erhebung des klinischen Scores

Der Zustand der Tiere wurde am dritten postoperativen Tag anhand eines Drei-Punkte-Scores bewertet (Tabelle 4). Dazu wurden folgende Parameter beurteilt:

1. Motorische Aktivität, Körperhaltung
2. Piloerektion
3. Sekretion aus Augen, Nase und After.

Veränderungen des Körpergewichtes wurden durch Bestimmung des Ausgangsgewichtes und tägliches Wiegen ab dem OP-Tag registriert und als Gewichts Differenz zwischen den einzelnen Versuchstagen angegeben.

Tabelle 4: Kriterien zur Erhebung des klinischen Scores

Parameter	Punkte		
	0	1	2
Piloerektion	glatt	ungepflegt	struppig
Haltung, Motorik	normal	verlangsamt, gekrümmt	abgesondert, hockend
Sekretion	normal	geschwollene Lider, mäßiger Ausfluss	starker Ausfluss, trübe Augen, Krusten

3.4 Tötung und Präparation der Versuchstiere

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Tötung und Präparation der Versuchstiere beschrieben. Des Weiteren wird auf die Vorbereitung der histologischen Untersuchung eingegangen.

3.4.1 Blutentnahme und Tötung

Am dritten postoperativen Tag wurden die Tiere mittels einer i.p. applizierten Dosis Ketamin (250 mg/kg) und Midazolam (10 mg/kg) sediert. Nach Einsetzen der Bewusstlosigkeit erfolgte die retrobulbäre Blutentnahme mit Hilfe Natrium-Heparin versetzter Hämatokritkapillaren durch Eröffnung des retrobulbären Venenplexus. Das Blut wurde mit Monovetten aufgefangen, die vorher mit 0,1 ml Liquemin versetzt worden waren. Nach der Blutentnahme erfolgte die Tötung durch eine i.p. applizierte Überdosis Ketamin und Midazolam. Zusätzlich wurde den Tieren nach Erlöschen der Reflexe das Genick gebrochen.

3.4.2 Präparation von Lungen und Milz

Nach der Tötung wurden die Tiere auf eine Korkplatte gespannt. Es folgte eine gründliche Desinfektion des Felles, bevor die Haut median von den Hinterbeinen bis zur Mandibula durchtrennt und vom Peritoneum abgelöst wurde. Anschließend wurde das Peritoneum bis zum Diaphragma eröffnet. Durch Eröffnung des Zwerchfells im Bereich der Pars cardiaca mit einer spitzen Schere kam es zum Druckausgleich und folglich zum Kollaps beider Lungen. Diese wurden vorsichtig entnommen und auf Eis bis zur Verarbeitung gelagert. Diaphragma, Sternum und Teile der Rippenbögen wurden entfernt und die Klavikel durchtrennt. Mittels einer atraumatischen Schere wurde die Milz freipräpariert und entnommen. Auf die gründliche Entfernung des Pankreasgewebes wurde geachtet. Bis zur weiteren Verarbeitung innerhalb der folgenden zwei Stunden wurde das Organ in 10 % FCS-RPMI-Medium (RPMI 1640

Medium, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin/Streptomycin, 25 μ M 2-Mercaptoethanol, 10mM HEPES-Puffer) aufbewahrt und auf Eis gelagert.

3.4.3 Histologische Untersuchung nach Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Für die histologische Untersuchung wurden nach Tötung der Mäuse Leber und Lunge entnommen und in Falcon-Röhrchen in 10 %iger Formalinlösung fixiert. Zur histologischen Beurteilung der beiden Organe wurde mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Dabei erschienen alle sauren und basophilen Strukturen durch Hämalaun blau (DNA-haltiger Zellkern), während acidophile, eosinophile und basische Strukturen (vor allem Zellplasmaproteine) durch Eosin rot angefärbt wurden.

Zur Vorbereitung der HE-Färbung wurde natives Gewebe in maximal 0,5 cm dicke Scheiben geschnitten und in einer Kunststoffkassette für 24 bis 48 Stunden in 10 %iger, gepufferter Formalinlösung fixiert. Die Paraffineinbettung erfolgte über Nacht in einem geschlossenen Entwässerungsgerät im Vakuum und bei Wärme über eine aufsteigende Alkoholreihe und mit Xylol als Intermedium.

Im Anschluss wurden 1 bis 3 μ m dicke Schnitte gefertigt, auf entfettete unbeschichtete Objektträger aufgezogen und für 10 bis 15 Minuten im Wärmeschrank bei 70 °C abgeschmolzen sowie fixiert. Durch Einstellen der Objektträger in Xylol und anschließender absteigender Alkoholreihe wurden die Schnitte rehydriert. Anschließend wurde eine Standard-HE-Färbung durchgeführt. Zuerst erfolgte die Kernfärbung in Hämatoxylin nach Mayer. Dazu wurden die rehydrierten Gewebeschnitte 5 Minuten in Hämatoxylinlösung getaucht und anschließend für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Danach erfolgte die Hintergrundfärbung für 5 Minuten in Eosinlösung und eine anschließende zehninminütige Spülung unter fließendem Leitungswasser. Zuletzt wurden die Schnitte durch die aufsteigende Alkoholreihe mit Xylol als Intermedium geführt und mittels eines kunstharzhaltigen Eindeckelmediums mit dem Deckglas verklebt.

3.5 Durchflusszytometrische Untersuchung

Die Durchflusszytometrie (engl. Fluorescence Activated Cell Scanning/Sorting, FACS) stellt eine Methode zur qualitativen und quantitativen Analyse von Zellen (single cell analysis) dar. Voraussetzung ist eine Antigen-Antikörper-Reaktion, bei der fluoreszenzmarkierte Antikörper an antigene Zellstrukturen wie Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine gebunden werden.

Zur Analyse wird die Probe über eine Stahlkapillare angesaugt und in eine laminar strömende Trägerflüssigkeit überführt. Es findet die so genannte hydrodynamische Fokussierung statt, bei der die Partikel durch den Hüllstrom stark beschleunigt werden und hintereinander den Analysator passieren. Der Analysator ist ein optisches System, welches aus einem oder mehreren Lasern, Linsen, Strahlteilern und optischen Filtern besteht. Zur Analyse wird ein Argonlaser verwendet, der Licht einer Wellenlänge von 488 nm generiert. Das monochromatische Licht des Lasers ändert bei Auftreffen auf die Zelle seine Richtung und ist in Vorwärtsstreu-licht, forward scatter (FSC), und Seitwärtsstreu-licht, side scatter (SSC), zu unterscheiden. Der FSC bildet die Zellgröße ab und wird entlang der Laserachse mittels Photodiode detektiert, während der SSC ein Maß für die Granularität (Membranstruktur und Beschaffenheit intrazellulärer Bestandteile) darstellt (Abbildung 2).

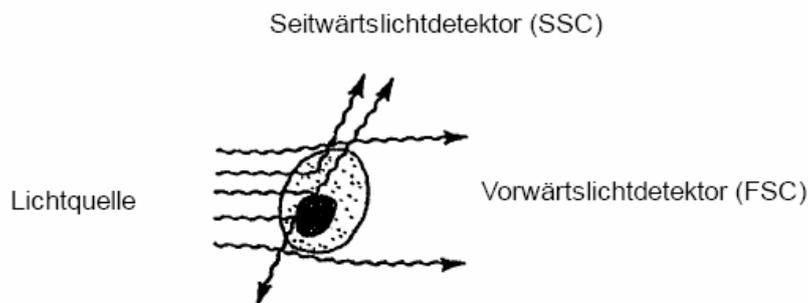


Abbildung 2: Merkmale der Lichtstreuung einer Zelle (BD BioSciences, 2001)

Einige Atome bzw. Moleküle haben die Eigenschaft, absorbierte Lichtenergie zur Anhebung von Elektronen auf ein höheres Energieniveau zu nutzen. Beim Rückfall der Elektronen in den Grundzustand kann diese Energie in Form von Wärme (strahlungslose Relaxation) oder zusätzlich als Photon wieder abgegeben werden. Die auftretende Lichtemission wird als Fluoreszenz bezeichnet. Die emittierte Photonenkonzentration, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge gebundener Antikörper pro Zelle.

Die verwendeten Farbstoffe sollten von der Wellenlänge des Argonlasers gut anregbar sein. Je weiter das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von diesem Wert entfernt ist, umso geringer wird auch die Fluoreszenzintensität des emittierten Lichtes sein. Eine gleichzeitige FACS-Messung mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen ist möglich, weil sich die eingesetzten Farbstoffe zwar bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische, Emissionsspektren verfügen (Tabelle 5).

Tabelle 5: Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren Absorption- und Emissionsmaxima

Fluorochrom	Abkürzung	Absorptionsmaxima [nm]	Emmissionsmaxima [nm]
Fluorescein Isothiocyanat	FITC	495	519
R-Phycoerythrin	R-PE	480, 565	578
Peridinin Chlorophyll Protein	PerCP	490	675
Allophycocyanin	APC	640	660

Die Messung erfolgte am FACS-Calibur der Firma Becton-Dickinson mit Hilfe der Analysesoftware CellQuest. Dieses Analysegerät war mit einem Argonlaser (488 nm), einer roten Laserdiode (633 nm) und vier Fluoreszenzkanälen (FL1-FL4) ausgestattet. Es ermöglichte die gleichzeitige Analyse von bis zu vier Farben. Es wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein Isothiocyanat (FITC), R-Phycoerythrin (PE), Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) eingesetzt. Die Aufbereitung der Proben und die Analyse erfolgte nach Protokollen des Institutes für Medizinische Immunologie [59] sowie des Deutschen Rheumaforschungszentrums [82].

Die Darstellung der Zellen als Dotplot im FCS/SSC-Streudiagramm (Abbildung 3 A) war Grundlage für das manuell gesetzte Lymphozytengate (R1), in dem ein Minimum von 150 000 Ereignissen gemessen wurde. Dabei werden die Lymphozyten entsprechend ihrer Streulichteigenschaften (Größe, Granularität) elektronisch "gegatet", d.h. auf der einen Seite werden Monozyten und Granulozyten ausgegrenzt, auf der anderen Seite Zelltrümmer und Thrombozyten. Entsprechend der Granularität und Größe werden die Lymphozyten an einer spezifischen Position im FCS/SSC-Streudiagramm detektiert, die durch das manuell gesetzte R1-Gate (Abbildung 3 A) gekennzeichnet wird.

In einem zweiten Schritt werden aus der Lymphozytenpopulation (R1) Fluoreszenz 1 gegen Fluoreszenz 2 mit entsprechenden Oberflächenantikörpern (CD8 PerCP-Markierung gegen CD4 PE-Markierung) detektiert. Die Dotplotgrafik der Abbildung 3 B zeigt die so gewonnene

Analyse der CD4⁺ (R2) und CD8⁺ (R3) T-Zellen aus diesem Lymphozytengate. R2 und R3 bezeichnen die manuell gesetzten Gates der CD4⁺ und CD8⁺ Zellpopulation.

In einem dritten Schritt werden aus der CD4⁺ und CD8⁺ Zellpopulation T-Zellen mit fluoreszierenden spezifischen intrazellulären Antikörpern (IFN- γ FITC, TNF- α APC) detektiert. Die später im Ergebnisteil dargestellten Dotplotgrafiken der TNF- α und IFN- γ produzierenden T-Zellen sind nach Analyse der Zellen der manuell gesetzten CD4⁺ (R2) und CD8⁺ (R3) Gates entstanden. Die Ergebnisse wurden an Isotypenkontrollen ausgerichtet und in [%] Zytokin produzierender CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen dargestellt.

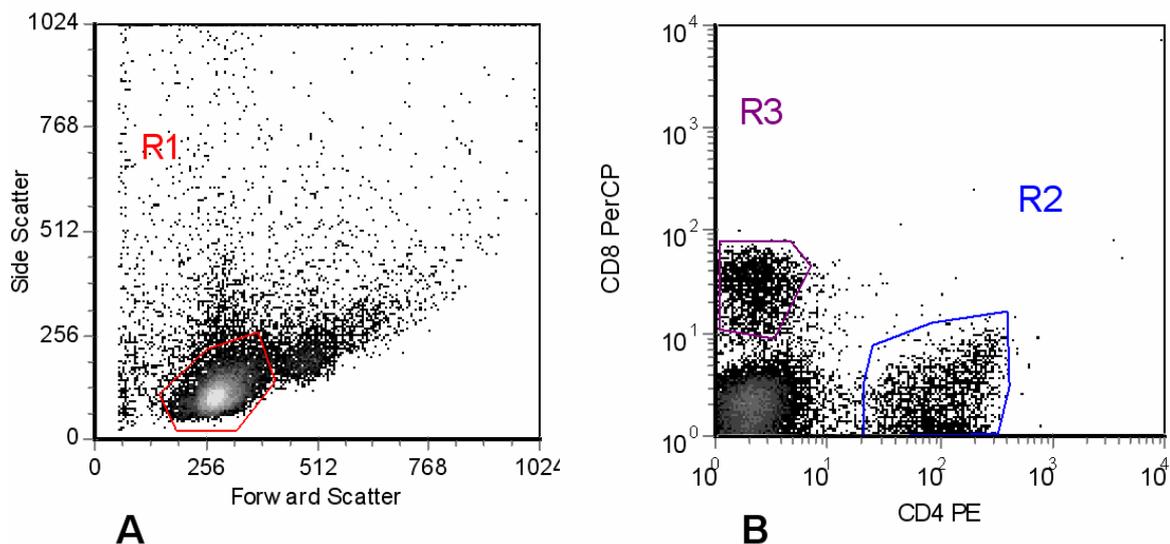


Abbildung 3: Darstellung der manuell gesetzten Gates als Dotplotgrafiken. A) Abbildung des Lymphozytengates (R1) im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht-Diagramm (FSC/SCC), aus dem die Detektion der T-Zellen mit ihrem fluoreszierenden Oberflächenmarker CD4-PE und CD8-PerCP erfolgte. B) Darstellung der CD4⁺ (R2) und CD8⁺ (R3) T-Zellpopulation als Dotplots, aus denen nach Gatesetzung die Analyse der spezifisch TNF- α und IFN- γ produzierenden T-Zellen erfolgte.

3.5.1 Herstellung einer Zellsuspension

Für die Herstellung von Einzelzellsuspensionen wurde die zuvor entnommene Milz homogenisiert. Nach diesem Schritt wurden die Zellen mit 10 % FCS-RPMI-Medium gespült und anschließend mit 25 ml 1 % FCS-RPMI-Medium (485 ml RPMI 1640 Medium, 5 ml FCS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 5 ml Heps) 7 Minuten bei 4 °C und 1300 U/min zentrifugiert. Nachdem die Erythrozyten durch Zugabe von 3 ml Hämolysepuffer (0,01 M KHCO₃; 0,155 M NH₄Cl; 0,1 mM EDTA) entfernt und der Lysepuffer mit 3 ml 10 % FCS-RPMI-Medium abgestoppt wurde, erfolgte die Suspension der Zellen in 10 % FCS-RPMI-Medium [82]. Anschließend wurden die Proben erneut zentrifugiert und in 10 ml 1 % FCS-RPMI-Medium resuspendiert. Zur Zellzahlbestimmung und darauf folgender Zellzahleinstellung

wurden 20 µl der Zellsuspension entnommen und 80 µl Trypanblaulösung hinzugefügt. Die Auszählung der Zellen erfolgte in einer Neubauer Zählkammer. Nach Zentrifugation in insgesamt 25 ml 1 % FCS-Medium bei 1300 U/min und 4 °C für 7 Minuten wurde die Zellzahl mit 10 % FCS-Medium auf $2,5 \times 10^6$ Lymphozyten pro ml eingestellt.

3.5.2 Stimulation der T-Lymphozyten

Die Zellen wurden mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) (5 µg/ml mit $2,5 \times 10^6$ Zellen) und Ionomycin (1 µg/ml) stimuliert, um eine nachweisbare Zytokinproduktion zu erreichen. Für jede Maus wurden in zwei Röhrchen (Antikörper- und Isotypenkontrolle) jeweils 1 ml der Zellsuspension und 52 µl eines Gemisches aus 2,5 µl PMA, 2 µl Ionomycin und 100 µl 10 % FCS-RPMI-Medium pipettiert. Danach erfolgte eine zweistündige Bebrütung im Brutschrank. Um die Exozytose zu hemmen und intrazellulär die Zytokine anzureichern, wurde Brefeldin A-haltiger Golgi Plug-Puffer (Endkonzentration 5 µg/ml) zugefügt und ein weiteres Mal für zwei Stunden inkubiert [38]. Die Proben wurden danach mit FACS-Puffer PBA (PBS + 0,5 % BSA + 0,1 % NaN₃) gewaschen und zweimal bei 1500 U/min und 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert.

3.5.3 Färbung der Oberflächenantigene CD4⁺ und CD8⁺

Für die Färbung der Oberflächenantigene wurden die Proben mit 3 ml PBA gewaschen, zentrifugiert (5 Minuten, 1500 U/min, 4 °C) und der Überstand dekantiert. Durch Zugabe von Anti-CD16/CD32-Antikörpern (je 4 µl auf 46 µl PBA) wurden unspezifische Bindungen verhindert. Nach neunminütiger Inkubation auf Eis wurden die Antikörper für die Oberflächenfärbung (1 µl Anti-CD4-PE + 1 µl Anti-CD8a-PerCP-Cy5.5 + 30 µl PBA) hinzugegeben und die Proben erneut 9 Minuten auf Eis belassen. Nach Zentrifugation der Zellen in 3 ml PBS (1500 U/min, 4 °C, 5 Minuten) erfolgte die Resuspension in 1 ml PBS. Anschließend wurde 1 ml Paraformaldehyd (4 %) zugegeben, um die Oberflächenfärbung zu fixieren. Die Proben wurden 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine zweimalige Zentrifugation der Zellen mit 3 ml PBA bei 1500 U/min und 4 °C für jeweils 5 Minuten.

3.5.4 Färbung der intrazellulären Antigene TNF α und IFN γ

Nach erneutem Waschen mit 3 ml PBA wurden den Proben für die intrazelluläre Färbung 3 ml saponinhaltigen Permeabilisierungspuffers (Wash/Perm) (10 % Saponin (5 %) + 90 % PBS) hinzugegeben und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Dieser Vorgang führte zur Permeabilisierung der Zellwand. Die Proben wurden zentrifugiert, dekantiert und abgetupft. Für den

intrazellulären Fc-Blockierungsschritt wurden 4 µl Anti-CD16/CD32 auf 46 µl Wash/Perm pro Probe hinzugegeben. Nach einer neunminütigen Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe der intrazellulären Antikörper TNF- α und IFN- γ (je 1 µl/ml Anti-IFN- γ -FITC + je 1 µl/ml Anti-TNF- α -APC + 30 µl/ml Wash/Perm). Für die Isotypenkontrolle wurden in ein zweites FACS-Röhrchen je 1 µl/ml Anti-Rat IgG1-FITC + je 1 µl/ml Anti-Rat IgG1-APC auf 30 µl/ml Wash/Perm gegeben. Die Proben wurden für 10 Minuten auf Eis belassen und mit Wash/Perm und anschließend mit PBA jeweils 5 Minuten bei 1500 U/min und 4 °C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurden die Zellen zur Vorbereitung der sich anschließenden durchflusszytometrischen Messung in 300 µl PBA resuspendiert.

3.6 Postoperative Infektion mit *Klebsiella pneumoniae*

Zur Infektion der Tiere wurde *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* (Schroeter) Trevisan Serotype 2 von ATCC 43816 verwendet [15, 21, 49, 89, 117, 155]. Diese wurden freundlicherweise von Prof. Dr. med. O. Liesenfeld, Institut für Infektionsmedizin, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 27, 12203 Berlin zur Verfügung gestellt. Die Aufbewahrung der Klebsiellen sowie alle im Rahmen der Vor- und Nachbereitung der postoperativen Infektion notwendigen Arbeitsschritte erfolgten in der Arbeitsgemeinschaft Prof. Dr. Appel, Robert-Koch-Institut, Nordufer 20, 13353 Berlin.

3.6.1 Tierpassage

Die Tierpassage wurde mit freundlicher Unterstützung von Frau Rüschenhoff, Institut für Infektionsmedizin, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, Hindenburgdamm 27, 12203 Berlin durchgeführt. Sie diente dem Zweck, die Virulenz des Stammes *K. pneumoniae* ATCC 43816 zu steigern.

Dazu wurde 1 ml einer bei -80 °C eingefrorenen NaCl-Klebsiellen-Lösung auf Columbia-Blutagar ausplattiert (Plattenpassage). Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde eine Kolonie *K. pneumoniae* in 5 ml NaCl gegeben und die Suspension bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Zuvor erfolgte die Keimzahlbestimmung. Dazu wurden 100 µl der NaCl-Klebsiellen-Lösung auf Columbia-Blutagar ausgestrichen und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Auszählung am nächsten Tag ergab eine Keimkonzentration von $6,1 \times 10^4$ /ml. Für die Tierpassage erfolgte die Verdünnung der Suspension mit NaCl auf eine Keimkonzentration von 5×10^3 /ml. 200 µl dieser Suspension wurden einer neun Wochen alten, männlichen Balb/c-Maus in die Schwanzvene injiziert. Nach etwa 24 Stunden wurde der Maus die Milz entnommen und in 5 ml PBS homogenisiert. Das Milzhomogenat wurde zur Gewinnung einer viru-

lenteren Kolonie bildende Einheit (KBE) von *K. pneumoniae* für die Herstellung einer Nährbouillon ausplattiert und inkubiert (24 Stunden, 37 °C).

3.6.2 Herstellen einer Nährbouillon

Zur Herstellung der Nährbouillon wurden 2 KBE *K. pneumoniae*, gewonnen durch Tierpassage aus dem Milzhomogenat des infizierten Tieres, zusammen mit 10 ml Schaedler in einem Falconröhrchen (15 ml) gemischt und 24 Stunden auf einem Schüttler (37 °C, 200/min) bewegt. Um einen Keimzahlverlust durch Einfrieren zu verhindern, wurden 9 ml Schaedler-Klebsiellen-Lösung mit 1 ml Glycerin versetzt. Danach wurde je 1 ml der Lösung in Nunc-Kryoröhrchen aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt. Zur Keimzahlbestimmung wurde mit 0,5 ml Nährbouillon und 4,5 ml NaCl eine 1:10 Verdünnungsreihe erstellt. Anschließend wurden je 100 µl der einzelnen Verdünnungsschritte auf Columbia-Blutagar + 4 % Dextrose ausplattiert und 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Keimzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe des gewogenen arithmetischen Mittels

$$KBE - Zahl \times 10 \times 1.0ml \times Verdünnung = Keimzahl/1.0ml$$

und ergab eine Keimkonzentration von $1,9 \times 10^9$ KBE/ml in der Nährbouillon. Nach mehrmaliger Bestimmung der Keimkonzentration wurde für die Infektion der Tiere von einer Gesamtkonzentration von 10^9 KBE/ml in den eingefrorenen Kryoröhrchen ausgegangen.

3.6.3 Infektion der Versuchstiere

Am neunten Tag des Versuches erfolgte die Infektion der Mäuse durch Aspiration von *K. pneumoniae*. Dazu wurden 4,5 ml einer sterilen NaCl-Lösung (0,5 %) und 0,5 ml der im Nunc-Kryoröhrchen eingefrorenen Schaedler-Klebsiellen-Lösung in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und eine 1:10 Verdünnungsreihe erstellt. Für eine ausreichende Durchmischung wurde vor jedem Verdünnungsschritt ein Vortexer für 30 Sekunden angewendet. Zur Infektion der Tiere wurde das Zentrifugenröhrchen mit einer Konzentration von 10^5 KBE/ml verwendet. Um eine Infektion mit 10^4 KBE/50 µl sicherzustellen, erfolgte parallel zur Infektion eine Keimzahlbestimmung. Dazu wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe aus dem Infektionsröhrchen erstellt, je 100 µl auf Columbia-Blutagar + 4 % Dextrose ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C wurde die Koloniezahl abgelesen, die Keimzahl nach der unter 1.6.2 beschriebenen Formel berechnet.

Die Infektion der Tiere erfolgte innerhalb der nächsten Stunde. Dazu wurden die Tiere mit einem Gemisch aus Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Midazolam (4 mg/kg Körper-

gewicht) narkotisiert und mit Hilfe einer Pipette jeweils 10^4 KBE [117] *K. pneumoniae* (ATCC 43816) in einem Gesamtvolumen von 50 μ l NaCl intranasal [47] appliziert. Bis zu ihrem Erwachen wurden die Tiere beobachtet.

3.6.4 Ausplattierung der Lungen für Keimzahlbestimmung

Die Keimzahl wurde anhand eines quantitativen Vergleichs von KBE aus den isolierten infizierten Lungen [31, 149] bestimmt. Dazu wurden die Lungen keimfrei entnommen und auf Eis in Falconröhrchen transportiert. Die Aufarbeitung erfolgte innerhalb der folgenden zwei Stunden. Die Lunge wurde in einem Stomacherbeutel gewogen, mit einer sterilen Schere zerkleinert und eine 1:10 Verdünnung (w/v) mit PBS hergestellt. Anschließend wurden die Klebsiellen im Homogenisator bei normaler Geschwindigkeit durch die Bewegung der Pedale aus dem Lungengewebe entfernt. Jeweils 0,9 ml PBS wurden in acht Safe-lock-Eppendorf Tubes pipettiert und die erste Tube mit 0,1 ml der Klebsiellen-PBS-Lösung aus dem Stomacherbeutel versetzt. Danach erfolgte die Erstellung einer 1:10 Verdünnungsreihe. Je 100 μ l wurden auf Columbia-Blutagar + 4 % Dextrose ausplattiert, 24 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Berechnung der KBE pro Lunge erfolgte nach der unter 3.6.2 genannten Formel.

3.6.5 Ausplattierung eines Blutropfens für Bakteriämienachweis

Den Tieren wurde nach der Tötung 1 ml Blut retrobulbär entnommen. Die Blutprobe wurde auf Eis transportiert und sofort weiter verarbeitet. Für den Nachweis einer Bakteriämie wurden jeweils 10 μ l und 100 μ l Blut nativ auf zwei Columbia-Blutagar + 4 % Dextrose ausplattiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C [31] erfolgte die Auszählung der Kolonien.

3.7 Bestimmung der Alkoholkonzentration im Blut

Die Bestimmung des Blut-Alkoholspiegels erfolgte freundlicherweise durch Prof. Dr. med. F. Pragst, Institut für Rechtsmedizin, Abteilung für Toxikologische Chemie, Charité-Campus Mitte, Hannoversche Str. 6, 10115 Berlin.

Der Alkoholgehalt im Blut der Mäuse wurde gaschromatographisch mit Hilfe der Headspace-Methode bestimmt. Je 100 μ l Blut und 500 μ l innerer Standard (0.2 mg/g tert-Butanollösung) wurden in Headspace-Probeflaschen im Autosampler installiert und gaschromatographisch nach Gebrauchsanweisung des Herstellers untersucht. Von jeder Probe wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt.

3.8 Statistische Analyse

Als Kennziffern für die beschreibende Statistik wurden für metrische Daten der Median sowie die Standardabweichung angegeben. Bei signifikantem Unterschied im globalen Test wurde mit dem Mann-Whitney-U-Test für unverbundene Stichproben bei nicht normalverteilten Variablen geprüft.

Der Mann-Whitney-Test ("Mann-Whitney-U-Test" oder kurz "U-Test") ist ein parameterfreier statistischer Test. Er dient zur Überprüfung der Signifikanz der Übereinstimmung zweier Verteilungen A und B (beispielsweise eine unbeeinflusste und eine beeinflusste). Dabei sind A und B jeweils durch eine Anzahl von Werten (n_1 und n_2) gekennzeichnet. Jeder Wert der Stichprobe A wird mit jedem Wert der Stichprobe B verglichen.

Im Zusammenhang mit der Fragestellung wurden die in Tabelle 6 dargestellten Gruppen auf signifikante Unterschiede geprüft. Ein $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

Tabelle 6: Statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede

Gruppenbezeichnung	A	B	C	D
A	-	+	+	-
B		-	-	+
C			-	+
D				-

Gruppenbezeichnung: A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen. +; Prüfung auf signifikante Unterschiede

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm SPSS, Version 14.0 durchgeführt. Die grafischen Darstellungen wurden mittels Sigmaplot Version 10.0 erzeugt.

4. Ergebnisse

4.1 Durchflusszytometrische Ergebnisse

Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung TNF- α und IFN- γ produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten der Milz dargestellt. Insgesamt wurde bei 15 Tieren der A-Gruppe, 14 Tieren der B-Gruppe, 9 Tieren der C-Gruppe und 12 Tieren der D-Gruppe die Anzahl der Zytokin produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten untersucht.

Für die Ermittlung dieser Daten wurde aus dem im FSC/SCC-Streudiagramm (Abbildung 4 A) manuell gesetzten Lymphozytengate (R1) die Population CD4⁺ (R2) und CD8⁺ (R3) T-Zellen (Abbildung 4 B) bestimmt. Aus den gesetzten Gates der CD4⁺ und CD8⁺ Zellpopulationen erfolgte durchflusszytometrisch die Ermittlung der spezifisch TNF- α und IFN- γ produzierenden T-Zellen, die unter den entsprechenden Einzelüberschriften im nachfolgenden Teil in Form von Dotplots dargestellt werden.

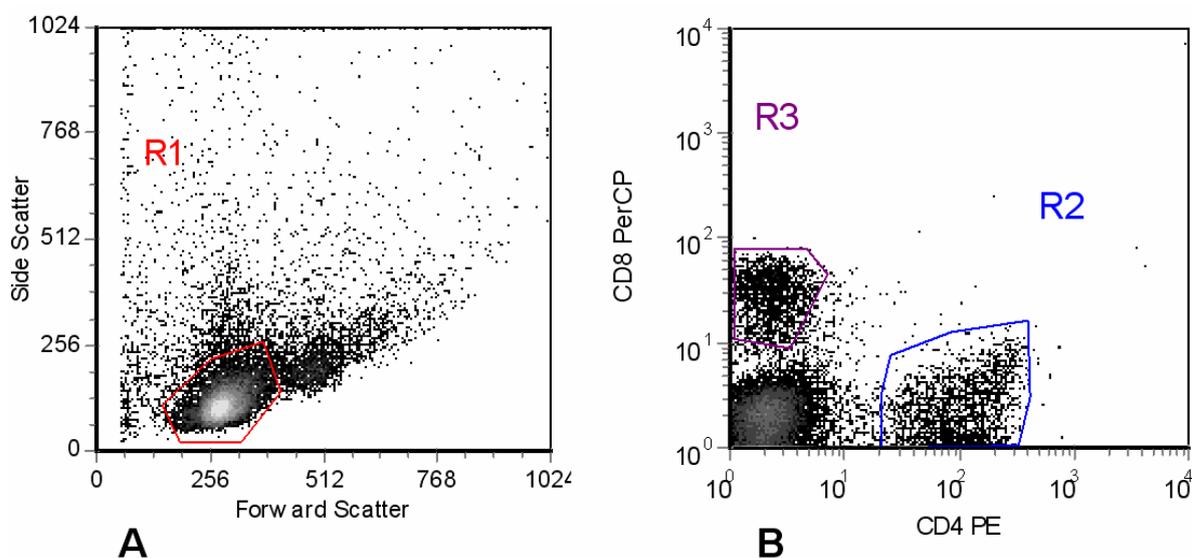


Abbildung 4: Manuell gesetzte Gates in Dotplotgrafiken (exemplarische Darstellung). A) Abbildung des Lymphozytengates (R1) im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht-Diagramm (FSC/SCC), aus dem die Detektion der T-Zellen mit ihrem fluoreszierenden Oberflächenmarker CD4-PE und CD8-PerCP erfolgte. B) Darstellung der CD4⁺ (R2) und CD8⁺ (R3) T-Zellpopulation als Dotplots, aus denen nach Gatesetzung die Analyse der spezifisch TNF- α und IFN- γ produzierenden T-Zellen erfolgte.

Die so ermittelten Prozentzahlen der TNF- α und IFN- γ produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten der unterschiedlichen Versuchsgruppen ergaben in ihrer Gesamtheit die im Folgenden dargestellten Boxplot-Grafiken.

4.1.1 Messung der TNF- α produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten

Die Anzahl der TNF- α produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch aus dem R2-Gate (Abbildung 4 B) nach Stimulation mit PMA und Ionomycin ermittelt. Die Abbildung 5 zeigt exemplarisch die somit gewonnenen Dotplots TNF- α produzierender CD4⁺ T-Zellen jeweils eines Versuchstieres aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Die ermittelten Prozentzahlen TNF- α produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten sind in ihrer Gesamtheit in der Boxplot-Grafik (Abbildung 6) zusammengefasst.

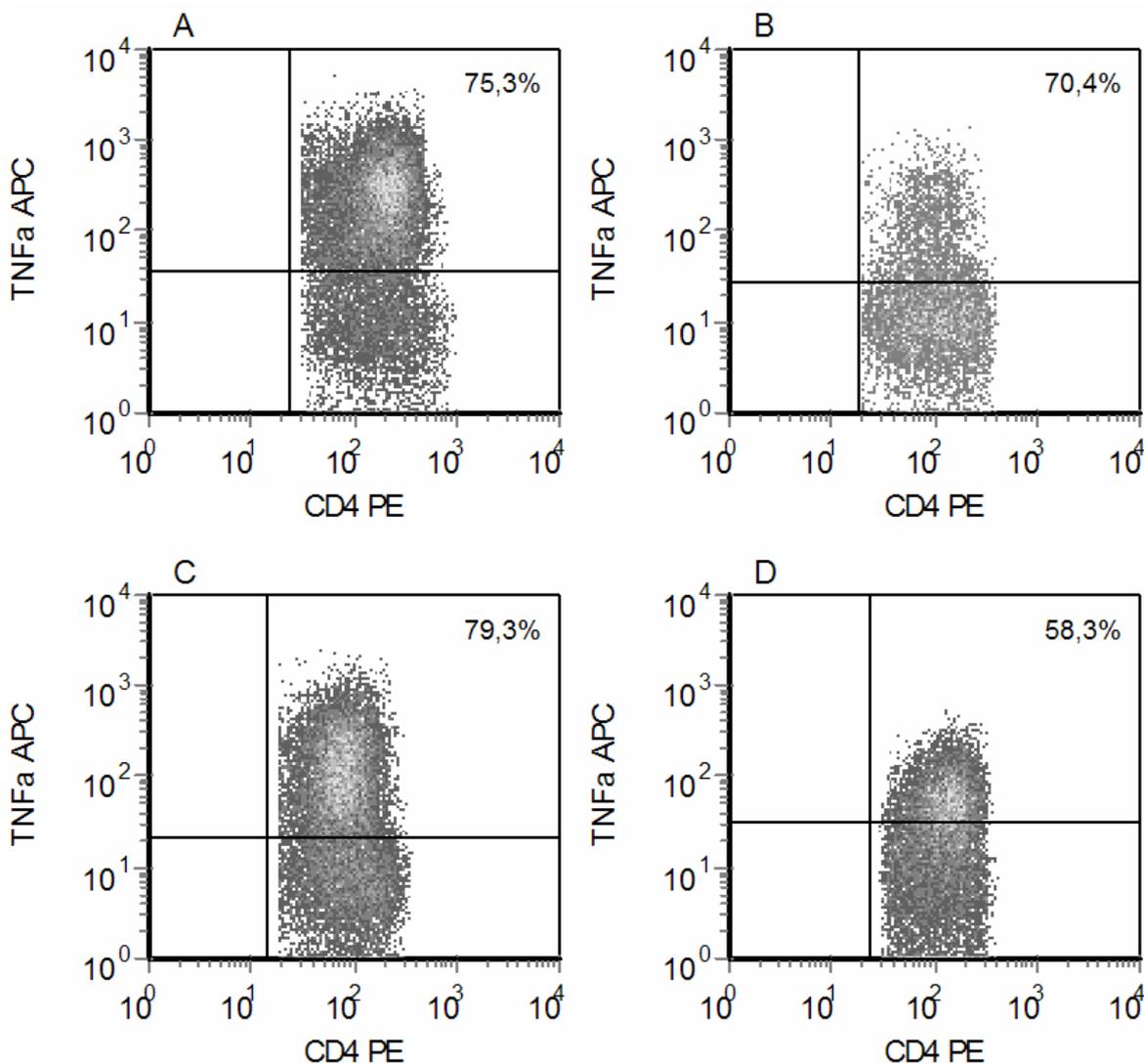


Abbildung 5: Durchflusszytometrische Messung TNF- α produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten (exemplarische Darstellung in Form von Dotplots). Während die Anzahl der TNF- α produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A, B und C annähernd gleich war, konnte eine Verminderung bei Balb/c-Mäusen der D-Gruppe aufgezeigt werden. TNF- α , Tumornekrosefaktor-alpha; APC, Allophycocyanin; PE, Phycoerythrin. Gruppenbezeichnung: A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

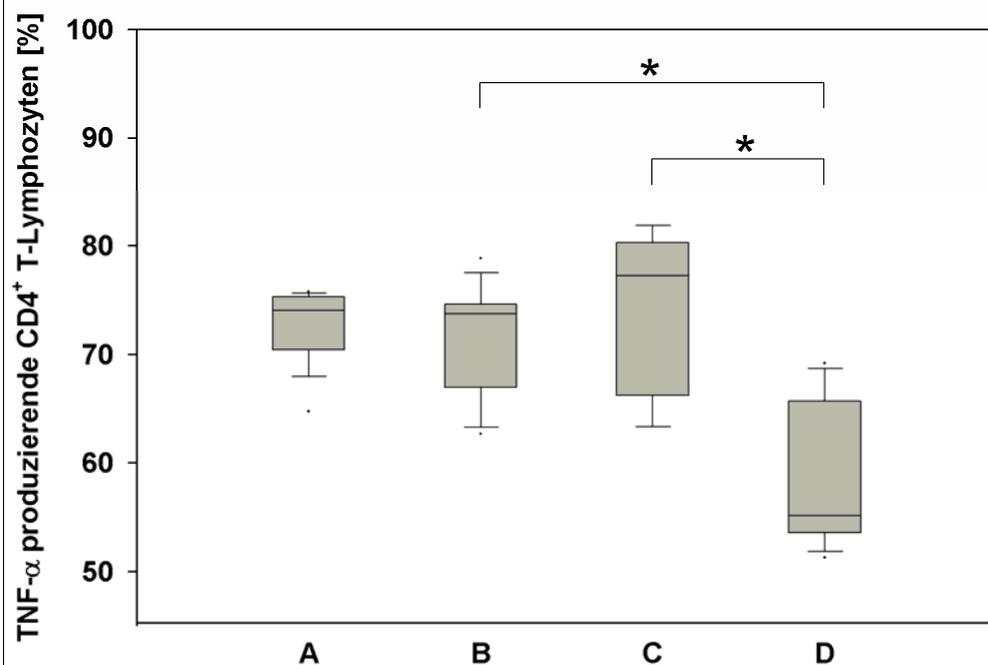


Abbildung 6: Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil TNF- α produzierender CD4⁺ Milz-T-Lymphozyten an der Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen. Der Anteil TNF- α produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten der Milz ist bei Tieren der D-Gruppe im Vergleich zu Tieren der B-Gruppe (*, $p < 0,01$) und C-Gruppe (*, $p < 0,01$) signifikant vermindert. TNF- α , Tumornekrosefaktor-alpha; Gruppeneinteilung: A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

Tabelle 7: Verteilung TNF- α produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A bis D

Gruppe	Median [%]	Standardabweichung	Anzahl der Tiere
A	74,1	3,01	15
B	73,7	4,94	14
C	77,2	7,21	09
D	55,2	6,50	12

A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen

Die Abbildung 6 zeigt den Anteil TNF- α produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten gemessen an der Gesamtpopulation der CD4⁺ T-Zellen der einzelnen Versuchsgruppen in Form von Box-plots. Es ist ersichtlich, dass eine EtOH-Behandlung bei gleichzeitiger Infektion mit *K. pneumoniae* (D-Gruppe) im Vergleich zur alleinigen EtOH-Behandlung (B-Gruppe) zu einer signifikanten Verminderung des prozentualen Anteils TNF- α produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten ($p < 0,01$) führte. Vergleicht man die Versuchsgruppe, in denen *K. pneumoniae* intranasal appliziert wurde (C- und D-Gruppe), so wird auch hier deutlich, dass EtOH im Vergleich zu einer NaCl-Behandlung die Anzahl TNF- α produzierender

CD4⁺ T-Lymphozyten signifikant senkte ($p < 0,01$). Der Anteil TNF- α produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten liegt im Median bei 55,2 % bei Tieren, die mit EtOH und *K. pneumoniae* behandelt wurden (Tabelle 7) und ist somit im Median vermindert im Vergleich zu Tieren der A- (Median: 74,1 %), B- (Median: 73,7 %) und C-Gruppe (Median: 77,2 %). Diese Verminderung des Anteils TNF- α produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten war signifikant verglichen mit Tieren der Gruppe B ($p < 0,01$) und C ($p < 0,01$). Die statistische Untersuchung der anderen Gruppen auf Signifikanzen ergab keine Unterschiede.

4.1.2 Messung der IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten

Die Anzahl der IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch aus dem R2-Gate nach Stimulation mit PMA und Ionomycin ermittelt. Die Abbildung 8 zeigt exemplarisch die somit gewonnenen Dotplots IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Zellen jeweils eines Versuchstieres aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Der ermittelte Anteil IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten an der Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen ist in der Boxplot-Grafik in Abbildung 7 zusammengefasst.

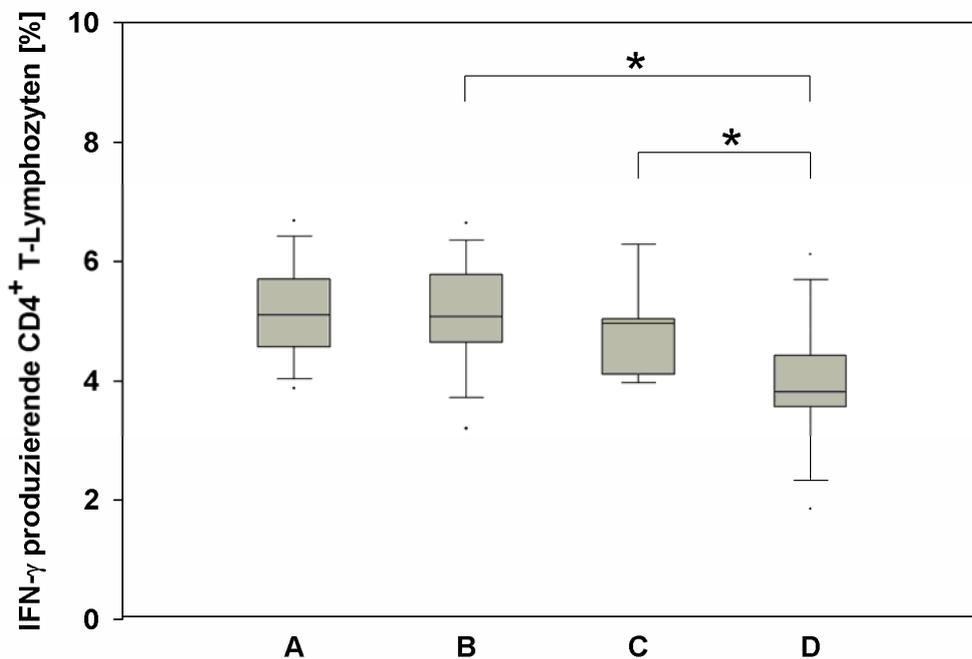


Abbildung 7: Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil IFN- γ produzierender CD4⁺ Milz-T-Lymphozyten an der Gesamtheit der CD4⁺ T-Zellen. Die Anzahl der IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten der Milz ist bei Tieren der D-Gruppe im Vergleich zu Tieren der B-Gruppe (*, $p < 0,01$) und C-Gruppe (*, $p < 0,01$) signifikant vermindert. IFN- γ , Interferon-gamma; Gruppeneinteilung: A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

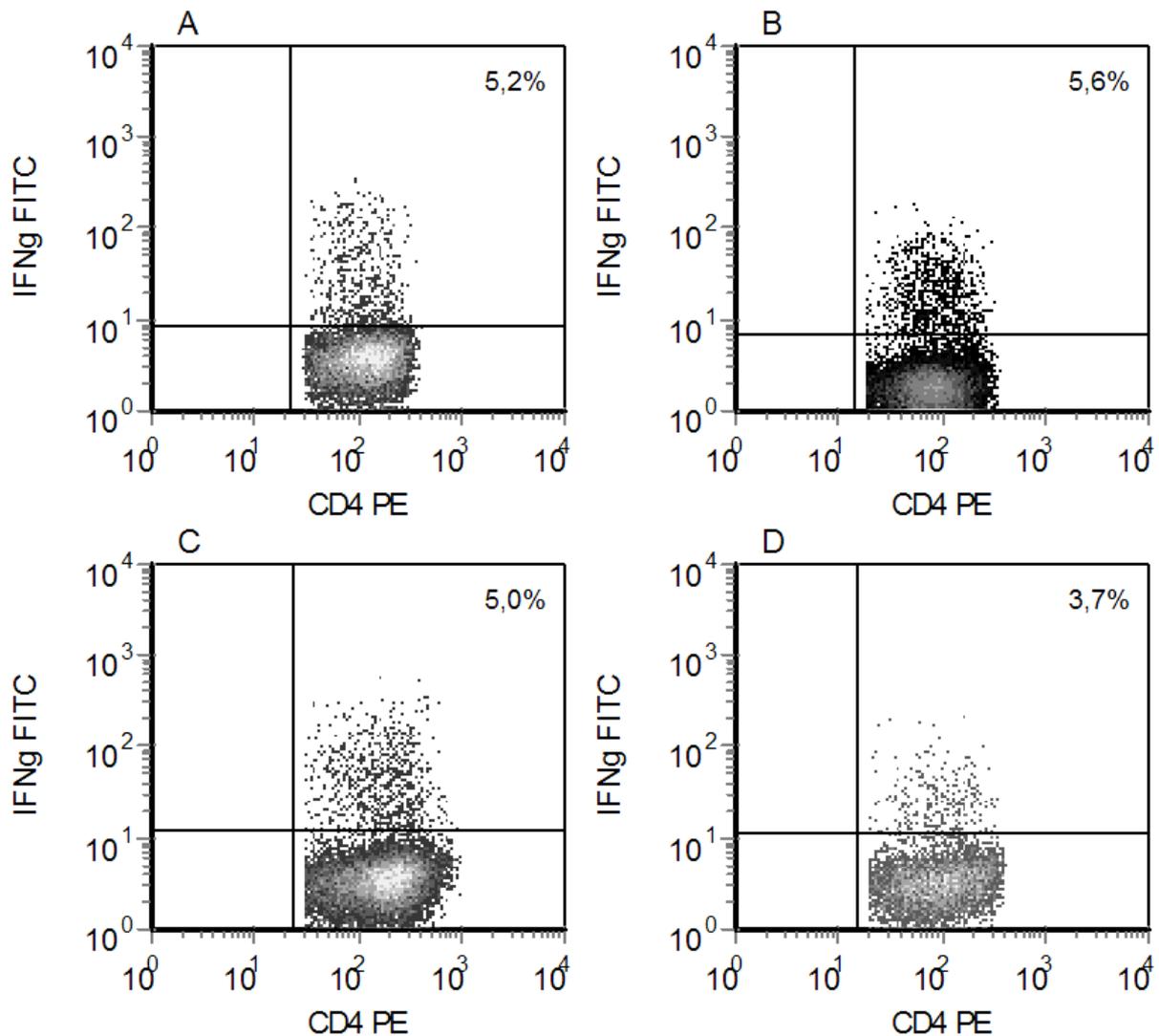


Abbildung 8: Durchflusszytometrische Messung IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten (exemplarische Darstellung in Form von Dotplots). Während die Anzahl der IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A, B und C annähernd gleich war, konnte eine signifikante Verminderung bei Balb/c-Mäusen der D-Gruppe aufgezeigt werden. IFN- γ , Interferon-gamma; FITC, Fluorescein-Isothiocyant; PE, Phycoerythrin. Gruppenbezeichnung: A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

Deutlich wird die signifikante Verminderung des prozentualen Anteils IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Zellen bei Tieren, die mit EtOH und *K. pneumoniae* behandelt wurden. Eine EtOH-Behandlung bei zusätzlicher *K. pneumoniae* Infektion senkte die Anzahl INF- γ produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten signifikant im Vergleich zu einer alleinigen EtOH-Behandlung (B-Gruppe, $p < 0,01$) respektive zu einer NaCl-Behandlung bei gleichzeitiger Infektion mit *K. pneumoniae* (C-Gruppe, $p < 0,01$).

Wie in Tabelle 8 zusammengefasst, zeigte die Medianberechnung keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A, B und

C (Median: A: 5,1 %; B: 5,1 %; C: 5,0 %). Im Gegensatz dazu konnte bei Tieren, die mit EtOH und Klebsiellen behandelt wurden, eine deutliche Verminderung der IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten (Median 3,8 %) nachgewiesen werden. Der Anteil IFN- γ produzierender T-Zellen der Tiere der D-Gruppe war im Vergleich zu jenen der B- (p<0,01) und C-Gruppe (p<0,01) signifikant vermindert. Die statistische Untersuchung der anderen Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede.

Tabelle 8: Verteilung IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A bis D

Gruppe	Median [%]	Standardabweichung	Anzahl der Tiere
A	5,1	0,78	15
B	5,1	0,89	14
C	5,0	0,71	09
D	3,8	0,99	12

A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen

4.1.3 Messung der TNF- α produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten

Die Anzahl der TNF- α produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch aus dem R3-Gate nach Stimulation mit PMA und Ionomycin ermittelt. Die Abbildung 9 zeigt exemplarisch die somit gewonnenen Dotplots TNF- α produzierender CD8⁺ T-Zellen jeweils eines Versuchstieres aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Der ermittelte Anteil TNF- α produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten an der Gesamtheit der CD8⁺ T-Zellen ist in der Boxplot-Grafik in Abbildung 10 zusammengefasst.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der CD8⁺ T-Lymphozyten zeigte einen verminderten Anteil TNF- α produzierender CD8⁺ T-Zellen bei Tieren der D-Gruppe (Abbildung 10). Es wurde deutlich, dass eine EtOH-Behandlung mit zusätzlicher intranasaler Infektion der Tiere mit *K. pneumoniae* zu einer Verminderung der TNF- α produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten führte. Im Vergleich zu Tieren, die vor *K. pneumoniae* Infektion mit NaCl i.p. behandelt wurden, war die Verminderung der TNF- α produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten bei EtOH-Behandlung signifikant (p=0,03). Die Berechnung der Mediane (Tabelle 9) verdeutlicht, dass die Anzahl TNF- α produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten in Tieren der D-Gruppe mit einem Median von 40,6 % signifikant herabgesetzt war. Tiere der A-, B- und C-Gruppe zeigten nur geringe Unterschiede im durchflusszytometrisch ermittelten Anteil TNF- α produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten (Tabelle 9).

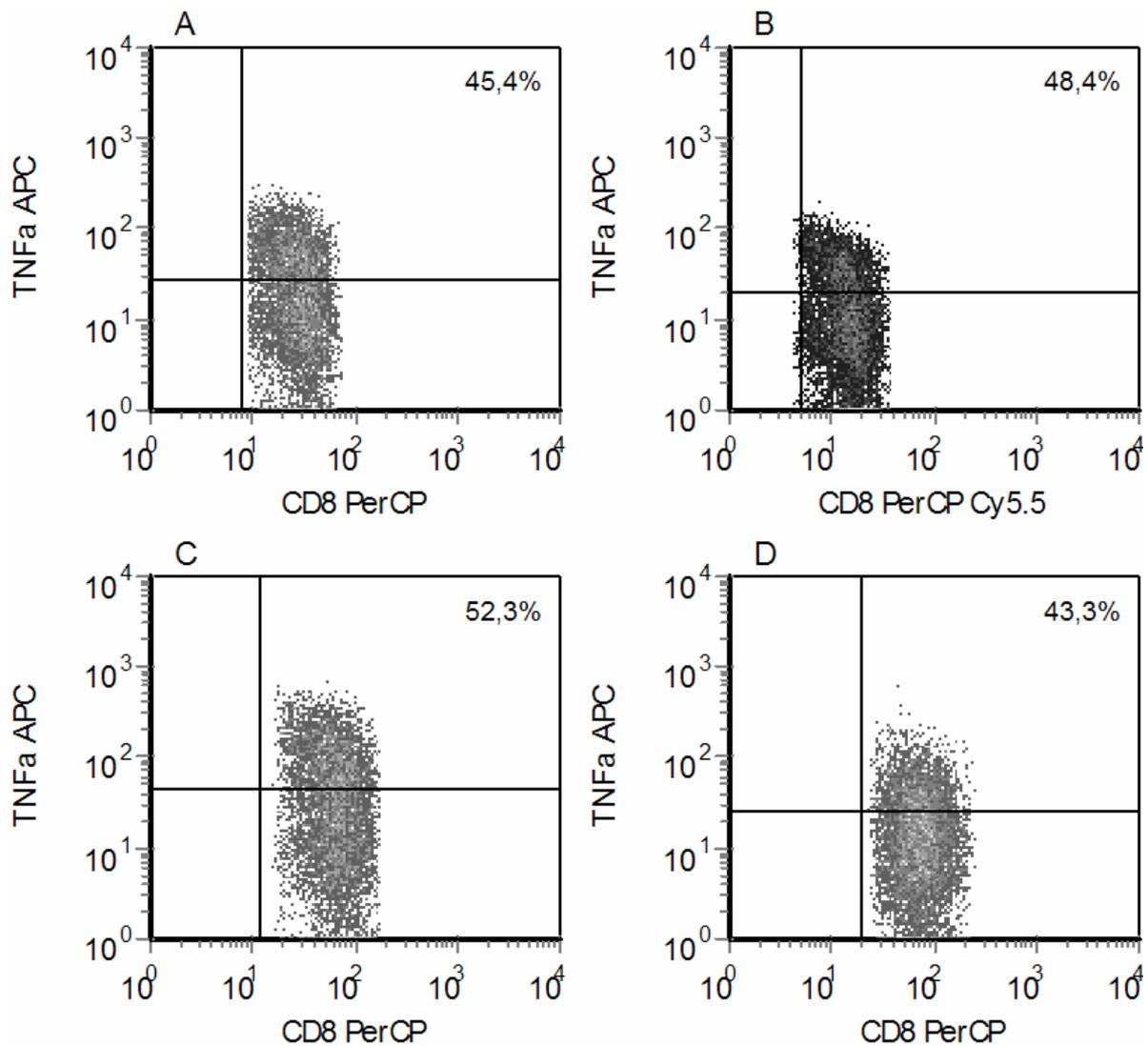


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Messung TNF- α produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten (exemplarische Darstellung in Form von Dotplots). Während die Anzahl der TNF- α produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A, B und C annähernd gleich war, konnte eine Verminderung der TNF- α produzierenden T-Zellen bei Balb/c-Mäusen der D-Gruppe aufgezeigt werden. TNF- α , Tumornekrosefaktor-alpha; APC, Allophycocyanin; PerCP, Peridiniumchlorophyll-Protein. Gruppenbezeichnung: A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

Tabelle 9: Verteilung TNF- α produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A bis D

Gruppe	Median [%]	Standardabweichung	Anzahl der Tiere
A	41,9	8,69	15
B	43,3	6,29	14
C	46,2	6,37	09
D	40,6	9,86	12

A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen

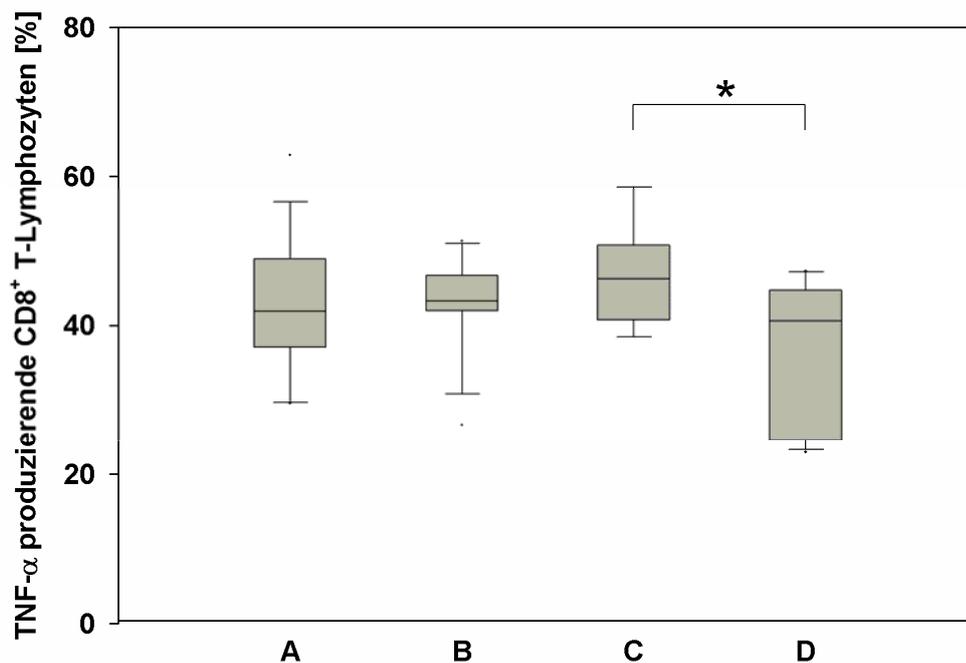


Abbildung 10: Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil TNF- α produzierender CD8⁺ Milz-T-Lymphozyten an der Gesamtheit der CD8⁺ T-Zellen. Die Anzahl der TNF- α produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten der Milz war bei Tieren der D-Gruppe im Vergleich zu Tieren der C-Gruppe (*, $p=0,03$) signifikant vermindert. TNF- α , Tumornekrosefaktor-alpha; Gruppeneinteilung: A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

4.1.4 Messung der IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten

Die Anzahl der IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten wurde durchflusszytometrisch aus dem R3-Gate nach Stimulation mit PMA und Ionomycin ermittelt. Die Abbildung 11 zeigt exemplarisch die somit gewonnenen Dotplots IFN- γ produzierender CD8⁺ T-Zellen jeweils eines Versuchstieres aus den unterschiedlichen Versuchsgruppen. Der Anteil IFN- γ produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten an der Gesamtheit der CD8⁺ T-Zellen ist in der Boxplot-Grafik in Abbildung 12 zusammengefasst.

Die durchflusszytometrische Untersuchung INF- γ produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten erbrachte keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Tabelle 10; Mediane: A 30,8 %; B 30,2 %; C 27,9 %; D 30,7 %). Weder NaCl- noch EtOH-Behandlung respektive die Kombination von NaCl oder EtOH mit einer intranasalen *K. pneumoniae* Infektion führte zu einer signifikanten Veränderung der Anzahl IFN- γ produzierender CD8⁺ T-Zellen.

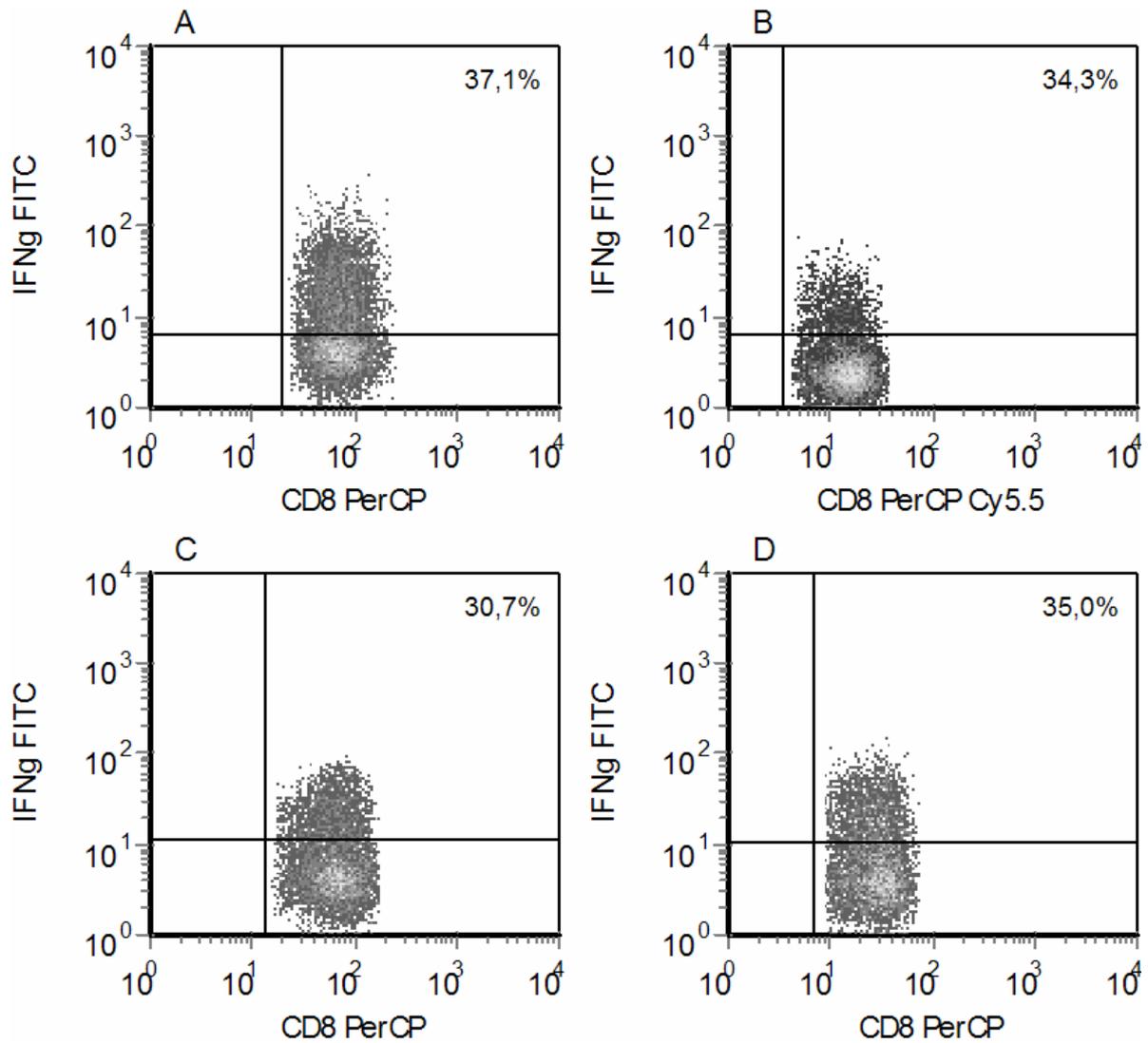


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Messung IFN- γ produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten (exemplarische Darstellung in Form von Dotplots). Die Anzahl IFN- γ produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten war in den unterschiedlichen Versuchsgruppen ähnlich. IFN- γ , Interferon-gamma; FITC, Fluorescein-Isothiocyanat; PE, Phycocerythrin. Gruppenbezeichnung: A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

Tabelle 10: Verteilung IFN- γ produzierender CD8⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A bis D

Gruppe	Median [%]	Standardabweichung	Anzahl der Tiere
A	30,8	4,70	15
B	30,2	7,39	14
C	27,9	3,97	09
D	30,7	6,83	12

A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen

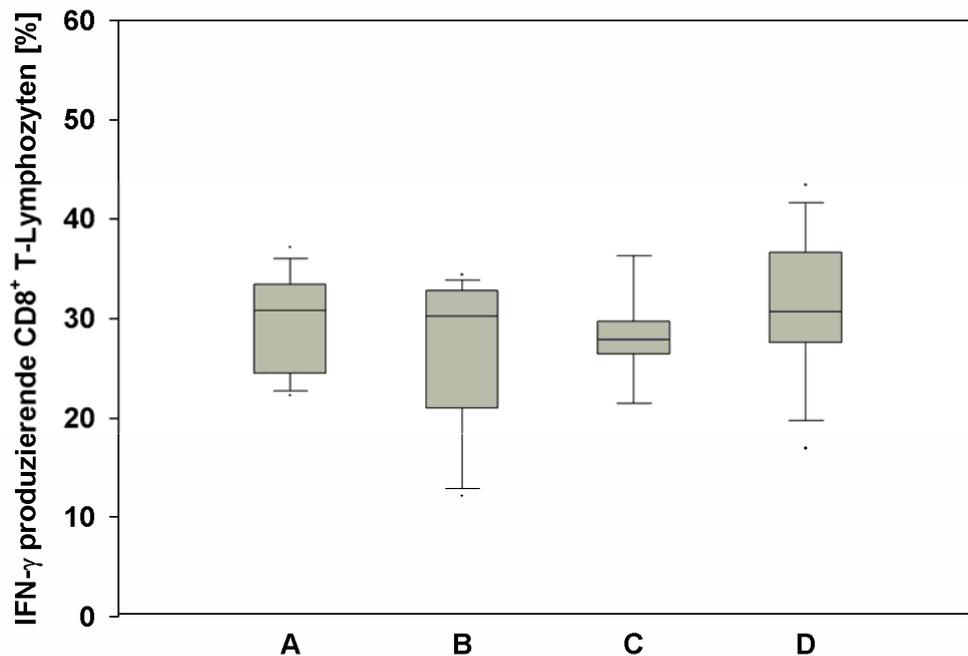


Abbildung 12: Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil IFN- γ produzierender CD8⁺ Milz-T-Lymphozyten an der Gesamtheit der CD8⁺ T-Zellen. Die Tiere der einzelnen Gruppen unterschieden sich nicht in der Anzahl der INF- γ produzierenden CD8⁺ T-Lymphozyten. IFN- γ , Interferon-gamma; Gruppeneinteilung: A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

4.2 Mikrobiologische Ergebnisse

Der nachfolgende Abschnitt beschreibt die Ergebnisse der mikrobiologischen Untersuchung des Blutes und der Lungen der mit *K. pneumoniae* infizierten Balb/c-Mäuse.

4.2.1 Ergebnisse der Keimzahlbestimmung zur postoperativen Infektion

Zur Infektion der Balb/c-Mäuse wurde eine Nährbouillon mit $1,9 \times 10^9$ KBE/ml verwendet. Vor jeder Infektion wurden die eingefrorenen Aliquots aufgetaut und die Keimzahl bestimmt. Nach Berechnung mit Hilfe des arithmetischen Mittels ergaben sich Keimkonzentrationen von $1,1$ bis $2,9 \times 10^9$ KBE/ml, so dass bei jeder Maus von einer i.n. Infektionsmenge von 10^4 KBE/50 μ l NaCl ausgegangen werden konnte.

4.2.2 Keimzahlbestimmung von *Klebsiella pneumoniae* in den Lungen

Zum Nachweis einer Vermehrung der initial applizierten Menge *K. pneumoniae* (10^4 KBE/50 μ l) wurde die Keimzahl in Lungen von Tieren der C-Gruppe (n=8) und D-Gruppe (n=8) 24 Stunden nach Infektion bestimmt (Tabelle 11).

Tabelle 11: Keimbelastung in Lungen 24 Stunden *post infectionem*

Tier Nr. ¹⁾	Keimbelastung in [KBEx10 ⁵ /ml] ²⁾	Tier Nr. ¹⁾	Keimbelastung in [KBEx10 ⁵ /ml] ³⁾
C-2 grün	8,2	D-2 rot hinten	6,7
C-2 rot	33,6	D-2 grün vorn	15,9
C-6 blau hinten	68,6	D-1 rot hinten	24,6
C-6 grün hinten	70,9	D-5 rot vorn	41,4
C-1 grün hinten	78,2	D-1 rot vorn	46,8
C-2 weiß	80,9	D-5 grün vorn	64,1
C-1 rot hinten	132,0	D-2 rot vorn	65,0
C-1 grün vorn	229,0	D-1 grün hinten	436,4

C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen; p.i., *post infectionem*; KBE, Kolonie bildende Einheit, Anzahl der Tiere: C: n=8; D: n=8

¹⁾ Bezeichnung des infizierten Tieres

²⁾ Keimkonzentration in Lungen 24 h p.i. C-Gruppe

³⁾ Keimkonzentration in Lungen 24 h p.i. D-Gruppe

Tabelle 12: Statistische Auswertung der Keimbelastung in Lungen 24 Stunden *post infectionem*

Medianberechnung		Signifikanz	
Gruppe	Median [KBEx10 ⁵ /ml]	Gruppenvergleich	p-Wert
C	74,6	C versus D	0,161
D	44,1		

C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen

Die Werte der einzelnen Keimzahlbestimmungen nach Ausplattierung der Lungensuspension sind in Tabelle 11 dargestellt und in der Abbildung 13 in Boxplots zusammengefasst.

Die Keimzahlkonzentrationen in Lungen von Tieren der D-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant von denen der C-Gruppe. Bei der Auswertung der Keimbelastung in den Lungen wurde von einer infizierten Menge von 10⁴ KBE/50 µl (2x10⁵ KBE/ml) ausgegangen. Sowohl bei Tieren der C-Gruppe als auch bei jenen der D-Gruppe kam es zu einer Keimvermehrung innerhalb von 24 Stunden *post infectionem* (p.i.). In der C-Gruppe stieg die Keimbelastung von initial applizierten 2x10⁵ KBE/ml pro Tier auf 74,6x10⁵ KBE/ml im Median (Tabelle 12). In den Lungen der Tiere der D-Gruppe wurde eine geringere Zunahme der Keimbelastung verzeichnet. Der Median lag bei 44,1x10⁵ KBE/ml. Die statistische Analyse konnte keinen

signifikanten Unterschied in Bezug auf die Keimkonzentration in den Lungen 24 Stunden p.i. aufzeigen ($p=0,161$).

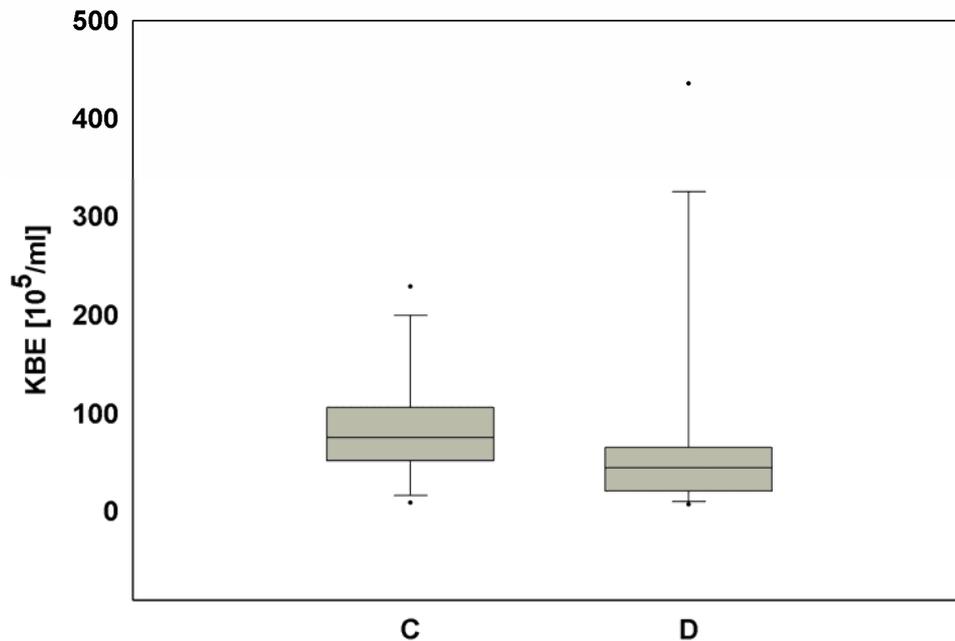


Abbildung 13: Messung der Keimbelastung in Lungen 24 Stunden *post infectionem* in KBE [10^5 /ml]. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der C-Gruppe und der D-Gruppe aufgezeigt werden. Gruppenbezeichnung: C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen. Anzahl der Tiere: C: n=8; D: n=8.

Zum Ausschluss einer Keimbelastung in gesunden Tieren wurden als Referenz drei Balb/c-Mäuse der A-Gruppe untersucht. Die Aufbereitung der Lungen erfolgte wie unter 3.6.4 beschrieben. Nach 24 Stunden Bebrütung zeigte sich auf keiner der Columbia-Blutagar + 4 % Dextrose ein bakterielles Wachstum.

4.2.3 Mikrobiologische Untersuchungsergebnisse des Blutes

Zum Nachweis einer Bakteriämie bei bestehender Klebsiellenpneumonie wurde das Blut von drei Tieren der C-Gruppe 24 Stunden nach Infektion mit *K. pneumoniae* mikrobiologisch untersucht. Wie in Tabelle 13 dargestellt, konnte eine Bakteriämie mit *K. pneumoniae* bei zwei von drei Tieren nachgewiesen werden.

Tabelle 13: Anzahl Kolonie bildender Einheiten im mikrobiologischem Blutausstrich nach 24-stündiger Inkubation

Tier Nr. ¹⁾	<i>K. pneumoniae</i> KBE/100 µl
C-8 grün vorn	10
C-8 grün hinten	61
C-8 rot hinten	0

KBE, Kolonie bildenden Einheit; C, NaCl+Klebsiellen; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*

¹⁾ Bezeichnung des untersuchten Tieres

4.3 Histologische Ergebnisse

Im nachfolgenden Abschnitt sind die histologischen Ergebnisse der Untersuchung von Leber und Lunge nach HE-Färbung beschrieben.

4.3.1 Histologie der Lunge

Lungen von Balb/c-Mäusen nach NaCl- und EtOH-Behandlung zeigten eine normale Lungenarchitektur mit ventilierten Bronchioli terminales und ohne Anzeichen einer Entzündung (Abbildung 14 A+B).

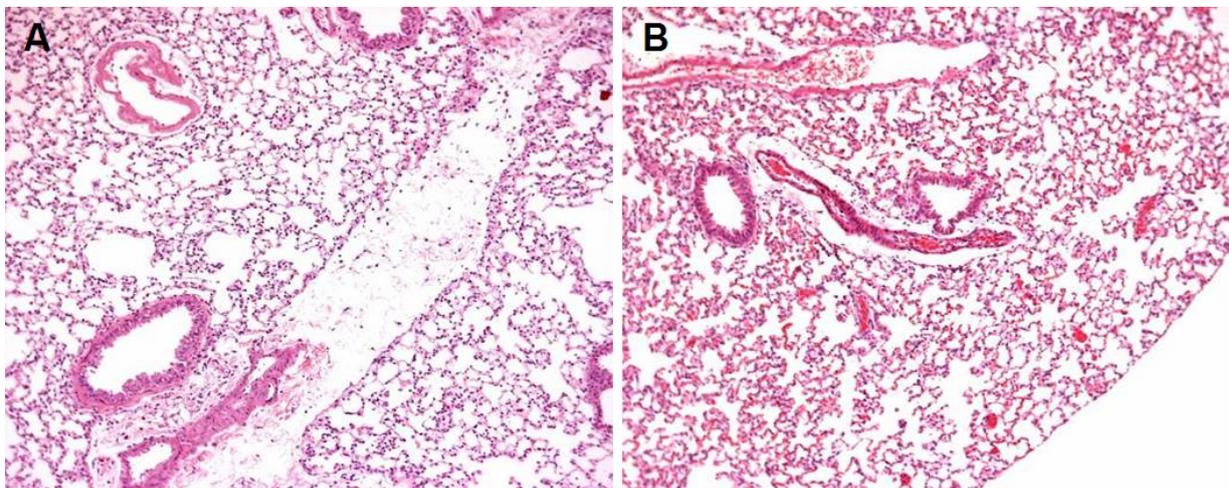


Abbildung 14: Histologische Darstellung der Lunge ohne stattgehabte Infektion mit *K. pneumoniae* nach HE-Färbung (exemplarische Darstellung). A) Lunge ohne Behandlung (Vergrößerung 100X). B) Lunge nach acht tägiger EtOH-Injektion (Vergrößerung 100X). In beiden Abschnitten ist eine normal konfigurierte Lungenarchitektur zu sehen. Abkürzung: HE, Hämatoxylin/Eosin; EtOH, Ethanol. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

Im Gegensatz dazu zeigten sich in Lungen von mit *K. pneumoniae* infizierten Balb/c-Mäusen deutliche histopathologische Veränderungen im Sinne einer Infektion (Abbildung 15 A-D).

Es konnte eine massive Einwanderung von Leukozyten und eine Verminderung der ventilerten Lungenabschnitte nachgewiesen werden. Diese Veränderung der Lungenarchitektur war bei Tieren nach EtOH-Behandlung und Klebsielleninfektion ausgeprägter (Abbildung 15 B+D) als bei Tieren nach NaCl-Injektion und Infektion mit *K. pneumoniae* (Abbildung 15 A+C). Der schwerere Infektionsverlauf zeigte sich auch durch verstärkte Destruktion der Alveolarsepten in Lungen nach EtOH-Injektion und Infektion mit *K. pneumoniae* (Abbildung 15 D).

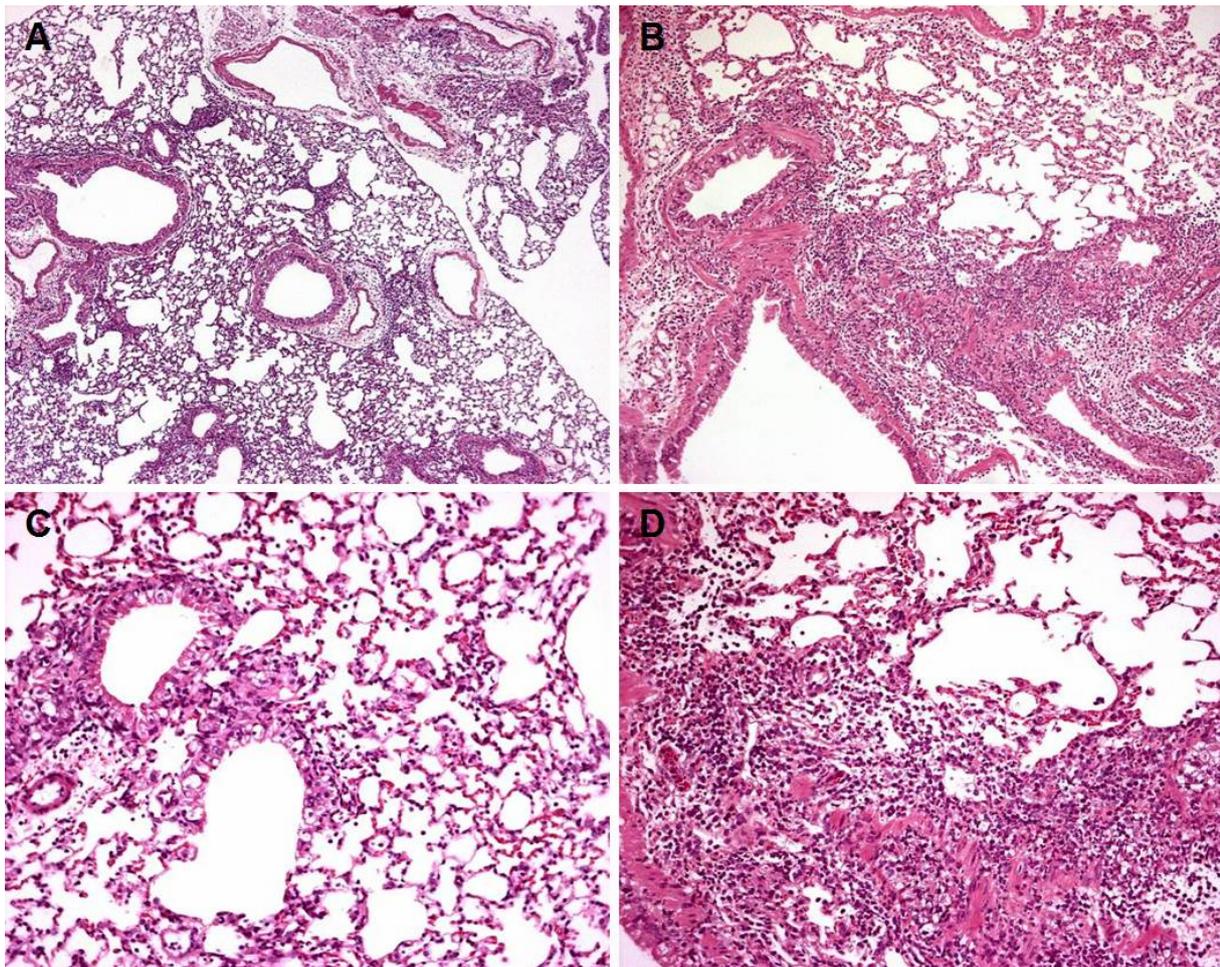


Abbildung 15: Histologische Darstellung der Lungen (HE-Färbung) 24 Stunden nach Infektion mit *K. pneumoniae* (exemplarische Darstellung). A+C) Lungen nach NaCl+Klebsiellen bei 100x Vergrößerung (A) und 200x (C). B+D) Lungen nach EtOH+Klebsiellen bei 100x Vergrößerung (B) und 200x (D). Deutlich erkennbar ist in allen Abschnitten die massive Infiltration von Leukozyten bei gleichzeitiger Verminderung der belüfteten Lungenanteile. Diese histopathologische Veränderung ist in Lungen nach EtOH-Behandlung und Klebsielleninfektion ausgeprägter als nach NaCl-Behandlung. Abkürzung: HE, Hämatoxylin/Eosin; *K. pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae*; NaCl, Kochsalz; EtOH, Ethanol. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

4.3.2 Histologie der Leber

Die histologische Untersuchung der Leber zeigte sowohl bei Tieren, die keiner Behandlung unterzogen wurden (Abbildung 16 A), als auch bei Tieren nach EtOH-Injektionen (Abbildung 16 B) eine physiologisch konfigurierte Leberstruktur. Es konnten keine Organmanifestationen im Sinne einer Steatosis hepatis oder einer Leberzirrhose nachgewiesen werden.

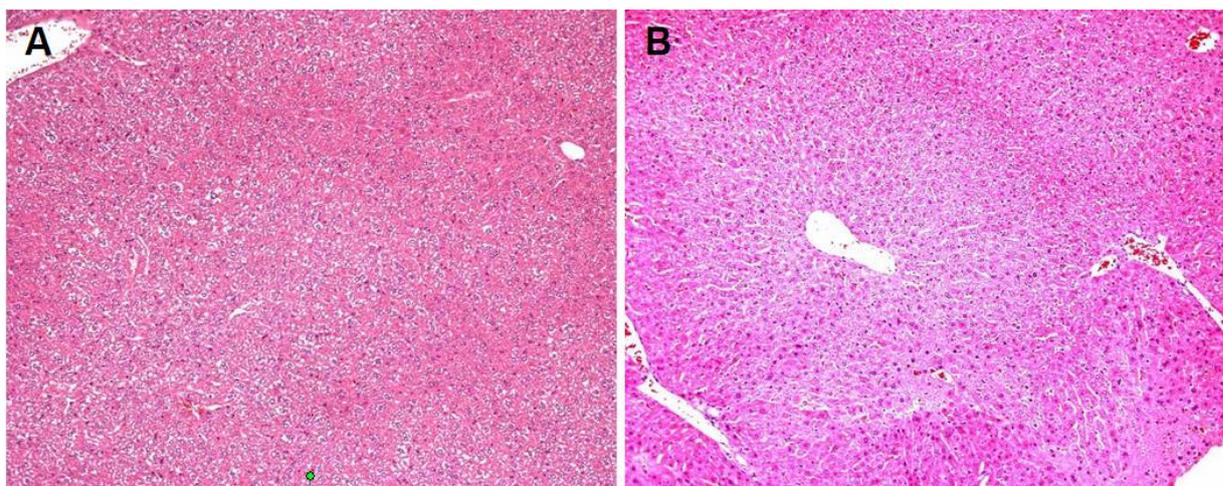


Abbildung 16: Histologische Darstellung der Leber nach HE-Färbung. A) Leber ohne Behandlung (Vergrößerung 100X). B) Leber nach acht tägiger intraperitonealer EtOH-Injektion (Vergrößerung 100X). In beiden Abbildungen ist ein normal konfigurierter Ausschnitt der Leber ohne Organveränderung im Sinne einer Steatosis hepatis oder Leberzirrhose dargestellt. Abkürzung: HE, Hämatoxylin/Eosin; EtOH, Ethanol. Anzahl der Tiere: A: n=15; B: n=14; C: n=9; D: n=12.

4.4 Kriterien zur Beurteilung der Befindlichkeit der Tiere

Zur Beurteilung des körperlichen Befindens wurden die Tiere am Tag der Tötung mittels eines Dreipunkte-Scores begutachtet. Es wurden Werte von null bis zwei zur Bewertung der einzelnen klinischen Parameter vergeben.

Tabelle 14: Darstellung der Mittelwerte der klinischen Parameter und der Gesamtsumme

Gruppe	Parameter Mittelwert			Mittelwert
	Piloerektion	Sekretion	Motorik	Gesamtsumme
A (n=15)	1	0	0,57	0,52
B (n=14)	1	0	0,73	0,58
C (n=9)	1,1	0,78	0,33	0,73
D (n=12)	1	1	0,67	0,87

A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen; n, Anzahl untersuchter Tiere

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden für jeden Parameter innerhalb einer Gruppe ein Mittelwert bestimmt und diese Mittelwerte zu einem Gesamtscore zusammengefasst (Tabelle 14).

Neben der Bestimmung der klinischen Parameter wurden zur Beurteilung des körperlichen Befindens der Tiere die Gewichtsänderungen zwischen A) OP-Tag und Tötungstag sowie zwischen B) Tag der Infektion und Tötungstag untersucht (Abbildung 17).

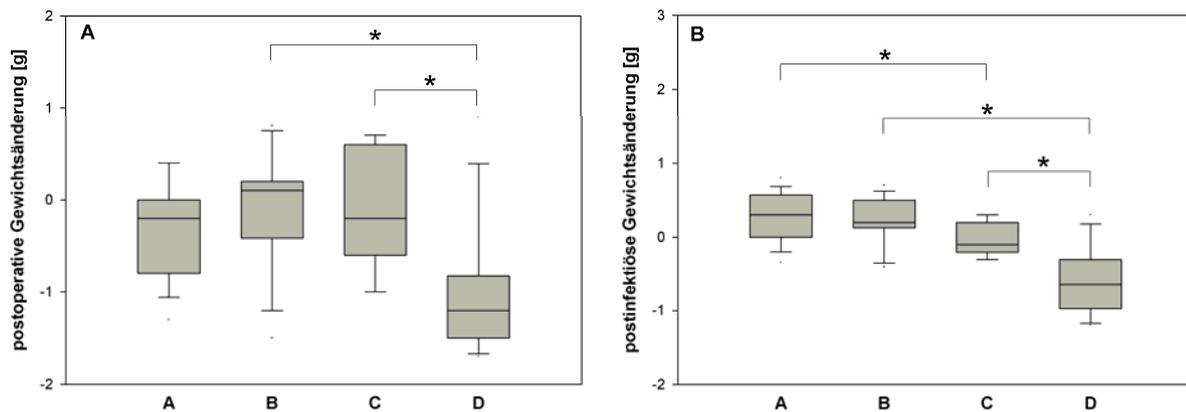


Abbildung 17: Darstellung der Gewichtsänderungen zwischen A) OP-Tag und Tag der Tötung; B) OP-Tag und Tag der Infektion mit *K. pneumoniae*. A) Es wurde eine signifikant stärkere postoperative Gewichtsreduktion bei Tieren der D-Gruppe im Vergleich zu Tieren der B-Gruppe ($p=0,002$) und C-Gruppe ($p=0,003$) verzeichnet. B) 24 Stunden nach Infektion mit *K. pneumoniae* wiesen Tiere der C- bzw. D-Gruppe im Vergleich zur A- ($p=0,023$) bzw. B-Gruppe ($p=0,02$) signifikant höhere Gewichtsabnahmen auf. Dabei war die Gewichtsreduktion unter EtOH-Behandlung (D) im Vergleich zur C-Gruppe signifikant größer ($p=0,003$). Abkürzung: A, NaCl; B, EtOH; C, NaCl+Klebsiellen; D, EtOH+Klebsiellen; *K. pneumoniae*, Klebsiella pneumoniae. Anzahl der Tiere: A: $n=15$; B: $n=14$; C: $n=9$; D: $n=12$.

Im postoperativen Verlauf konnte bei Tieren, die mit EtOH und Klebsiellen behandelt worden waren, die größte Gewichtsabnahme registriert werden. Im Vergleich zu Tieren der B-Gruppe ($p=0,002$) und C-Gruppe ($p=0,003$) war die Gewichtsreduktion signifikant (Abbildung 17 A).

Die Infektion mit *K. pneumoniae* führte 24 Stunden p.i. zu einer signifikanten Gewichtsabnahme bei Tieren der C- ($p=0,023$) und D-Gruppe ($p=0,002$), wobei eine EtOH-Behandlung eine signifikant größere Gewichtsreduktion zur Folge hatte ($p=0,003$) (Abbildung 17 B).

Tieren, die intranasal mit *K. pneumoniae* infiziert worden waren, erging es gemessen am Dreipunkte-Score schlechter. Durchschnittlich wurden höhere Scorepunkte (Tabelle 14) vergeben. Neben einer vernachlässigten Fellpflege fielen diese Tiere häufiger durch ein adynamisches, abgesondertes Verhalten auf. Im Gegensatz zur A- und B-Gruppe war bei Tieren mit bestehender Klebsiellenpneumonie eine Sekretion zu beobachten (Mittelwert_{Sekretion} C: 0,78; Mittelwert_{Sekretion} D: 1).

Obwohl bei Tieren, die mit EtOH behandelt wurden, die Scorepunkte im Vergleich zu Tieren der A-Gruppe durchschnittlich leicht erhöht waren, ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bei der Beurteilung der Gewichtsunterschiede zwischen diesen beiden Gruppen.

4.5 Alkoholbestimmung im Blut

Die Tabelle 15 zeigt die Alkoholbestimmung im Blut etwa 60 Minuten nach i.p. Injektion von 3 g/kg Körpergewicht EtOH. Dargestellt sind Blutalkoholwerte von vier Mäusen. Zum Vergleich ist das Ergebnis der Blutuntersuchung eines unbehandelten Tieres aufgezeigt. Bei den mit Ethanol behandelten Tieren ergab sich im Durchschnitt eine Blutalkoholkonzentration von 2,97 Promille, während im Blut des unbehandelten Tieres kein EtOH nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 15: Blutalkoholbestimmung

Tier Nr. ¹⁾	Ethanol in		mg/ml	Blutmenge in ml	Ethanol in	
	mg/g	MW in mg/g			mg/ml (korrig.)	mg/g (korrig.)
B-grün	2,63	2,72	2,87	300	3,83	3,63
	2,81					
B-rot vorn	2,07	2,14	2,26	300	3,01	2,85
	2,20					
B-rot hinten	2,52	2,53	2,67	300	3,56	3,37
	2,54					
B-blau vorn	1,56	1,56	1,65	330	2,14	2,03
	1,57					
A-rot	0,00	0,00				
	0,00					
MW					3,13	2,97

korrig., korrigiert; Gruppenbezeichnung: A, NaCl; B, EtOH;

¹⁾ Bezeichnung des untersuchten Tieres

5. Diskussion

Die Etablierung dieses murinen operativen Infektionstiermodells erbrachte durch die Beobachtung der TNF- α und IFN- γ produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sowie mikrobiologische und histologische Untersuchungen in Verbindung mit Ethanolgaben folgende wichtige Ergebnisse:

- (1) Eine achttägige intraperitoneale Ethanolgabe führte *per se* zu keiner veränderten Anzahl der TNF- α und IFN- γ produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten der Milz.
- (2) In Verbindung mit einer durch *K. pneumoniae* ausgelösten Pneumonie führte die Behandlung der Tiere mit Alkohol zu einer signifikanten Verminderung der Anzahl TNF- α produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten.
- (3) Diese durch Alkohol verursachten immunologischen Veränderungen waren histologisch mit einer entzündlich veränderten Lungenarchitektur bei Tieren, die mit *K. pneumoniae* infiziert wurden, vergesellschaftet.
- (4) Gemessen an abnehmenden Gewichten und erhöhten klinischen Scores führte die Induktion einer Klebsiellenpneumonie zur Verschlechterung des Allgemeinbefindens der Versuchstiere.

5.1 Ethanoleinfluss auf Zytokin produzierende T-Zellen ohne Infektion

Nach Tötung der Tiere am 11. Tag des Versuchsablaufes wurde die Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender CD4⁺ und CD8⁺ Milz-T-Lymphozyten durchflusszytometrisch ermittelt. Dabei konnten ohne die Induktion einer Klebsiellenpneumonie weder bei den mit Alkohol noch bei den mit Kochsalz behandelten Balb/c-Mäusen Veränderungen in der Anzahl der TNF- α und IFN- γ produzierenden T-Zellen nachgewiesen werden. Eine achttägige Ethanolbehandlung *per se* hatte in dieser Arbeit keinen messbaren immunmodulatorischen Effekt.

Neben Publikationen, in denen eine zehntägige Ethanolbehandlung die T-Zellzahlen nicht beeinflusste [12, 19, 128], fanden sich in der Literatur auch Angaben, in denen Veränderungen der Immunantwort bereits nach Ethanolgabe von einigen Tagen beschrieben wurden. So zeigten Starkenburg et al. [128] bereits nach fünftägiger oraler Alkoholgabe Veränderungen in der T_H1-vermittelten IFN- γ Produktion auf. Saad et al. [110] gelang es nach siebentägiger Gabe einer Leiber-DeCarli-Diät versetzt mit 7 % Ethanol, eine höhere Infektanfälligkeit alko-

holbehandelter und somit immunkompromittierter, männlicher C57Bl/6 Mäuse gegenüber *Listeria monocytogenes* nachzuweisen. Damit verbunden war im Vergleich zu ebenfalls infizierten Kontrolltieren die Ausbildung größerer und stärker nekrotisierender Lebergranulome, was ursächlich in einer gestörten zellvermittelten Immunantwort begründet lag. Mandrekar et al. [76] verzeichneten eine verminderte IFN- γ Ausschüttung von T-Zellen nach Kontakt mit Ethanol behandelten DC.

Trotz dieser Daten konnte in dem hier dargestellten Modell die achttägige Behandlung der Balb/c-Mäuse mit intraperitonealen Ethanolinjektionen die Anzahl Zytokin produzierender Milz-T-Lymphozyten nicht beeinflussen. In der Literatur lassen sich dazu vergleichbare Daten finden, obwohl nur wenige Studien die Beeinflussung der Zytokin produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen durch Ethanol untersucht haben. Lanzke et al. [68] konnten nach einer achttägigen Ethanolbehandlung von Balb/c-Mäusen ebenfalls keine Veränderung der Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender T-Lymphozyten nachweisen. Die Untersuchungen von menschlichen T-Zellen und deren Zytokinmuster durch Romeo et al. [109] zeigten, dass ein 30-tägiger, moderater Alkoholkonsum keine Wirkung auf die TNF- α Ausschüttung hatte.

Obwohl nach achttägigen Ethanolbehandlung kein messbarer immunmodulatorischer Effekt auf die Zytokin produzierenden Milz-T-Lymphozyten nachzuweisen war, ist eine Ethanol induzierte Suppression weniger Zytokin produzierender T-Zellen nicht auszuschließen. Diese war allerdings nicht ausreichend, um die Zytokin produzierende Gesamtpopulation zu beeinflussen. Des Weiteren wäre es denkbar, dass Komponenten der angeborenen Immunität bereits durch die intraperitoneale Ethanolgabe beeinflusst wurden. In diesem Zusammenhang sei beispielsweise die frühzeitige Beeinflussung von Makrophagen und deren Zytokinmuster genannt [3, 22, 46, 129, 130]. So führt die durch Ethanol induzierte Suppression der MHC II-Molekül-Expression auf der Zelloberfläche von AgPC zu einer verminderten Fähigkeit der Antigenpräsentation, wodurch die T-Zell-vermittelte Immunantwort gestört wird [46, 76, 130].

Untersuchungen an stimulierten Monozyten zeigten, dass bei akuter einmaliger Einnahme von Alkohol unter anderem die Produktion des proinflammatorischen Zytokins TNF- α vermindert bzw. der IFN- γ Level in stimulierten Monozyten aus freiwilligen Probanden erniedrigt war [95, 132]. Des Weiteren kann eine akute oder kurzzeitige Gabe von Ethanol zu einer Verminderung der TNF- α Spiegel [97, 129] durch die Hemmung des unter anderem auf Makrophagen befindlichen TNF- α -Konvertierungsenzym (TACE) führen [152, 153, 154]. Dieses Enzym, eine Metalloproteinase, führt zur Umwandlung von TNF- α und ermöglicht so die Frei-

setzung aus dem membrangebunden Vorläufermolekül ins Blut [10, 93]. Die Beeinflussung des Zytokinmusters kann dazu beitragen, dass nachfolgende Vorgänge der adaptiven Immunabwehr wie die Erkennung eines MHC II gebundenen Pathogens oder die Invasion spezifischer Zellen in entzündetes Gewebe nachhaltig gestört werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Literaturrecherche verdeutlichen, dass der Einfluss von Ethanol auf die Vorgänge der angeborenen und adaptiven Immunität von der Dauer der Alkoholgabe abhängig ist. Die Gabe einer Einzeldosis führte zu verminderten IFN- γ und TNF- α Spiegeln [20, 97, 129, 131]. Chronische Modelle mit einer Alkoholgabe von bis zu 13 Wochen beschrieben erhöhte IFN- γ Konzentrationen in T-Zellen [118]. Während in chronischen Alkoholmodellen ohne Induktion einer Leberzirrhose die TNF- α Produktion der Makrophagen erniedrigt war [37, 101], führte ein Auftreten einer Leberschädigung beim Menschen zu einer TNF- α Erhöhung [69].

Es ist anzunehmen, dass die Dauer der Ethanolgabe entscheidenden Einfluss auf die Immunmodulation hat. Je nach Zeitpunkt der Wirkung respektive je nach Vorschädigung des Organismus beispielsweise im Rahmen einer Leberzirrhose zeigen sich unterschiedliche Auswirkungen im Bereich der Zytokinproduktion. Möglicherweise beschreibt die achttägige Ethanolgabe von 3g/kg Körpergewicht wie in dieser Arbeit ein subchronisches Alkoholmodell, in dem die Wirkung einer akuten Ethanolgabe bereits abgeklungen, ein chronischer Alkoholeffekt allerdings noch nicht zu verzeichnen ist. Dies unterstreicht die Annahme einer zeitabhängigen Beeinflussung der Lymphozytenproliferation und Zytokinproduktion durch Alkohol.

Unklar bleibt allerdings, welche Dauer der Ethanolgabe zum Nachweis eines direkten immunmodulatorischen Effektes auf IFN- γ und TNF- α produzierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten gewählt werden sollte. Während die immunmodulatorischen Effekte der Ethanolgabe am monozytären System und dessen Zytokine bereits gut untersucht sind, fehlen in der Literatur Angaben zur Dauer einer Ethanolgabe zur Untersuchung Zytokin produzierender Milz-T-Lymphozyten. Festzuhalten ist, dass für die Untersuchung eines immunsuppressiven Ethanoleffektes auf Milz-T-Zellen die Dauer der Ethanolgabe diskutiert werden muss. Beispielsweise könnte über Untersuchungen an T-Lymphozyten nach einem kürzeren Intervall der Ethanolbehandlung nachgedacht werden.

Im Rahmen eines Infektionsmodells scheint die achttägige intraperitoneale Ethanolgabe gut gewählt. Obwohl nach alleiniger Alkoholbehandlung keine direkte Veränderung der durchflusszytometrisch ermittelten Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden konnten, lassen sich indirekte Schädigungen durch die

Ethanolgabe vermuten. Es ist möglich, dass entscheidende immunmodulatorische Vorgänge beispielsweise im Sinne einer Vorschädigung auf T-Zellebene stattgefunden haben, die bei nachfolgender Infektion mit *K. pneumoniae*, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, zum Tragen kamen.

5.2 Immunsuppression unter Ethanol und Infektion

Nach gleichzeitiger intranasaler Infektion der Versuchstiere mit *K. pneumoniae* und intraperitonealer achttägiger Ethanolgabe konnte 24 Stunden *post infectionem* eine signifikante Verminderung der TNF- α produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten und der IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden. Während die alleinige intraperitoneale Gabe von Ethanol keinen Einfluss auf die Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten hatte, zeigte sich bei gleichzeitiger Induktion einer Pneumonie durch *K. pneumoniae* eine deutliche Immunsuppression.

Shellito und Olariu [116] wiesen ebenfalls eine Immunsuppression nach mehrmonatiger Alkoholbehandlung und Infektion nach. Diese äußerte sich in einer verminderten Rekrutierung von T-Zellen in infiziertes Lungengewebe. Des Weiteren konnten sie eine Verminderung von CD4⁺ T-Lymphozyten in der Milz und aktivierter T-Lymphozyten in infiziertem Lungengewebe aufzeigen. Die Reduktion der T-Zellzahlen und der Proliferations- und Differenzierungsfähigkeit von Lymphozyten [1, 56, 131] sowie die fehlende T-Zellaktivierung lassen eine Störung weiterer Zellfunktion wie beispielsweise der Zytokinproduktion vermuten. Diese könnte sich in einer verminderten Anzahl der TNF- α und IFN- γ produzierenden T-Zellpopulationen manifestieren und so die Immunantwort auf die inokulierten *K. pneumoniae* beeinflussen.

5.2.1 TNF- α produzierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten

Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, führte die Ethanolgabe von 3g/kg Körpergewicht über acht Tage bei gleichzeitig induzierter Pneumonie mit *K. pneumoniae* zu einer signifikanten Verminderung TNF- α produzierender CD4⁺ und CD8⁺ Milz-T-Lymphozyten. Die wichtige Bedeutung von TNF- α bei der Bekämpfung von bakteriellen Pathogenen im Rahmen pulmonaler Infekte wurde an mehreren Infektionsmodellen aufgezeigt [4, 80, 89, 145].

Ohne immunsupprimierenden Ethanoleffekt wurde eine erhöhte Expression von TNF- α in den Luftwegen von Patienten mit bakterieller Pneumonie [94] und in den Lungen von Mäusen nachgewiesen, die sowohl mit grampositiven als auch gramnegativen Bakterien infiziert wur-

den [41, 67, 134]. Mit dem intrapulmonalen Nachweis von TNF- α war ein längeres Überleben der Versuchstiere verbunden. Eine Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis* führte zur Erhöhung der TNF- α produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten nach Kontakt mit Mitogen stimulierten peripheren Blutmonozyten [27]. Im Gegensatz dazu führte eine vor der Infektion durchgeführte Ethanolbehandlung zu einer supprimierten TNF- α Produktion in Serum, Lunge und Alveolarmakrophagen [95, 96]. Nair et al. [95] gelang es, eine Ethanol induzierte Suppression der LPS-stimulierten TNF- α Produktion von Blutmonozyten aufzuzeigen.

Obwohl sich die bisher dargestellten Ergebnisse der verschiedenen Arbeitsgruppen hauptsächlich auf die TNF- α Produktion in Monozyten und Makrophagen beziehen, lassen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit auch einen indirekten immunsupprimierenden Ethanoleffekt auf die Anzahl Zytokin produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Milz-Lymphozyten vermuten. Dieser spiegelt sich in einer signifikanten Verminderung der TNF- α produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ Milz-T-Lymphozyten nach Infektion mit *K. pneumoniae* wider.

Die Folgen einer Verminderung dieses proinflammatorischen Zytokins sind in mehreren Studien untersucht. So wurde durch die Hemmung von TNF- α z.B. durch TNF- α -Antikörper in mehreren tierexperimentellen Studien gezeigt, dass die Herunterregulierung von TNF- α im Serum, Gewebe und den Immunzellen negative Auswirkungen auf die Immunantwort und -abwehr hat [62, 67, 134]. In diesem Zusammenhang sei unter anderem die verminderte Rekrutierung von Neutrophilen ins entzündliche Gewebe genannt. Die Verminderung des Zytokins führte zu einer gestörten pulmonalen Abwehr bei bestehender bakterieller Pneumonie und war mit einer geringeren Überlebensrate der Tiere verbunden. Laichalk et al. [67] gelang es nachzuweisen, dass es nach intraperitonealer Gabe eines löslichen TNF- α Rezeptorantikörpers nicht zu der wie bei Kontrolltieren beschriebenen Neutrophilenanreicherung in der Bronchiallavage kam. Dies führte zu einem signifikant höherem Wachstum der zuvor inokulierten *K. pneumoniae* in Lungen und Serum der mit TNF- α Rezeptorantikörper behandelten CBA/J Mäuse.

Die Bedeutung von TNF- α bei der Bekämpfung pulmonaler Pathogene konnten auch Moore et al. [90] durch die Ergebnisse an ihrem murinen Infektionsmodell aufzeigen. So waren in Tumornekrosefaktorrezeptor-1-defizienten Mäuse geringe TNF- α Spiegel zu verzeichnen, die mit einer erhöhten Mortalität nach bakterieller Infektion und in den ersten postinfektiösen Tagen mit einem gesteigerten intrapulmonalen bakteriellen Wachstum verbunden waren. Diese Daten unterstreichen die besondere Bedeutung von TNF- α in der pulmonalen Abwehr und

verdeutlichen die gravierenden Folgen für den Organismus im Falle einer Reduzierung der TNF- α Produktion beispielsweise durch eine vorangehende Ethanolexposition.

Die Herunterregulierung TNF- α produzierender T-Lymphozyten präoperativ alkoholisierter Mäuse könnte somit eine mögliche Ursache für den ausgeprägteren Verlauf der Infektion bei diesen Tieren sein. Obwohl sich Ergebnisse aus Tierversuchen stets nur mit größtem Vorbehalt auf den Menschen übertragen lassen, könnte spekuliert werden, dass ein ähnlicher Mechanismus auch beim Menschen eine mögliche Ursache für die erhöhte Infektanfälligkeit und die fulminanten Verläufe pulmonaler Infektionen alkoholkranker Patienten ist. Diese Hypothese muss jedoch am Menschen experimentell überprüft werden.

5.2.2 IFN- γ produzierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten

Ein immunsupprimierender Effekt von Ethanol bei gleichzeitig bestehender *K. pneumoniae* Infektion konnte auch anhand der IFN- γ produzierenden T-Zellen nachgewiesen werden. Nach Infektion mit *K. pneumoniae* bei präoperativ durchgeführter Ethanolbehandlung ließ sich eine signifikante Verminderung der IFN- γ produzierenden T-Zellen nachweisen. Im Gegensatz zu den TNF- α produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen war dieser immunsupprimierende Effekt allerdings auf die Anzahl der IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Zellen beschränkt. Im Vergleich dazu war die Gesamtpopulation der IFN- γ produzierenden CD8⁺ T-Zellen nicht beeinträchtigt.

Einige Arbeitsgruppen haben einen immunmodulatorischen Einfluss einer sieben- bis zehntägigen Ethanolgabe auf die zellvermittelte Immunität nachgewiesen [55, 114]. Dabei schädigt Ethanol vor allem die T_H1-vermittelte Immunantwort und senkt die damit assoziierte INF- γ Produktion [70, 143, 155]. Starckenburg et al. [128] fanden bereits nach fünftägiger oraler Ethanolgabe eine Verminderung der IFN- γ Ausschüttung von T-Zellen.

Zusätzlich zur beschriebenen Ethanolwirkung kann auch durch einen operativen Eingriff die zelluläre Immunantwort durch die verminderte IFN- γ Produktion und die gesenkte T_H1/T_H2-Ratio supprimiert werden [9, 28, 100]. Inwiefern der durch die mediane Laparotomie ausgelöste Stress in dem hier etablierten Modell das Immunsystem der Balb/c-Mäuse verändert, bleibt unklar und sollte auch nicht Gegenstand dieser Arbeit sein. Ziel war es, die in der Klinik häufig anzutreffende Situation einer postoperativen Pneumonie bei präoperativ stattgehabtem Alkoholkonsum möglichst genau nachzuempfinden, um den Einfluss der Zytokin produzierenden T-Zellen in diesem Zusammenhang zu beobachten. Obwohl Ergebnisse aus klinischen Studien mit menschlichen Probanden nur unter Vorbehalt auf tierexperimentelle Stu-

dien übertragbar sind, könnte für den murinen Organismus ein synergistischer immunsupprimierender Effekt von Ethanol und Operation, wie dies beispielsweise in der klinischen Studie von Spies et al. [125] an chronisch alkoholkranken Patienten beschrieben wurde, vermutet werden. Eine erhöhte Infektanfälligkeit als Folge dieses immunsupprimierenden Einflusses scheint möglich.

Bei Auftreten einer pulmonalen Infektion spielt die T_{H1} -vermittelte Immunantwort und damit auch die Sekretion von $IFN-\gamma$ eine große Rolle. In Bezug auf die Bedeutung von $IFN-\gamma$ während pulmonaler Infekte zeigten Moore et al. [91], dass eine intratracheale Inokulation von *K. pneumoniae* bei $IFN-\gamma$ knock-out Mäusen zu einem um das 100-fache gesteigerten bakteriellen Wachstum in Lungen der infizierten Tiere führte. Im Zusammenhang damit stand eine erhöhte Mortalität dieser Tiere im Vergleich zu ebenfalls infizierten Mäusen vom Wildtyp. Zisman et al. [155] wiesen nach 14-tägiger oraler Alkoholdiät eine Verminderung der $IFN-\gamma$ Expression in Lungen der infizierten Mäuse nach. Damit verbunden waren eine verringerte Bekämpfung der inokulierten Bakterien und eine erhöhte Mortalität der Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Lanzke et al. [68] gelang es ebenfalls einen immunsupprimierenden Effekt nach achttägiger, intraperitonealer Ethanolinjektion in Verbindung mit einer durch *K. pneumoniae* induzierten Pneumonie nachzuweisen. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der durchflusszytometrisch ermittelten Anzahl $IFN-\gamma$ produzierender $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Lymphozyten. Histologisch auffällig war eine stärker entzündlich veränderte Lungenarchitektur im Vergleich zu Kontrolltieren, denen vor Infektion intraperitoneal Kochsalz injiziert wurde. Möglicherweise lag dies an einer gestörten Abwehr der inokulierten Bakterien nach Ethanol induzierter Immunsuppression wie auch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen bestätigten [91, 155].

Die Daten der vorliegenden Arbeit unterstreichen ebenfalls einen immunsupprimierenden Ethanoleffekt, der allerdings auf die $IFN-\gamma$ produzierenden $CD4^+$ T-Zellen beschränkt blieb. Die leicht erhöhte Anzahl der $IFN-\gamma$ produzierenden $CD8^+$ T-Lymphozyten lässt sich möglicherweise durch eine kompensatorische Übernahme der $IFN-\gamma$ Produktion durch diese T-Zellpopulation erklären. Durch die damit verbundene kompensatorische Erhöhung der $IFN-\gamma$ produzierenden $CD8^+$ T-Lymphozyten zeigt sich ein immunsupprimierender Ethanol-effekt bei dieser Zellpopulation nicht. Kolls et al. [61] zeigten an $CD4^+$ defizienten, infizierten Mäusen, dass $CD8^+$ T-Zellen im Rahmen einer Infektion die $IFN-\gamma$ Produktion und somit die effiziente Bekämpfung der Keime in der Lunge übernehmen.

Eine weitere mögliche Erklärung für die verminderte Anzahl der IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Zellen wäre, dass diese Zytokin produzierende T-Zellpopulation im Rahmen einer Klebsielleninfektion beispielsweise durch ihre Oberflächenstrukturen, kostimulatorische Faktoren oder spezifischen Aktivierungsvorgänge stärker durch eine Ethanolbehandlung beeinträchtigt wird. Vor diesem Hintergrund ließe sich die in dieser Untersuchung dargestellte Verminderung IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten bei unveränderter Anzahl IFN- γ produzierender CD8⁺ T-Zellen erklären. In mehreren Studien konnte eine stärkere Beeinflussung von CD4⁺ T-Lymphozyten durch eine Ethanolgabe aufgezeigt werden. So gelang es Barve et al. [7] und Hote et al. [50] eine alkoholinduzierte Apoptose von CD4⁺ T-Lymphozyten nachzuweisen.

Trotz möglicher kompensatorischer Übernahme der IFN- γ Produktion durch CD8⁺ T-Lymphozyten scheint die für die Bekämpfung der inokulierten *K. pneumoniae* notwendigen T_H1-vermittelte Immunantwort (CD4⁺ vermittelt) durch die intraperitonealen Ethanolgaben supprimiert. Da CD4⁺ T-Lymphozyten im Rahmen der Abwehr bakterieller Pathogene besondere Funktionen übernehmen [52], lässt ihr Fehlen eine Schädigung des Organismus vermuten. Hess et al. [48] wiesen auf die besondere Bedeutung von CD4⁺ T-Lymphozyten und deren Oberflächen-MHC II-Molekülen bei der Immunantwort auf *Salmonella typhimurium* hin. Der Verlust von CD4⁺ T-Lymphozyten führte zu einer gesteigerten Mortalität und einer erhöhten bakteriellen Belastung nach Infektion. Im Vergleich dazu hatte der Verlust der CD8⁺ T-Zellen eine geringere Auswirkung auf die Immunität [80].

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse kann vermutet werden, dass die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene verminderte Anzahl der IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Zellen nachhaltige Auswirkungen auf die Immunantwort des murinen Organismus auf die inokulierten Bakterien hat. Obwohl sich Ergebnisse aus Tierversuchen stets nur mit größter Vorsicht auf den Menschen übertragen lassen, könnte spekuliert werden, dass die Verminderung der IFN- γ produzierenden CD4⁺ T-Zellen auch beim Menschen eine mögliche Ursache für die erhöhte Infektanfälligkeit und die fulminanten Verläufe pulmonaler Infektionen alkoholkranker Patienten ist. Dabei handelt es sich jedoch um eine Hypothese, die keinesfalls allgemeingültig ist und einer experimentellen Prüfung am Menschen bedarf.

5.2.3 Histologische und mikrobiologische Veränderungen

Im Rahmen einer Infektion haben sowohl die durch die Ethanolgabe supprimierte T_H1-vermittelte Immunantwort als auch die Verminderung von TNF- α eine Vielzahl von negativen Auswirkungen [48, 90, 91, 92]. Eine operative Intervention bedeutet zusätzlichen Stress für den Organismus [75]. Die Suppression der Zytokinproduktion führt zu einer erhöhten Mortalität der Versuchstiere [66, 67, 88, 127] und zu einer verminderten Abwehr der eingedrungenen Pathogene. Dies äußert sich beispielsweise in einem erhöhten intrapulmonalen bakteriellen Wachstum [66, 67] und einer Dissemination der Bakterien in die Blutbahn im Sinne einer septischen Reaktion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Aussage, dass eine Alkoholgabe *prae infectionem* entscheidend die Immunlage der Versuchstiere beeinflusst und damit auch die Abwehr von Pathogenen und das Gesamtbefinden stört. Obwohl in dieser Arbeit keine Aussage zu einer erhöhten Mortalität der Versuchstiere nach Infektion und Ethanolgabe getroffen werden kann, so ist festzuhalten, dass es den Balb/c-Mäusen unter Klebsielleninfektion und Ethanolgabe körperlich deutlich schlechter erging als den mit Kochsalz und *K. pneumoniae* behandelten Tieren.

Die erhöhte körperliche Belastung des murinen Organismus bei bestehender Klebsiellenpneumonie zeigte sich zum einen in einer vermehrten Gewichtsabnahme [34], zum anderen in erhöhten Werten bei der Erhebung des klinischen Scores. Interessanterweise ergaben sich die Scorepunkte alkoholisierter, infizierter Balb/c-Mäuse häufiger aus dem insgesamt seltener beobachteten Parameter Sekretion. Dazu zählte beispielsweise die Sekretion aus der Operationswunde, die ausschließlich bei Balb/c-Mäusen nach Ethanolbehandlung und Infektion mit *K. pneumoniae* beobachtet wurde. Die einzelnen Stufen und der Erfolg der Wundheilung sind unter anderem von einer intakten Immunabwehr abhängig [138], die nach intraperitonealer Ethanolgabe und nachfolgender Infektion geschädigt war, wie die Ergebnisse dieser Arbeit in Form einer Verminderung der Zytokin produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ Milz-T-Lymphozyten zeigten.

Mikrobiologisch ließ sich als Ausdruck der stattgehabten Klebsielleninfektion neben einer Dissemination der inokulierten *K. pneumoniae* in die Blutbahn [57] auch eine intrapulmonale Zunahme der initial applizierten Infektionsmenge von 10⁴ KBE *K. pneumoniae* nachweisen. Ein Zusammenhang mit der Ethanolbehandlung konnte nicht gezeigt werden. Die Anzahl Kolonie bildender Einheiten in Lungen nach Klebsielleninfektion unterschied sich in Tieren nach Alkoholbehandlung kaum von der in Tieren nach intraperitonealer Kochsalzinjektion.

Obwohl 24 Stunden *post infectionem* bereits Veränderungen in der Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender CD4⁺ und CD8⁺ Milz-T-Lymphozyten durch Ethanolgabe bei gleichzeitiger Klebsiellenpneumonie eingetreten waren, so scheint der Beobachtungszeitraum und möglicherweise auch die Dauer der Alkoholgabe nicht ausreichend, um die Folgen dieser Immunsuppression in Form eines vermehrten intrapulmonalen bakteriellen Wachstums nachzuweisen. Zisman et al. [155] gelang es beispielsweise 48 Stunden nach intratrachealer Applikation von 10² KBE *K. pneumoniae* und 14tägiger Ethanoldiät ein signifikant erhöhtes bakterielles Wachstum im Vergleich zu Kontrolltieren nachzuweisen.

Ergänzend zu den mikrobiologischen Untersuchungen konnten spezifische histologische Veränderungen in der Lungenstruktur der infizierten Tiere nachgewiesen werden [68]. Die intranasale Applikation von *K. pneumoniae* führte zu einer Veränderung des Lungengewebes im Sinne einer Pneumonie mit ausgeprägter Leukozyteninfiltration. Unter Ethanolbehandlung war diese entzündliche Veränderung des Lungengewebes stärker ausgeprägt. Dies ist ein Hinweis, dass die Fähigkeit des murinen Organismus, *K. pneumoniae* zu bekämpfen, unter Ethanoleinfluss gestört ist. Ursächlich bei der gestörten Immunantwort auf die inokulierten Bakterien scheinen unter anderem die in dieser Untersuchung gesehene Verminderung TNF- α und IFN- γ produzierender T-Zellen zu sein, durch deren Beeinflussung zwei essentielle Zytokine in der Abwehr von *K. pneumoniae* reduziert sind.

5.3 Methodendiskussion

5.3.1 OP-Modell

Das operative Modell zeichnete sich durch eine sichere, gut erlernbare Handhabung aus. Es kann standardisiert durchgeführt werden und wurde bereits in mehreren Forschungsgruppen angewandt [58, 150]. Die Durchführung einer medianen Laparotomie mit Durchtrennung des Peritoneums und Mobilisation des linken Leberlappens entsprach einem kurzen, schwerwiegenden operativen Eingriff, der erheblichen körperlichen Stress induziert [30]. Eine Beeinflussung des murinen Immunsystems ist anzunehmen.

In dem hier dargestellten murinen operativen Infektionsmodell erfolgte die Alkoholgabe über acht Tage intraperitoneal, um eine gleichmäßige Ethanolkonzentration in den Versuchstieren und damit eine bessere Vergleichbarkeit der Untersuchungsergebnisse zu gewährleisten. In der Literatur wird eine Vielzahl von Modellen der Ethanolgabe diskutiert, die sich in der Verabreichung und Applikationsdauer unterscheiden. Es wurden unter anderem akute und chronische Modelle sowie eine orale als auch intraperitoneale Ethanolgabe dargestellt. Bei den chro-

nischen Modellen waren Einnahmedauern von 5 Tagen [84] bis 13 Wochen [118] beschrieben. Kürzere bzw. einmalige Alkoholgaben intraperitoneal oder oral bezeichnete man als akut [84].

In diesem etablierten operativen Infektionsmodell wurde Ethanol über acht Tage appliziert. Die hochdosierte Alkoholgabe über einen Zeitraum von acht Tagen entsprach eher einem chronischen Modus. Intention dieser Dauer der Alkoholgabe war es, frühe alkoholbedingte Leberschäden in Form von Steatosis hepatis, Entzündungszeichen und fokalen Nekrosen zu vermeiden. Diese Veränderungen an der Leber zeigen sich nach etwa vierwöchiger Alkoholgabe [139]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass keine Leber- oder andere Organschäden aufgetreten waren, aber das Immunsystem bereits beeinflusst wurde [56, 128].

In durchgeführten histologischen Untersuchungen konnte die Leber ohne chronisch alkoholtoxische Veränderungen im Sinne einer Steatosis hepatis oder Fibrosierung dargestellt werden. Eine achttägige intraperitoneale Ethanolgabe scheint demzufolge eine optimale Behandlungsdauer zur Vermeidung von alkoholbedingten Leberschäden zu sein.

Zur Verabreichung der Ethanoldosis wurde in diesem operativen Infektionsmodell die intraperitoneale Gabe favorisiert. Diese Applikationsart gewährleistete im Vergleich zu einer oralen Alkoholdiät eine stets gleiche Ethanolkonzentration in den Tieren und führte so zu einer besseren Vergleichbarkeit. Festzuhalten ist, dass das Modell einer achttägigen intraperitonealen Ethanolgabe zur Untersuchung der Immunsuppression nach Induktion einer Pneumonie durch *K. pneumoniae* geeignet ist.

Nach achttägiger Kochsalz- bzw. Ethanolapplikation dienten die Milzen der Balb/c-Mäuse zur Probengewinnung für die durchflusszytometrische Untersuchung. Durch die intraperitoneale Applikation konnte von einer systemischen Wirkung des Ethanols ausgegangen werden, die auch immunmodulatorische Effekte auf die Immunzellen der Milz hatte. Es wurde beschrieben, dass alkoholranke Patienten vermehrt von Infektionen, insbesondere der Pneumonie im postoperativen Verlauf betroffen sind. Obwohl Trachea und Lunge Eintrittspforte und Ort der Entzündung [22, 43, 44, 74, 129] bei Auftreten einer Pneumonie sind, ist die Milz als sekundär lymphatisches Organ ebenfalls in die inflammatorische Immunantwort involviert und zudem von der immunmodulatorischen Wirkung des Ethanols im Zusammenhang mit einer Infektion betroffen.

Einerseits zirkulieren mit Antigen beladene AgPC in die Milz und kommen dort in Kontakt mit den T-Lymphozyten [52, 103], andererseits deutete der Nachweis einer Bakteriämie, wie auch in der vorliegenden Untersuchung beschrieben, auf eine systemische Klebsielleninfek-

tion hin, für deren Bekämpfung alle Immunzellen des Körpers mobilisiert werden. Obwohl es sich bei der induzierten Klebsiellenpneumonie um einen scheinbar lokalisierten Entzündungsvorgang handelte, rechtfertigen diese Tatsachen die durchflusszytometrische Untersuchung der Milz. Für weiterführende Experimente könnte jedoch zusätzlich die Beeinflussung der Zytokinproduktion in T-Lymphozyten der Lunge unter Ethanolgabe bzw. Kombination von Ethanol und intranasaler Applikation von *K. pneumoniae* untersucht und diskutiert werden.

Zur Beurteilung des körperlichen Befindens der Tiere wurde am Tötungstag ein klinischer Score erhoben, bei dem für die Parameter Sekretion, Piloerektion und Motorik Punktwerte von null bis zwei vergeben wurden. Problematisch war, dass zur Auswertung dieses Scores die Summe aus allen drei Parametern gebildet wurde, ohne dabei die Gewichtung der einzelnen Eigenschaften zu beachten. Eine Gesamtpunktzahl von zwei konnte sich beispielsweise aus zwei Punkten für Piloerektion beim Tier 1 oder aber aus zwei Punkten für Sekretion beim Tier 2 zusammensetzen. Die Tiere reagierten bei Stress, unter anderem verursacht durch Berührung beim Umsetzen in einen anderen Käfig, sehr schnell mit der Aufrichtung ihres Felles (Piloerektion). Zusätzlich führt physischer und psychischer Stress zu einer Vernachlässigung der Fellpflege, so dass der Parameter „Piloerektion“ häufig mit zwei Punkten bewertet wurde. Im Gegensatz dazu wurde die Sekretion aus Nase, After oder Wunde selten mit zwei Punkten bewertet und zeigte eine deutliche Verschlechterung des Allgemeinbefindens eines Tieres an. Tieren mit geringeren Scorepunkten musste es somit nicht in jedem Fall besser gehen.

Anhand des vorgenannten Beispiels wird deutlich, dass eine unterschiedliche Gewichtung der drei Parameter Piloerektion, Sekretion und Motorik empfehlenswert wäre. Aufgrund der fehlenden Ansätze für die Ermittlung von Wichtungsfaktoren wurde allerdings im Rahmen dieser Untersuchung auf unterschiedliche Gewichtung der drei Parameter verzichtet.

5.3.2 Infektionsmodell

Durch Etablierung dieses operativen Infektionsmodells sollte es ermöglicht werden, die synergistische immunmodulatorische Wirkung von Ethanol und operativer Intervention nach induzierter Pneumonie zu beobachten. In dem beschriebenen Modell wurde *K. pneumoniae* verwendet, da dieses Bakterium zu den häufigsten Erregern nosokomialer Pneumonien zählt [75]. Insbesondere alkoholranke Patienten haben ein erhöhtes Risiko, an einer Klebsiellenpneumonie zu erkranken und zu versterben [155].

In der Literatur wurde neben intranasaler [68] und –trachealer [91] auch die intravenöse Applikation von Bakterien zur Induktion einer lokalisierten bzw. generalisierten Infektion be-

schrieben. Zur Infektion der Tiere wurde in dem vorliegenden Modell die intranasale gegenüber der intratrachealen Applikation bevorzugt, um ein zusätzliches Trauma durch Tracheotomie zu vermeiden und somit eine mögliche Fehlerquelle durch additive immunmodulatorische Wirkung auszuschließen. Durch die Narkotisierung der Tiere vor Infektion und Ausschalten des Schluckreflexes konnte auch bei intranasaler Applikation eine ausreichende Infektionsmenge inokuliert werden. Dies unterstreichen die exemplarisch durchgeführten mikrobiologischen und histologischen Untersuchungen der infizierten Lungen, in denen neben einer Keimzahlvermehrung auch histopathologische Veränderungen im Sinne einer Pneumonie nachgewiesen wurden. Zusätzlich bestätigt der Nachweis von *K. pneumoniae* in der Blutbahn die Wirksamkeit der intranasalen Applikation.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein gesteigertes intrapulmonales Keimwachstum nach Inokulation von *K. pneumoniae* und vorangegangener Ethanolexposition nachgewiesen werden. Da das intrapulmonale Keimwachstum scheinbar vom Beobachtungszeitraum *post infectionem* und der Dauer der Alkoholgabe abhängig ist [155], könnte für nachfolgende mikrobiologische Untersuchungen ein verlängertes Beobachtungsintervall *post infectionem* gewählt werden, um die Folgen einer Ethanol induzierten Immunsuppression in Form eines verstärkten intrapulmonalen bakteriellen Wachstums nachzuweisen.

5.3.3 Durchflusszytometrische Untersuchung

Bisher existieren wenige Veröffentlichungen, die sich mit dem Zytokinprofil von Milz-T-Lymphozyten bei operativem Stress, induzierter Infektion und/oder vorheriger Ethanolgabe auseinandersetzen. Dies ist die erste tierexperimentelle Untersuchung, die diese drei Komponenten vereint und deren Einfluss auf TNF- α und IFN- γ produzierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten beschreibt. Die FACS-Untersuchung ist dafür eine gut geeignete und spezifische Methode. Mit Hilfe der Antikörpermarkierungen wurden spezifisch TNF- α und IFN- γ produzierende T-Zellen mit den Oberflächenmarkern CD4 und CD8 erfasst. Bei Untersuchung des Zytokinserumlevel beispielsweise mittels ELISA bleibt die zelluläre Herkunft des gemessenen Zytokins unbekannt. Es ist jedoch auch bei der Durchflusszytometrie möglich, dass die Stimulation mit PMA und Ionomycin *in vitro* nicht exakt das *in vivo* Verhalten der T-Lymphozyten widerspiegelt. Die Vergleichbarkeit von Arbeiten bezüglich quantitativer Zytokinanalysen ist häufig durch abweichende Studienprotokolle erschwert. Beispielsweise werden unterschiedliche Methoden verwandt, die die Zytokinproduktion im Serum einerseits oder die intrazelluläre Zytokinproduktion andererseits erfassen sowie die Verwendung unterschiedlicher Zellstimuli und Stimulationszeiten beschreiben.

In der vorliegenden Arbeit wurden nach Stimulation mit PMA und Ionomycin eine Verminderung TNF- α und IFN- γ produzierender T-Lymphozyten der Milz 24 Stunden nach Induktion einer Klebsiellenpneumonie bei präoperativer Ethanolgabe über acht Tage nachgewiesen. Für nachfolgende Untersuchungen wäre es interessant, ob sich der in dieser Arbeit nachgewiesene Ethanoleffekt auch nach verlängertem Beobachtungszeitraum *post infectionem*, beispielsweise sieben Tage nach Induktion einer Klebsiellenpneumonie, aufzeigen lässt. Neben der durchflusszytometrischen Analyse der antigenspezifischen Zytokinproduktion [60] und der Messung der quantitativen Zytokinmenge empfiehlt sich die Untersuchung weiterer T-Zellfunktionen wie der T-Zellproliferation und T-Zellaktivierung und deren Beeinflussung durch eine Ethanolgabe.

5.4 Schlussfolgerungen und Ausblick

Durch Etablierung dieses operativen Infektionsmodells ist es gelungen, ein Modell zu entwickeln, das die immunmodulatorische Wirkung von Ethanol und operativer Intervention nach intranasaler Infektion mit *K. pneumoniae* vereint. Obwohl dieses Modell sich ausschließlich auf acht bis zwölf Wochen alte, weibliche Balb/c-Mäuse bezieht, scheint es ein möglicher Ansatz zu sein, die sich bei Patienten im Klinikalltag häufig darstellende Situation eines präoperativen Alkoholkonsums näherungsweise nachzuempfinden. Da es sich jedoch lediglich um ein tierexperimentelles Modell handelt, können die Ergebnisse dieser Arbeit nicht ohne weiteres auf den Menschen übertragen werden.

Es konnte aufgezeigt werden, dass eine ausschließliche Ethanolbehandlung im Rahmen dieser Arbeit keinen Einfluss auf die Anzahl der Zytokin produzierenden CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten hatte. Es ist dennoch anzunehmen, dass elementare Vorgänge der angeborenen Immunität wie beispielsweise die Antigenpräsentation vorgeschädigt wurden. Dadurch scheint eine Beeinflussung und Suppression der für eine adäquate Pathogenabwehr notwendigen Abläufe der spezifischen Immunität wie T-Zellaktivierung, Zytokinproduktion und Entwicklung einer Gedächtnisreaktion möglich, deren Untersuchung allerdings nicht Gegenstand dieser Arbeit war.

Im Rahmen der durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten sich diese durch Ethanol hervorgerufenen Defizite bei gleichzeitigem Auftreten einer Klebsielleninfektion. Es konnte eine deutliche Verminderung der TNF- α und IFN- γ produzierenden T-Zellen nachgewiesen werden. Da beide Zytokine eine wichtige Bedeutung im Rahmen der pulmonalen Abwehr haben, wäre ein Zusammenhang zwischen der Herunterregulation der TNF- α und IFN- γ pro-

duzierenden T-Zellen und den in der vorliegenden Arbeit aufgezeigten mikrobiologischen und histopathologischen Veränderungen denkbar. Zur endgültigen Klärung dieser Hypothese müssten Untersuchungen folgen, die beispielsweise den Verlauf von Pneumonie präoperativ alkoholisierter Mäuse nach Gabe eines TNF- α Agonisten beobachten.

Die gewonnenen Ergebnisse lassen vermuten, dass T-Lymphozyten und deren TNF- α und IFN- γ Produktion bei der gesteigerten Infektanfälligkeit und im Verlauf postoperativ erworbener nosokomialer Infektionen eine bedeutende Rolle spielen. Scheinbar ist die verminderte Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender T-Lymphozyten nach Ethanolgabe und Klebsielleninfektion ursächlich für den schweren Verlauf der Pneumonie mit histologisch nachweisbarer stärkerer Schädigung der Lungenarchitektur. Denkbar wäre ein Zusammenhang mit der erhöhten Mortalität nach operativer Intervention und postoperativen Komplikationen wie beispielsweise der Pneumonie. Unklar bleibt allerdings, inwiefern TNF- α und IFN- γ als mögliche prognostische Marker genutzt werden sollten, um postoperativ auftretende Komplikationen frühzeitig erkennen, verhindern und damit die Mortalität senken zu können.

Inwiefern und ob prognostische Marker und therapeutische Interventionen die Immunlage verbessern und den schweren Verlauf einer nosokomialen Pneumonie mildern können, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Um die zugrunde liegenden Mechanismen der Immunsuppression besser verstehen zu können, sollten weitere Untersuchung auf T-Zellebene auf der Grundlage dieses Modells erfolgen. Beispielsweise könnten weitere T-Zellfunktionen wie Proliferation und Aktivierung, aber auch die Interaktion der T-Zellen mit AgPC betrachtet werden. Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, den Pathomechanismus der durch Alkohol und operativen Stress hervorgerufenen Immunsuppression weiter zu verstehen und möglicherweise gezielte prä-, peri- oder postinterventionelle Therapiekonzepte abzuleiten.

6. Zusammenfassung

Alkoholranke Patienten haben ein erhöhtes Risiko, im postoperativen Verlauf eine Pneumonie zu entwickeln und daran zu versterben. Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) und Interferon-gamma (IFN- γ) sind zwei proinflammatorische Zytokine, die große Bedeutung bei der Immunantwort während einer Infektion mit *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) haben. Es ist bekannt, dass sowohl der Konsum von Alkohol als auch ein operativer Eingriff immunsuppressive Folgen haben. Bisher gibt es jedoch kein geeignetes Modell, das die immunmodulatorische Wirkung dieser beiden Komponenten vereint und die Folgen auf eine postoperativ induzierte Pneumonie betrachtet. Um den Einfluss einer achttägigen intraperitonealen Alkoholgabe und die Durchführung einer medianen Laparotomie auf das Immunsystem zu untersuchen, wurde die Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender Milz-T-Lymphozyten in einem murinen Modell einer gramnegativen Pneumonie analysiert.

Fünfzig weibliche Balb/c-Mäuse wurden über acht Tage mit intraperitonealen Kochsalz- oder Ethanolinjektionen behandelt. Nach Durchführung einer medianen Laparotomie mit Mobilisation des linken Leberlappens am achten Tag, erfolgte am zweiten postoperativen Tag bei der Hälfte der Tiere jeder Gruppe eine intranasale Applikation von *K. pneumoniae*. Es erfolgten regelmäßige Gewichtskontrollen sowie die Bewertung der körperlichen Befindlichkeit anhand eines klinischen Scores. Nach 24 Stunden wurden die Mäuse getötet, Lunge und Leber zur histologischen und mikrobiologischen Untersuchung entnommen und die Milzen zur Zellisolation vorbereitet. Die Anzahl IFN- γ und TNF- α produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten wurden durchflusszytometrisch bestimmt.

Mäuse nach Infektion mit *K. pneumoniae* und Ethanolbehandlung zeigten eine signifikant verminderte Anzahl TNF- α produzierender CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten sowie IFN- γ produzierender CD4⁺ T-Lymphozyten im Vergleich zu Mäusen, denen Kochsalz injiziert wurde. Die histologische Untersuchung wies einen deutlich schwereren Verlauf der *K. pneumoniae*-induzierten Pneumonie in mit Alkohol behandelten Mäusen nach. Damit einher gingen eine deutliche Gewichtsabnahme und höhere Scorepunkte dieser Tiere, die die Belastung des murinen Organismus unterstrichen.

Es ist gelungen, ein operatives, murines Infektionsmodell zu etablieren, mit dem die in der Klinik häufig anzutreffende Situation einer postoperativen Pneumonie bei präoperativ stattgehabtem Alkoholkonsum möglichst nah nachempfunden werden konnte. Als wesentliches Ergebnis dieser Arbeit zeigte sich nach Behandlung von Balb/c-Mäusen mit Ethanol und Infek-

tion mit *K. pneumoniae* eine Verminderung der Anzahl TNF- α und IFN- γ produzierender T-Lymphozyten. Diese Immunsuppression war mit verstärkten histologischen Schäden der Lunge vergesellschaftet. Scheinbar tragen T-Lymphozyten durch ihr inadäquat sezerniertes Zytokinmuster zur Unterhaltung und Entstehung einer Klebsiellenpneumonie bei. Inwiefern dies auf die Gegebenheiten in der Klinik übertragbar ist und sich daraus mögliche Therapiekonzepte ableiten lassen, könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Literaturverzeichnis

- [1] Ahluwalia, B. S.; Westney, L. S.; Rajguru, S. U. (1995): Alcohol inhibits cell mitosis in G2-M phase in cell cycle in a human lymphocytes in vitro study. *Alcohol*: Band 12, Nr. 6, Seite 589-592
- [2] Allendorf, J. D.; Bessler, M.; Whelan, R. L.; Trokel, M.; Laird, D. A.; Terry, M. B.; Treat, M. R. (1997): Postoperative immune function varies inversely with the degree of surgical trauma in a murine model. *Surg.Endosc.*: Band 11, Nr. 5, Seite 427-430
- [3] Aloman, C.; Gehring, S.; Wintermeyer, P.; Kuzushita, N.; Wands, J. R. (2007): Chronic Ethanol Consumption Impairs Cellular Immune Responses Against HCV NS5 Protein Due to Dendritic Cell Dysfunction. *Gastroenterology*: Band 132, Nr. 2, Seite 698-708
- [4] Andoh, M.; Zhang, G.; Russell-Lodrigue, K. E.; Shive, H. R.; Weeks, B. R.; Samuel, J. E. (2007): T cells are essential for bacterial clearance, and gamma interferon, tumor necrosis factor alpha, and B cells are crucial for disease development in *Coxiella burnetii* infection in mice. *Infect.Immun.*: Band 75, Nr. 7, Seite 3245-3255
- [5] Angele, M. K.; Faist, E. (2002): Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit Care*: Band 6, Nr. 4, Seite 298-305
- [6] Banchereau, J.; Briere, F.; Caux, C.; Davoust, J.; Lebecque, S.; Liu, Y. J.; Pulendran, B.; Palucka, K. (2000): Immunobiology of dendritic cells. *Annu.Rev.Immunol.*: Band 18, Seite 767-811
- [7] Barve, S. S.; Kelkar, S. V.; Gobejishvilli, L.; Joshi-Barve, S.; McClain, C. J. (2002): Mechanisms of alcohol-mediated CD4+ T lymphocyte death: relevance to HIV and HCV pathogenesis. *Front Biosci.*: Band 7, Seite d1689-d1696
- [8] Bergmann, E; Horch, K (2002): Kosten alkoholassoziierter Krankheiten. Schätzungen für Deutschland. *Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*
- [9] Berguer, R.; Bravo, N.; Bowyer, M.; Egan, C.; Knolmayer, T.; Ferrick, D. (1999): Major surgery suppresses maximal production of helper T-cell type 1 cytokines without potentiating the release of helper T-cell type 2 cytokines. *Arch.Surg.*: Band 134, Nr. 5, Seite 540-544
- [10] Black, R. A.; Rauch, C. T.; Kozlosky, C. J.; Peschon, J. J.; Slack, J. L.; Wolfson, M. F.; Castner, B. J.; Stocking, K. L.; Reddy, P.; Srinivasan, S.; Nelson, N.; Boiani, N.; Schooley, K. A.; Gerhart, M.; Davis, R.; Fitzner, J. N.; Johnson, R. S.; Paxton, R. J.; March, C. J.; Cerretti, D. P. (1997): A metalloproteinase disintegrin that releases tumor necrosis factor-alpha from cells. *Nature*: Band 385, Nr. 6618, Seite 729-733
- [11] Boutiba-Ben, Boubaker, I; Ben, Salah D.; Besbes, M.; Mahjoubi, F.; Ghozzi, R.; Ben, Redjeb S.; Ben, Hassen A.; Hammami, A. (2002): Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae*: multicenter study. *Tunis Med.*: Band 80, Nr. 1, Seite 26-28

- [12] Boyadjieva, N. I.; Dokur, M.; Advis, J. P.; Meadows, G. G.; Sarkar, D. K. (2002): Beta-endorphin modulation of lymphocyte proliferation: effects of ethanol. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 26, Nr. 11, Seite 1719-1727
- [13] Breuer, J. P.; Neumann, T.; Heinz, A.; Kox, W. J.; Spies, C. (2003): The alcoholic patient in the daily routine. *Wien.Klin.Wochenschr.*: Band 115, Nr. 17-18, Seite 618-633
- [14] Brodsky, J. A.; Brody, F. J.; Endlich, B.; Armstrong, D. A.; Ponsky, J. L.; Hamilton, I. A. (2002): MCP-1 is highly expressed in peritoneum following midline laparotomy with peritoneal abrasion in a murine model. *Surg.Endosc.*: Band 16, Nr. 7, Seite 1079-1082
- [15] Broug-Holub, E.; Toews, G. B.; van Iwaarden, J. F.; Strieter, R. M.; Kunkel, S. L.; Paine, R., III; Standiford, T. J. (1997): Alveolar macrophages are required for protective pulmonary defenses in murine *Klebsiella pneumoniae*: Elimination of alveolar macrophages increases neutrophil recruitment but decreases bacterial clearance and survival. *Infect.Immun.*: Band 65, Nr. 4, Seite 1139-1146
- [16] Bühringer, G., Augustin, R., Bergmann, E., Bloomfield, K., Funk, W., Junge, B., Kraus, L., Merfert-Diete, C., Rumpf, H.-J., Simon, R. & Töppich, J. (2000). Alkoholkonsum und alkoholbezogene Störungen in Deutschland. Schriftenreihe des Bundesministeriums für Gesundheit: Band 128, Nomos, Baden-Baden.
- [17] Carpenter, J. L. (1990): *Klebsiella* pulmonary infections: occurrence at one medical center and review. *Rev.Infect.Dis.*: Band 12, Nr. 4, Seite 672-682
- [18] Carswell, E. A.; Old, L. J.; Kassel, R. L.; Green, S.; Fiore, N.; Williamson, B. (1975): An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*: Band 72, Nr. 9, Seite 3666-3670
- [19] Chadha, K. C.; Stadler, I.; Albin, B.; Nakeeb, S. M.; Thacore, H. R. (1991): Effect of alcohol on spleen cells and their functions in C57BL/6 mice. *Alcohol*: Band 8, Nr. 6, Seite 481-485
- [20] Chen, G. J.; Huang, D. S.; Watzl, B.; Watson, R. R. (1993): Ethanol modulation of tumor necrosis factor and gamma interferon production by murine splenocytes and macrophages. *Life Sci.*: Band 52, Nr. 15, Seite 1319-1326
- [21] Chen, S. C.; Mehrad, B.; Deng, J. C.; Vassileva, G.; Manfra, D. J.; Cook, D. N.; Wiekowski, M. T.; Zlotnik, A.; Standiford, T. J.; Lira, S. A. (2001): Impaired pulmonary host defense in mice lacking expression of the CC chemokine lungkine. *J.Immunol.*: Band 166, Nr. 5, Seite 3362-3368
- [22] Cook, R. T. (1998): Alcohol abuse, alcoholism, and damage to the immune system-a review. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 22, Nr. 9, Seite 1927-1942
- [23] Cook, R. T.; Ballas, Z. K.; Waldschmidt, T. J.; Vandersteen, D.; LaBrecque, D. R.; Cook, B. L. (1995): Modulation of T-cell adhesion markers, and the CD45R and CD57 antigens in human alcoholics. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 19, Nr. 3, Seite 555-563

- [24] Cook, R. T.; Zhu, X.; Coleman, R. A.; Ballas, Z. K.; Waldschmidt, T. J.; Ray, N. B.; LaBrecque, D. R.; Cook, B. L. (2004): T-cell activation after chronic ethanol ingestion in mice. *Alcohol*: Band 33, Nr. 3, Seite 175-181
- [25] Craven, D. E.; Kunches, L. M.; Lichtenberg, D. A.; Kollisch, N. R.; Barry, M. A.; Heeren, T. C.; McCabe, W. R. (1988): Nosocomial infection and fatality in medical and surgical intensive care unit patients. *Arch.Intern.Med.*: Band 148, Nr. 5, Seite 1161-1168
- [26] D'Ambrosio, D.; Mariani, M.; Panina-Bordignon, P.; Sinigaglia, F. (2001): Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation. *Am.J.Respir.Crit Care Med.*: Band 164, Nr. 7, Seite 1266-1275
- [27] de Castro Cunha, R. M.; Kallas, E. G.; Rodrigues, D. S.; Nascimento, Burattini M.; Salomao, R. (2005): Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha production by CD4+ T and CD8+ T lymphocytes in AIDS patients with tuberculosis. *Clin.Exp.Immunol.*: Band 140, Nr. 3, Seite 491-497
- [28] Decker, D.; Schondorf, M.; Bidlingmaier, F.; Hirner, A.; von Ruecker, A. A. (1996): Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery*: Band 119, Nr. 3, Seite 316-325
- [29] Deepe, G. S., Jr.; Gibbons, R. S. (2006): T cells require tumor necrosis factor-alpha to provide protective immunity in mice infected with *Histoplasma capsulatum*. *J.Infect.Dis.*: Band 193, Nr. 2, Seite 322-330
- [30] DeKeyser, F. G.; Leker, R. R.; Weidenfeld, J. (2000): Activation of the adrenocortical axis by surgical stress: involvement of central norepinephrine and interleukin-1. *Neuroimmunomodulation.*: Band 7, Nr. 4, Seite 182-188
- [31] Deng, J. C.; Zeng, X.; Newstead, M.; Moore, T. A.; Tsai, W. C.; Thannickal, V. J.; Standiford, T. J. (2004): STAT4 is a critical mediator of early innate immune responses against pulmonary *Klebsiella* infection. *J.Immunol.*: Band 173, Nr. 6, Seite 4075-4083
- [32] Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen e.V. (2007): Daten und Fakten - Alkohol. URL: <http://www.dhs.de/web/datenfakten/alkohol.php>
- [33] Dinarello, C. A. (1997): Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest*: Band 112, Nr. 6 Suppl, Seite 321S-329S
- [34] Ebong, S.; Call, D.; Nemzek, J.; Bolgos, G.; Newcomb, D.; Remick, D. (1999): Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect.Immun.*: Band 67, Nr. 12, Seite 6603-6610
- [35] Ehlers, S. (2003): Role of tumor necrosis factor (TNF) in host defence against tuberculosis: implications for immunotherapies targeting TNF. *Ann.Rheum.Dis.*: Band 62 Suppl 2, Seite 37-42
- [36] Ewig, S.; Torres, A. (1999): Severe community-acquired pneumonia. *Clin.Chest Med.*: Band 20, Nr. 3, Seite 575-587

- [37] Frank, J.; Witte, K.; Schrod, W.; Schutt, C. (2004): Chronic alcoholism causes deleterious conditioning of innate immunity. *Alcohol Alcohol*: Band 39, Nr. 5, Seite 386-392
- [38] Fujiwara, T.; Oda, K.; Yokota, S.; Takatsuki, A.; Ikehara, Y. (1988): Brefeldin A causes disassembly of the Golgi complex and accumulation of secretory proteins in the endoplasmic reticulum. *J.Biol.Chem.*: Band 263, Nr. 34, Seite 18545-18552
- [39] Fuxench-Lopez, Z.; Ramirez-Ronda, C. H. (1978): Pharyngeal flora in ambulatory alcoholic patients: prevalence of gram-negative bacilli. *Arch.Intern.Med.*: Band 138, Nr. 12, Seite 1815-1816
- [40] Gentilello, L. M.; Rivara, F. P.; Donovan, D. M.; Jurkovich, G. J.; Daranciang, E.; Dunn, C. W.; Villaveces, A.; Copass, M.; Ries, R. R. (1999): Alcohol interventions in a trauma center as a means of reducing the risk of injury recurrence. *Ann.Surg.*: Band 230, Nr. 4, Seite 473-480
- [41] Gosselin, D.; DeSanctis, J.; Boule, M.; Skamene, E.; Matouk, C.; Radzioch, D. (1995): Role of tumor necrosis factor alpha in innate resistance to mouse pulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect.Immun.*: Band 63, Nr. 9, Seite 3272-3278
- [42] Greenberger, M. J.; Kunkel, S. L.; Strieter, R. M.; Lukacs, N. W.; Bramson, J.; Gauldie, J.; Graham, F. L.; Hitt, M.; Danforth, J. M.; Standiford, T. J. (1996): IL-12 gene therapy protects mice in lethal *Klebsiella pneumoniae*. *J.Immunol.*: Band 157, Nr. 7, Seite 3006-3012
- [43] Guidot, D. M.; Roman, J. (2002): Chronic ethanol ingestion increases susceptibility to acute lung injury: role of oxidative stress and tissue remodeling. *Chest*: Band 122, Nr. 6 Suppl, Seite 309-314
- [44] Happel, K. I.; Nelson, S. (2005): Alcohol, immunosuppression, and the lung. *Proc.Am.Thorac.Soc.*: Band 2, Nr. 5, Seite 428-432
- [45] Hehlhans, T.; Pfeffer, K. (2005): The intriguing biology of the tumor necrosis factor/tumor necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*: Band 115, Nr. 1, Seite 1-20
- [46] Heinz, R.; Waltenbaugh, C. (2007): Ethanol consumption modifies dendritic cell antigen presentation in mice. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 31, Nr. 10, Seite 1759-1771
- [47] Held, T. K.; Mielke, M. E.; Chedid, M.; Unger, M.; Trautmann, M.; Huhn, D.; Cross, A. S. (1998): Granulocyte colony-stimulating factor worsens the outcome of experimental *Klebsiella pneumoniae pneumoniae* pneumonia through direct interaction with the bacteria. *Blood*: Band 91, Nr. 7, Seite 2525-2535
- [48] Hess, J.; Ladel, C.; Miko, D.; Kaufmann, S. H. (1996): *Salmonella typhimurium aroA*-infection in gene-targeted immunodeficient mice: major role of CD4⁺ TCR-alpha beta cells and IFN-gamma in bacterial clearance independent of intracellular location. *J.Immunol.*: Band 156, Nr. 9, Seite 3321-3326

- [49] Hochepped, T.; Van, Molle W.; Berger, F. G.; Baumann, H.; Libert, C. (2000): Involvement of the acute phase protein alpha 1-acid glycoprotein in nonspecific resistance to a lethal gram-negative infection. *J.Biol.Chem.*: Band 275, Nr. 20, Seite 14903-14909
- [50] Hote, P. T.; Sahoo, R.; Jani, T. S.; Ghare, S. S.; Chen, T.; Joshi-Barve, S.; McClain, C. J.; Barve, S. S. (2007): Ethanol inhibits methionine adenosyltransferase II activity and S-adenosylmethionine biosynthesis and enhances caspase-3-dependent cell death in T lymphocytes: relevance to alcohol-induced immunosuppression. *J.Nutr.Biochem.*
- [51] Isaacs, A.; Lindenmann, J. (1957): Virus interference. I. The interferon. *Proc.R.Soc.Lond B Biol.Sci.*: Band 147, Nr. 927, Seite 258-267
- [52] Janeway, C. A.; Travers, P.; Walport, M.; Shlomchik, M. J. (2005): Immunobiology. The Immune System in Health and Disease. 6. Auflage, Garland Science Publishing, New York.
- [53] Jarvis, W. R.; Munn, V. P.; Highsmith, A. K.; Culver, D. H.; Hughes, J. M. (1985): The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. *Infect.Control*: Band 6, Nr. 2, Seite 68-74
- [54] Jensen, N. H.; Dragsted, L.; Christensen, J. K.; Jorgensen, J. C.; Qvist, J. (1988): Severity of illness and outcome of treatment in alcoholic patients in the intensive care unit. *Intensive Care Med.*: Band 15, Nr. 1, Seite 19-22
- [55] Jerrells, T. R.; Sibley, D. (1995): Effects of ethanol on cellular immunity to facultative intracellular bacteria. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 19, Nr. 1, Seite 11-16
- [56] Jerrells, T. R.; Smith, W.; Eckardt, M. J. (1990): Murine model of ethanol-induced immunosuppression. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 14, Nr. 4, Seite 546-550
- [57] Jong, G. M.; Hsiue, T. R.; Chen, C. R.; Chang, H. Y.; Chen, C. W. (1995): Rapidly fatal outcome of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* pneumonia in alcoholics. *Chest*: Band 107, Nr. 1, Seite 214-217
- [58] Kamei, K.; Nimura, Y.; Nagino, M.; Aono, K.; Nakashima, I. (2002): Surgical stress reduces mortality from endotoxin shock. *Langenbecks Arch.Surg.*: Band 386, Nr. 7, Seite 512-517
- [59] Kern, F.; Faulhaber, N.; Frommel, C.; Khatamzas, E.; Prosch, S.; Schonemann, C.; Kretzschmar, I.; Volkmer-Engert, R.; Volk, H. D.; Reinke, P. (2000): Analysis of CD8 T cell reactivity to cytomegalovirus using protein-spanning pools of overlapping pentadecapeptides. *Eur.J.Immunol.*: Band 30, Nr. 6, Seite 1676-1682
- [60] Kirchhoff, D.; Frentsch, M.; Leclerk, P.; Bumann, D.; Rausch, S.; Hartmann, S.; Thiel, A.; Scheffold, A. (2007): Identification and isolation of murine antigen-reactive T cells according to CD154 expression. *Eur.J.Immunol.*: Band 37, Nr. 9, Seite 2370-2377
- [61] Kolls, J. K.; Habetz, S.; Shean, M. K.; Vazquez, C.; Brown, J. A.; Lei, D.; Schwarzenberger, P.; Ye, P.; Nelson, S.; Summer, W. R.; Shellito, J. E. (1999): IFN-gamma and CD8+ T cells restore host defenses against *Pneumocystis carinii* in mice depleted of CD4+ T cells. *J.Immunol.*: Band 162, Nr. 5, Seite 2890-2894

- [62] Kolls, J. K.; Lei, D.; Nelson, S.; Summer, W. R.; Greenberg, S.; Beutler, B. (1995): Adenovirus-mediated blockade of tumor necrosis factor in mice protects against endotoxic shock yet impairs pulmonary host defense. *J.Infect.Dis.*: Band 171, Nr. 3, Seite 570-575
- [63] Kolls, J. K.; Lei, D.; Stoltz, D.; Zhang, P.; Schwarzenberger, P. O.; Ye, P.; Bagby, G.; Summer, W. R.; Shellito, J. E.; Nelson, S. (1998): Adenoviral-mediated interferon-gamma gene therapy augments pulmonary host defense of ethanol-treated rats. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 22, Nr. 1, Seite 157-162
- [64] Kraus, L.; Bauernfeind, R. (2000): Repräsentativerhebungen zum Gebrauch psychoaktiver Substanzen bei Erwachsenen in Deutschland 2000. *Sucht*: Band 47. Jahrgang, Nr. Sonderheft 1
- [65] Kürfner, H. und Kraus, L (2002): Serie: Alkoholismus - Epidemiologische und ökonomische Aspekte des Alkoholismus. *Deutsches Ärzteblatt*: Band 99, Seite A936-A945.
- [66] Laichalk, L. L.; Bucknell, K. A.; Huffnagle, G. B.; Wilkowski, J. M.; Moore, T. A.; Romanelli, R. J.; Standiford, T. J. (1998): Intrapulmonary delivery of tumor necrosis factor agonist peptide augments host defense in murine gram-negative bacterial pneumonia. *Infect.Immun.*: Band 66, Nr. 6, Seite 2822-2826
- [67] Laichalk, L. L.; Kunkel, S. L.; Strieter, R. M.; Danforth, J. M.; Bailie, M. B.; Standiford, T. J. (1996): Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine Klebsiella pneumonia. *Infect.Immun.*: Band 64, Nr. 12, Seite 5211-5218
- [68] Lanzke, N.; Kleinwachter, R.; Kerschischnik, S.; Sargsyan, L.; Groneberg, D. A.; Kamradt, T.; Liesenfeld, O.; Krenn, V.; Sander, M.; Spies, C. (2007): Differential effects of ethanol on IFN-gamma- and TNF-alpha-producing splenic T lymphocytes in a murine model of gram-negative pneumonia. *Addict.Biol.*: Band 12, Nr. 1, Seite 59-68
- [69] Laso, F. J.; Lapena, P.; Madruga, J. I.; San Miguel, J. F.; Orfao, A.; Iglesias, M. C.; varez-Mon, M. (1997): Alterations in tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-6 production by natural killer cell-enriched peripheral blood mononuclear cells in chronic alcoholism: relationship with liver disease and ethanol intake. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 21, Nr. 7, Seite 1226-1231
- [70] Latif, O.; Peterson, J. D.; Waltenbaugh, C. (2002): Alcohol-mediated polarization of type 1 and type 2 immune responses. *Front Biosci.*: Band 7, Seite 135-147
- [71] Lee, S. W.; Feingold, D. L.; Carter, J. J.; Zhai, C.; Stapleton, G.; Gleason, N.; Whelan, R. L. (2003): Peritoneal macrophage and blood monocyte functions after open and laparoscopic-assisted cecectomy in rats. *Surg.Endosc.*: Band 17, Nr. 12, Seite 1996-2002
- [72] Lieber, C. S. (1995): Medical disorders of alcoholism. *N.Engl.J.Med.*: Band 333, Nr. 16, Seite 1058-1065
- [73] Lockhart, S. R.; Abramson, M. A.; Beekmann, S. E.; Gallagher, G.; Riedel, S.; Diekema, D. J.; Quinn, J. P.; Doern, G. V. (2007): Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J.Clin.Microbiol.*: Band 45, Nr. 10, Seite 3352-3359

- [74] MacGregor, R. R.; Louria, D. B. (1997): Alcohol and infection. *Curr.Clin.Top.Infect.Dis.*: Band 17, Seite 291-315
- [75] Manderscheid, P. A.; Bodkin, R. P.; Davidson, B. A.; Jensen, E.; Russo, T. A.; Knight, P. R. (2004): Bacterial clearance and cytokine profiles in a murine model of postsurgical nosocomial pneumonia. *Clin.Diagn.Lab Immunol.*: Band 11, Nr. 4, Seite 742-751
- [76] Mandrekar, P.; Catalano, D.; Dolganiuc, A.; Kodys, K.; Szabo, G. (2004): Inhibition of myeloid dendritic cell accessory cell function and induction of T cell anergy by alcohol correlates with decreased IL-12 production. *J.Immunol.*: Band 173, Nr. 5, Seite 3398-3407
- [77] Mann, KF (2002): Serie - Alkoholismus: Neue ärztliche Aufgaben bei Alkoholproblemen. *Deutsches Ärzteblatt*, Band 99, Seite A632-A644.
- [78] Mason, C. M.; Dobard, E.; Kolls, J. K.; Nelson, S. (2000): Ethanol and murine interleukin (IL)-12 production. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 24, Nr. 4, Seite 553-559
- [79] Mason, C. M.; Porretta, E.; Zhang, P.; Nelson, S. (2007): CD4+ CD25+ transforming growth factor-beta-producing T cells are present in the lung in murine tuberculosis and may regulate the host inflammatory response. *Clin.Exp.Immunol.*: Band 148, Nr. 3, Seite 537-545
- [80] Mastroeni, P.; Villarreal-Ramos, B.; Hormaeche, C. E. (1992): Role of T cells, TNF alpha and IFN gamma in recall of immunity to oral challenge with virulent salmonellae in mice vaccinated with live attenuated aro- Salmonella vaccines. *Microb.Pathog.*: Band 13, Nr. 6, Seite 477-491
- [81] Medzhitov, R.; Janeway, C. A., Jr. (1997): Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr.Opin.Immunol.*: Band 9, Nr. 1, Seite 4-9
- [82] Meisel, C.; Bonhagen, K.; Lohning, M.; Coyle, A. J.; Gutierrez-Ramos, J. C.; Radbruch, A.; Kamradt, T. (2001): Regulation and function of T1/ST2 expression on CD4+ T cells: induction of type 2 cytokine production by T1/ST2 cross-linking. *J.Immunol.*: Band 166, Nr. 5, Seite 3143-3150
- [83] Menger, M. D.; Vollmar, B. (2004): Surgical trauma: hyperinflammation versus immunosuppression? *Langenbecks Arch.Surg.*: Band 389, Nr. 6, Seite 475-484
- [84] Messingham, K. A.; Faunce, D. E.; Kovacs, E. J. (2002): Alcohol, injury, and cellular immunity. *Alcohol*: Band 28, Nr. 3, Seite 137-149
- [85] Meyer, C.; Rumpf, H. J.; Hapke, U.; Dilling, H.; John, U. (2000): Prevalence of alcohol consumption, abuse and dependence in a country with high per capita consumption: findings from the German TACOS study. Transitions in Alcohol Consumption and Smoking. *Soc.Psychiatry Psychiatr.Epidemiol.*: Band 35, Nr. 12, Seite 539-547
- [86] Mira, J. P.; Cariou, A.; Grall, F.; Delclaux, C.; Losser, M. R.; Heshmati, F.; Cheval, C.; Monchi, M.; Teboul, J. L.; Riche, F.; Leleu, G.; Arbibe, L.; Mignon, A.; Delpech, M.; Dhainaut, J. F. (1999): Association of TNF2, a TNF-alpha promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. *JAMA*: Band 282, Nr. 6, Seite 561-568

- [87] Moore, R. D.; Bone, L. R.; Geller, G.; Mamon, J. A.; Stokes, E. J.; Levine, D. M. (1989): Prevalence, detection, and treatment of alcoholism in hospitalized patients. *JAMA*: Band 261, Nr. 3, Seite 403-407
- [88] Moore, T. A.; Lau, H. Y.; Cogen, A. L.; Monteleon, C. L.; Standiford, T. J. (2003): Anti-tumor necrosis factor-alpha therapy during murine *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: increased mortality in the absence of liver injury. *Shock*: Band 20, Nr. 4, Seite 309-315
- [89] Moore, T. A.; Moore, B. B.; Newstead, M. W.; Standiford, T. J. (2000): Gamma delta-T cells are critical for survival and early proinflammatory cytokine gene expression during murine *Klebsiella pneumoniae*. *J.Immunol.*: Band 165, Nr. 5, Seite 2643-2650
- [90] Moore, T. A.; Perry, M. L.; Getsoian, A. G.; Monteleon, C. L.; Cogen, A. L.; Standiford, T. J. (2003): Increased mortality and dysregulated cytokine production in tumor necrosis factor receptor 1-deficient mice following systemic *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect.Immun.*: Band 71, Nr. 9, Seite 4891-4900
- [91] Moore, T. A.; Perry, M. L.; Getsoian, A. G.; Newstead, M. W.; Standiford, T. J. (2002): Divergent role of gamma interferon in a murine model of pulmonary versus systemic *Klebsiella pneumoniae* infection. *Infect.Immun.*: Band 70, Nr. 11, Seite 6310-6318
- [92] Moore, T. A.; Standiford, T. J. (1998): The role of cytokines in bacterial pneumonia: an inflammatory balancing act. *Proc.Assoc.Am.Physicians*: Band 110, Nr. 4, Seite 297-305
- [93] Moss, M. L.; Jin, S. L.; Milla, M. E.; Bickett, D. M.; Burkhart, W.; Carter, H. L.; Chen, W. J.; Clay, W. C.; Didsbury, J. R.; Hassler, D.; Hoffman, C. R.; Kost, T. A.; Lambert, M. H.; Leesnitzer, M. A.; McCauley, P.; McGeehan, G.; Mitchell, J.; Moyer, M.; Pahel, G.; Rocque, W.; Overton, L. K.; Schoenen, F.; Seaton, T.; Su, J. L.; Becherer, J. D.; . (1997): Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor-necrosis factor-alpha. *Nature*: Band 385, Nr. 6618, Seite 733-736
- [94] Moussa, K.; Michie, H. J.; Cree, I. A.; McCafferty, A. C.; Winter, J. H.; Dhillon, D. P.; Stephens, S.; Brown, R. A. (1994): Phagocyte function and cytokine production in community acquired pneumonia. *Thorax*: Band 49, Nr. 2, Seite 107-111
- [95] Nair, M. P.; Schwartz, S. A.; Kronfol, Z. A.; Hill, E. M.; Sweet, A. M.; Greden, J. F. (1994): Suppression of tumor necrosis factor production by alcohol in lipopolysaccharide-stimulated culture. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 18, Nr. 3, Seite 602-607
- [96] Nelson, S.; Bagby, G.; Summer, W. R. (1989): Alcohol suppresses lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor activity in serum and lung. *Life Sci.*: Band 44, Nr. 10, Seite 673-676
- [97] Nelson, S.; Bagby, G. J.; Bainton, B. G.; Summer, W. R. (1989): The effects of acute and chronic alcoholism on tumor necrosis factor and the inflammatory response. *J.Infect.Dis.*: Band 160, Nr. 3, Seite 422-429
- [98] Nelson, S.; Kolls, J. K. (2002): Alcohol, host defence and society. *Nat.Rev.Immunol.*: Band 2, Nr. 3, Seite 205-209

- [99] Nwariaku, F. E.; McIntyre, K. L.; Sikes, P. J.; Mileski, W. J. (1995): Alterations in alveolar macrophage tumor necrosis factor (TNF) response following hemorrhagic shock. *Shock*: Band 4, Nr. 3, Seite 200-203
- [100] Ogawa, K.; Hirai, M.; Katsube, T.; Murayama, M.; Hamaguchi, K.; Shimakawa, T.; Naritake, Y.; Hosokawa, T.; Kajiwara, T. (2000): Suppression of cellular immunity by surgical stress. *Surgery*: Band 127, Nr. 3, Seite 329-336
- [101] Omidvari, K.; Casey, R.; Nelson, S.; Olariu, R.; Shellito, J. E. (1998): Alveolar macrophage release of tumor necrosis factor-alpha in chronic alcoholics without liver disease. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 22, Nr. 3, Seite 567-572
- [102] Ooshiro, M.; Sugishita, Y. I.; Tanaka, H.; Koide, K.; Nagashima, M.; Katoh, R. (2004): Regulation of perioperative immunological changes following laparotomy: effects of biological response modifier (BRM) on surgical stress. *Immunol.Lett.*: Band 93, Nr. 1, Seite 33-38
- [103] Pezzutto, A.; Ulrichs, T.; Burmester, G.-R. (2007): Taschenatlas der Immunologie. 2. Auflage. Auflage, Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- [104] Podschun, R.; Ullmann, U. (1998): Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin.Microbiol.Rev.*: Band 11, Nr. 4, Seite 589-603
- [105] Poschl, G.; Seitz, H. K. (2004): Alcohol and cancer. *Alcohol Alcohol*: Band 39, Nr. 3, Seite 155-165
- [106] Potula, R.; Haorah, J.; Knipe, B.; Leibhart, J.; Chrastil, J.; Heilman, D.; Dou, H.; Reddy, R.; Ghorpade, A.; Persidsky, Y. (2006): Alcohol abuse enhances neuroinflammation and impairs immune responses in an animal model of human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am.J.Pathol.*: Band 168, Nr. 4, Seite 1335-1344
- [107] Rantala, A.; Lehtonen, O. P.; Niinikoski, J. (1997): Alcohol abuse: a risk factor for surgical wound infections? *Am.J.Infect.Control*: Band 25, Nr. 5, Seite 381-386
- [108] Rink, L.; Kirchner, H. (1996): Recent progress in the tumor necrosis factor-alpha field. *Int Arch.Allergy Immunol.*: Band 111, Nr. 3, Seite 199-209
- [109] Romeo, J.; Warnberg, J.; Nova, E.; Diaz, L. E.; Gonzalez-Gross, M.; Marcos, A. (2007): Changes in the immune system after moderate beer consumption. *Ann.Nutr.Metab*: Band 51, Nr. 4, Seite 359-366
- [110] Saad, A. J.; Domiati-Saad, R.; Jerrells, T. R. (1993): Ethanol ingestion increases susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes*. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 17, Nr. 1, Seite 75-85
- [111] Saeed, R. W.; Varma, S.; Peng, T.; Tracey, K. J.; Sherry, B.; Metz, C. N. (2004): Ethanol blocks leukocyte recruitment and endothelial cell activation in vivo and in vitro. *J.Immunol.*: Band 173, Nr. 10, Seite 6376-6383
- [112] Sander, M.; Irwin, M.; Sinha, P.; Naumann, E.; Kox, W. J.; Spies, C. D. (2002): Suppression of interleukin-6 to interleukin-10 ratio in chronic alcoholics: association with postoperative infections. *Intensive Care Med.*: Band 28, Nr. 3, Seite 285-292

- [113] Sander, M.; Neumann, T.; von, Dossow, V; Schonfeld, H.; Lau, A.; Eggers, V.; Spies, C. (2006): Alcohol use disorder: risks in anesthesia and intensive care medicine. *Internist (Berl)*: Band 47, Nr. 4, Seite 332, 334-6, 338, passim
- [114] Schodde, H.; Hurst, S.; Munroe, M.; Barrett, T.; Waltenbaugh, C. (1996): Ethanol ingestion inhibits cell-mediated immune responses of unprimed T-cell receptor transgenic mice. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 20, Nr. 5, Seite 890-899
- [115] Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T.; Hume, D. A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J.Leukoc.Biol.*: Band 75, Nr. 2, Seite 163-189
- [116] Shellito, J. E.; Olariu, R. (1998): Alcohol decreases T-lymphocyte migration into lung tissue in response to *Pneumocystis carinii* and depletes T-lymphocyte numbers in the spleens of mice. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 22, Nr. 3, Seite 658-663
- [117] Shellito, J. E.; quan, Zheng M.; Ye, P.; Ruan, S.; Shean, M. K.; Kolls, J. (2001): Effect of alcohol consumption on host release of interleukin-17 during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 25, Nr. 6, Seite 872-881
- [118] Song, K.; Coleman, R. A.; Zhu, X.; Alber, C.; Ballas, Z. K.; Waldschmidt, T. J.; Cook, R. T. (2002): Chronic ethanol consumption by mice results in activated splenic T cells. *J.Leukoc.Biol.*: Band 72, Nr. 6, Seite 1109-1116
- [119] Spies, C. (2000): Anesthesiologic aspects of chronic alcohol abuse. *Ther.Umsch.*: Band 57, Nr. 4, Seite 261-263
- [120] Spies, C.; Tonnesen, H.; Andreasson, S.; Helander, A.; Conigrave, K. (2001): Perioperative morbidity and mortality in chronic alcoholic patients. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 25, Nr. 5 Suppl ISBRA, Seite 164S-170S
- [121] Spies, C. D.; Herpell, J.; Beck, O.; Muller, C.; Pragst, F.; Borg, S.; Helander, A. (1999): The urinary ratio of 5-hydroxytryptophol to 5-hydroxyindole-3-acetic acid in surgical patients with chronic alcohol misuse. *Alcohol*: Band 17, Nr. 1, Seite 19-27
- [122] Spies, C. D.; Neuner, B.; Neumann, T.; Blum, S.; Muller, C.; Rommelspacher, H.; Rieger, A.; Sanft, C.; Specht, M.; Hannemann, L.; Striebel, H. W.; Schaffartzik, W. (1996): Intercurrent complications in chronic alcoholic men admitted to the intensive care unit following trauma. *Intensive Care Med.*: Band 22, Nr. 4, Seite 286-293
- [123] Spies, C. D.; Nordmann, A.; Brummer, G.; Marks, C.; Conrad, C.; Berger, G.; Runkel, N.; Neumann, T.; Muller, C.; Rommelspacher, H.; Specht, M.; Hannemann, L.; Striebel, H. W.; Schaffartzik, W. (1996): Intensive care unit stay is prolonged in chronic alcoholic men following tumor resection of the upper digestive tract. *Acta Anaesthesiol.Scand.*: Band 40, Nr. 6, Seite 649-656
- [124] Spies, C. D.; Rommelspacher, H. (1999): Alcohol withdrawal in the surgical patient: prevention and treatment. *Anesth.Analg.*: Band 88, Nr. 4, Seite 946-954

- [125] Spies, C. D.; von, Dossow, V.; Eggers, V.; Jetschmann, G.; El-Hilali, R.; Egert, J.; Fischer, M.; Schroder, T.; Hoflich, C.; Sinha, P.; Paschen, C.; Mirsalim, P.; Brunsch, R.; Hopf, J.; Marks, C.; Wernecke, K. D.; Pragst, F.; Ehrenreich, H.; Muller, C.; Tonnesen, H.; Oelkers, W.; Rohde, W.; Stein, C.; Kox, W. J. (2004): Altered cell-mediated immunity and increased postoperative infection rate in long-term alcoholic patients. *Anesthesiology*: Band 100, Nr. 5, Seite 1088-1100
- [126] Standiford, T. J. (1997): Cytokines and pulmonary host defenses. *Curr.Opin.Pulm.Med.*: Band 3, Nr. 2, Seite 81-88
- [127] Standiford, T. J.; Wilkowski, J. M.; Sisson, T. H.; Hattori, N.; Mehrad, B.; Bucknell, K. A.; Moore, T. A. (1999): Intrapulmonary tumor necrosis factor gene therapy increases bacterial clearance and survival in murine gram-negative pneumonia. *Hum.Gene Ther.*: Band 10, Nr. 6, Seite 899-909
- [128] Starkenburg, S.; Munroe, M. E.; Waltenbaugh, C. (2001): Early alteration in leukocyte populations and Th1/Th2 function in ethanol-consuming mice. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 25, Nr. 8, Seite 1221-1230
- [129] Szabo, G. (1999): Consequences of alcohol consumption on host defence. *Alcohol Alcohol*: Band 34, Nr. 6, Seite 830-841
- [130] Szabo, G.; Catalano, D.; White, B.; Mandrekar, P. (2004): Acute alcohol consumption inhibits accessory cell function of monocytes and dendritic cells. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 28, Nr. 5, Seite 824-828
- [131] Szabo, G.; Mandrekar, P.; Dolganiuc, A.; Catalano, D.; Kodys, K. (2001): Reduced alloreactive T-cell activation after alcohol intake is due to impaired monocyte accessory cell function and correlates with elevated IL-10, IL-13, and decreased IFN gamma levels. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 25, Nr. 12, Seite 1766-1772
- [132] Szabo, G.; Mandrekar, P.; Girouard, L.; Catalano, D. (1996): Regulation of human monocyte functions by acute ethanol treatment: decreased tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and elevated interleukin-10, and transforming growth factor-beta production. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 20, Nr. 5, Seite 900-907
- [133] Szczesny, G.; Nolte, D.; Veihelmann, A.; Messmer, K. (2000): A new chamber technique for intravital microscopic observations in the different soft tissue layers of mouse hindleg. *J Trauma*: Band 49, Nr. 6, Seite 1108-1115
- [134] Takashima, K.; Tateda, K.; Matsumoto, T.; Iizawa, Y.; Nakao, M.; Yamaguchi, K. (1997): Role of tumor necrosis factor alpha in pathogenesis of pneumococcal pneumonia in mice. *Infect.Immun.*: Band 65, Nr. 1, Seite 257-260
- [135] Tonnesen, H. (2003): Alcohol abuse and postoperative morbidity. *Dan.Med.Bull.*: Band 50, Nr. 2, Seite 139-160
- [136] Tonnesen, H.; Kaiser, A. H.; Nielsen, B. B.; Pedersen, A. E. (1992): Reversibility of alcohol-induced immune depression. *Br.J.Addict.*: Band 87, Nr. 7, Seite 1025-1028
- [137] Tonnesen, H.; Kehlet, H. (1999): Preoperative alcoholism and postoperative morbidity. *Br.J.Surg.*: Band 86, Nr. 7, Seite 869-874

- [138] Tsirogianni, A. K.; Moutsopoulos, N. M.; Moutsopoulos, H. M. (2006): Wound healing: immunological aspects. *Injury*: Band 37 Suppl 1, Seite S5-12
- [139] Uesugi, T.; Froh, M.; Arteel, G. E.; Bradford, B. U.; Wheeler, M. D.; Gabele, E.; Isayama, F.; Thurman, R. G. (2002): Role of lipopolysaccharide-binding protein in early alcohol-induced liver injury in mice. *J.Immunol.*: Band 168, Nr. 6, Seite 2963-2969
- [140] Vassalli, P. (1992): The pathophysiology of tumor necrosis factors. *Annu.Rev.Immunol.*: Band 10, Seite 411-452
- [141] von Heymann, C.; Langenkamp, J.; Dubisz, N.; von, Dossow, V; Schaffartzik, W.; Kern, H.; Kox, W. J.; Spies, C. (2002): Posttraumatic immune modulation in chronic alcoholics is associated with multiple organ dysfunction syndrome. *J.Trauma*: Band 52, Nr. 1, Seite 95-103
- [142] Waltenbaugh, C.; Peterson, J. D. (1997): Ethanol impairs the induction of delayed hypersensitivity in C57BL/6 mice. *Alcohol*: Band 14, Nr. 2, Seite 149-153
- [143] Waltenbaugh, C.; Vasquez, K.; Peterson, J. D. (1998): Alcohol consumption alters antigen-specific Th1 responses: mechanisms of deficit and repair. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 22, Nr. 5 Suppl, Seite 220-223
- [144] Winterbauer, R. H.; Bedon, G. A.; Ball, W. C., Jr. (1969): Recurrent pneumonia. Predisposing illness and clinical patterns in 158 patients. *Ann.Intern.Med.*: Band 70, Nr. 4, Seite 689-700
- [145] Winterrowd, G. E.; Chin, J. E. (1999): Flow cytometric detection of antigen-specific cytokine responses in lung T cells in a murine model of pulmonary inflammation. *J.Immunol.Methods*: Band 226, Nr. 1-2, Seite 105-118
- [146] World Health Organisation (2007): Alcohol and injury in emergency departments. URL: http://www.who.int/substance_abuse/publications/alcohol/en/
- [147] World Health Organisation (2008): Pure alcohol consumption. URL: http://ec.europa.eu/health/ph_information/dissemination/echi/echi_11_en.pdf
- [148] Yoshida, K.; Matsumoto, T.; Tateda, K.; Uchida, K.; Tsujimoto, S.; Iwakurai, Y.; Yamaguchi, K. (2001): Protection against pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae* in mice by interferon-gamma through activation of phagocytic cells and stimulation of production of other cytokines. *J.Med.Microbiol.*: Band 50, Nr. 11, Seite 959-964
- [149] Zambell, K. L.; Phelan, H.; Vande, Stouwe C.; Zhang, P.; Shellito, J. E.; Molina, P. E. (2004): Acute alcohol intoxication during hemorrhagic shock: impact on host defense from infection. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 28, Nr. 4, Seite 635-642
- [150] Zellweger, R.; Ayala, A.; Zhu, X. L.; Morrison, M. H.; Chaudry, I. H. (1995): Effect of surgical trauma on splenocyte and peritoneal macrophage immune function. *J.Trauma*: Band 39, Nr. 4, Seite 645-650

- [151] Zhang, Z.; Bagby, G. J.; Stoltz, D.; Oliver, P.; Schwarzenberger, P. O.; Kolls, J. K. (2001): Prolonged ethanol treatment enhances lipopolysaccharide/phorbol myristate acetate-induced tumor necrosis factor-alpha production in human monocytic cells. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 25, Nr. 3, Seite 444-449
- [152] Zhang, Z.; Cork, J.; Ye, P.; Lei, D.; Schwarzenberger, P. O.; Summer, W. R.; Shellito, J. E.; Nelson, S.; Kolls, J. K. (2000): Inhibition of TNF-alpha processing and TACE-mediated ectodomain shedding by ethanol. *J.Leukoc.Biol.*: Band 67, Nr. 6, Seite 856-862
- [153] Zhao, X. J.; Marrero, L.; Song, K.; Oliver, P.; Chin, S. Y.; Simon, H.; Schurr, J. R.; Zhang, Z.; Thoppil, D.; Lee, S.; Nelson, S.; Kolls, J. K. (2003): Acute alcohol inhibits TNF-alpha processing in human monocytes by inhibiting TNF/TNF-alpha-converting enzyme interactions in the cell membrane. *J.Immunol.*: Band 170, Nr. 6, Seite 2923-2931
- [154] Zhao, X. J.; Oliver, P.; Song, K.; Schurr, J.; Zhang, Z.; Kolls, J. K. (2004): Chronic ethanol enhances ectodomain shedding in T cells and monocytes. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 28, Nr. 9, Seite 1399-1407
- [155] Zisman, D. A.; Strieter, R. M.; Kunkel, S. L.; Tsai, W. C.; Wilkowski, J. M.; Bucknell, K. A.; Standiford, T. J. (1998): Ethanol feeding impairs innate immunity and alters the expression of Th1- and Th2-phenotype cytokines in murine Klebsiella pneumonia. *Alcohol Clin.Exp.Res.*: Band 22, Nr. 3, Seite 621-627

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Abläufe der zellulären und humoralen Immunität.....	9
Abbildung 2: Merkmale der Lichtstreuung einer Zelle.....	23
Abbildung 3: Darstellung der manuell gesetzten Gates als Dotplotgrafiken	25
Abbildung 4: Manuell gesetzte Gates in Dotplotgrafiken.....	31
Abbildung 5: Durchflusszytometrische Messung TNF- α produzierender CD4 ⁺ T-Lymphozyten.....	32
Abbildung 6: Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil TNF- α produzierender CD4 ⁺ Milz-T-Lymphozyten.....	33
Abbildung 7: Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil IFN- γ produzierender CD4 ⁺ Milz-T-Lymphozyten	34
Abbildung 8: Durchflusszytometrische Messung IFN- γ produzierender CD4 ⁺ T-Lymphozyten.....	35
Abbildung 9: Durchflusszytometrische Messung TNF- α produzierender CD8 ⁺ T-Lymphozyten.....	37
Abbildung 10: Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil TNF- α produzierender CD8 ⁺ T-Zellen	38
Abbildung 11: Durchflusszytometrische Messung IFN- γ produzierender CD8 ⁺ T-Zellen.....	39
Abbildung 12: Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil IFN- γ produzierender CD8 ⁺ T-Zellen.....	40
Abbildung 13: Messung der Keimbelastung in Lungen 24 Stunden <i>post infectionem</i>	42
Abbildung 14: Histologische Darstellung der Lunge ohne stattgehabte Infektion mit <i>K. pneumoniae</i>	43
Abbildung 15: Histologische Darstellung der Lungen (HE-Färbung) 24 Stunden nach Infektion mit <i>K. pneumoniae</i>	44
Abbildung 16: Histologische Darstellung der Leber nach HE-Färbung.. ..	45
Abbildung 17: Darstellung der Gewichtsunterschiede.....	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Alkoholkonsummuster nach Menge des konsumierten Alkohols.....	1
Tabelle 2:	Übersicht über die Versuchsgruppeneinteilung.....	15
Tabelle 3:	Gruppenspezifischer Versuchsablauf.....	19
Tabelle 4:	Kriterien zur Erhebung des klinischen Scores.....	21
Tabelle 5:	Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe mit ihren Absorption- und Emissionsmaxima.....	24
Tabelle 6:	Statistische Prüfung auf signifikante Unterschiede.....	30
Tabelle 7:	Verteilung TNF- α produzierender CD4 ⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A bis D.....	33
Tabelle 8:	Verteilung IFN- γ produzierender CD4 ⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A bis D.....	36
Tabelle 9:	Verteilung TNF- α produzierender CD8 ⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A bis D.....	37
Tabelle 10:	Verteilung IFN- γ produzierender CD8 ⁺ T-Lymphozyten in den Gruppen A bis D.....	39
Tabelle 11:	Keimbelastung in Lungen 24 Stunden <i>post infectionem</i>	41
Tabelle 12:	Statistische Auswertung der Keimbelastung in Lungen 24 Stunden <i>post infectionem</i>	41
Tabelle 13:	Anzahl Kolonie bildender Einheiten im mikrobiologischem Blutaussstrich nach 24-stündiger Inkubation.....	43
Tabelle 14:	Darstellung der Mittelwerte der klinischen Parameter und der Gesamtsumme	45
Tabelle 15:	Blutalkoholbestimmung	47

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
AK	Antikörper
APC	Allophycocyanin
AgPC	Antigen präsentierende Zelle („antigen-presenting cell“)
BSA	Rinderserumalbumin („Bovine Serum Albumin“)
CD	Differenzierungsfaktor („Cluster of Differentiation“)
DC	Dendritische Zelle („dendritic cell“)
DSM-IV	“Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders” (4. Auflage)
DTH	Reaktion vom Spättyp, („delayed-type hypersensitivity“)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zell-Analyse („Fluorescence Activated Cell Scanning“)
FCS	fötales Kälberserum („Fetal Calf Serum“)
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht ("forward scatter")
HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperazine-N'-[2-ethansulfonsäure]
ICD-10	„International Classification of Diseases and Related Health Problems” (10. Auflage)
i.n.	intranasal
i.p.	intraperitoneal
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>

Anhang

KBE	Kolonie bildende Einheit
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
NaCl	Kochsalz
NK	Natürliche Killerzellen („natural killer cell“)
OP	Operation
p.i.	<i>post infectionem</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („phosphate-buffered saline“)
PE	phycoerythrin
PerCP	Peridinin Chlorophyll Protein
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
SD	Standardabweichung, („standard deviation“)
SPF	Spezifisch pathogenfrei
SSC	Seitwärtsstreulicht ("side scatter")
TCR	T-Zellrezeptor („T cell receptor“)
T _H	T-Helferzellen („T helper cells“)
TNF	Tumornekrosefaktor
U	Unit(s)
U/min	Umdrehung pro Minute
v/w	Volumen per Gewicht („Volume per weight“)

Einheiten des Internationalen Einheitensystem (SI, Le Système international d'unités) wurden nach geltendem Gesetz verwendet.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Mein erster und besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Spies, Klinikdirektorin der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Virchow Klinikum und Campus Charité Mitte für die Bereitstellung des interessanten Dissertationsthemas, die Vorbereitung des tierexperimentellen Antrags, die Unterstützung im Team durch fachkundiges Personal sowie die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Weiterhin möchte ich Nadine Lanzke für die engagiert organisatorische Betreuung dieser Arbeit und die strukturierte Umsetzung der experimentellen Aufgaben danken. Sie bewies viel Geduld und trug mit ihren kritischen Beiträgen und aufmunternden Worten wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

PD Dr. Große-Siestrup, Prof. Dr. Appel sowie Prof. Dr. Liesenfeld möchte ich für die Möglichkeit danken, einen Großteil der Experimente in den Laboren der Tierexperimentellen Einrichtung des Virchow Klinikums, des Robert-Koch-Institutes sowie des Institutes für Infektionsmedizin, Campus Benjamin Franklin durchführen zu können. In diesem Zusammenhang möchte ich auch Rico Böhme und Frau Rüschenhof für ihr Engagement sowie den Tierpflegern und -pflegerinnen für die aufopferungsvolle Versorgung der Versuchstiere danken. Ohne deren Mithilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Nicht zuletzt möchte ich Prof. Dr. Kamradt danken, die durchflusszytometrischen Untersuchungen in seiner Arbeitsgruppe am DRFZ durchführen zu dürfen. Mein besonderer Dank gilt Dr. Kerstin Bonhagen, Dr. Alexander Scheffhold und Dr. Jens Geginat für die anregenden Diskussionen und die Mithilfe bei der Interpretation der Ergebnisse.

Für die Beratung bei der statistischen Analyse und die kritische Durchsicht des statistischen Abschnitts danke ich Frau Dipl.-Math. G. Siebert, Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin (damalige Leitung durch Prof. Dr. K.-D. Wernecke).

Weiterhin möchte ich mich noch bei meinen Mitdoktoranden Steffen Mühlbauer, Lilit Sargyan, Carlotta Pipolo und Moritz von Mettenheim für die zahlreichen Labortage und -abende bedanken. Durch ihr Zutun blieb die Freude an der Forschung auch in Krisenzeiten erhalten.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Jessika Kunz für die zahlreichen Stunden der gemeinsamen Arbeit, der Diskussion und Motivation. Ohne sie wäre vieles schwerer gewesen. Dr. Anja Köhler möchte ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes, die aufbauenden Worte und die anregende fachliche Diskussion danken, die mich vor allem in den letzten

Wochen der Fertigstellung maßgeblich unterstützt haben. Auch meiner Freundin Claudia Scholz bin ich für die zahlreichen Anmerkungen und Hinweise dankbar.

Abschließend danke ich im besonderen Maße meiner Familie Lehmann / Neumann, vor allem meinen Eltern und meinem Mann Martin, die in den Jahren des Studiums und der Anfertigung dieser Doktorarbeit immer hinter mir standen und mich mit aufmunternden Worten an Tagen des Zweifels aufgebaut haben.

Erklärung an Eides Statt

Ich, Anett Neumann, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Einfluss von Ethanol auf TNF- und IFN- γ produzierende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen am operativen infektiösen Mausmodell“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Berlin,

Anett Neumann